



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

**CHARAKTERISIERUNG DES NEGATIVEN COFAKTORS 2  
DER RNA-POLYMERASE II *IN VIVO* UND *IN VITRO***

**VON**

**Jun Xie**

**aus Beijing VR. CHINA**

**2000**



## **Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29.1.1998 von Herrn Priv.-Doz. Dr. M. Meisterernst betreut.

## **Ehrenwörtliche Versicherung**

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, am 04.10.2000

Jun Xie

Dissertation eingereicht am 04.10.2000

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. M. Meisterernst
2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Grosschedl

Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.2000

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1997 bis Juni 2000 im Labor von Herrn Priv.-Doz. Dr. M. Meisterernst am Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

1. **Xie, J., Collart, M., Lemaire, M., Stelzer, G. and Meisterernst, M.** (2000) A single point mutation in TFIIA suppresses NC2 requirement *in vivo*. *EMBO J.*, **19**, 672-682.
2. **Lemaire, M., Xie, J., Meisterernst, M. and Collart, M.** (2000) The NC2 repressor is dispensable in yeast mutated for the Sin4p component of the holoenzyme and plays roles similar to Mot1p *in vivo*. *Mol. Microbiology*. **36**, 163-173.
3. **Meisterernst, M., Ikeda, K., Xie, J. and Collart, M.** (1999) Structure and function of proteins that modulate RNA polymerase II transcription. In *Transcription Regulation in Eukaryotes*. Workshop VII, by the Human Frontier Science Program, Strasbourg, France.

## DANKSAGUNG

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Priv-Doz. Dr. Michael Meisterernst für die Überlassung des interessanten Themas dieser Arbeit bedanken. Mit viel Geduld und zahlreichen Diskussionen hat er mich in die Transkriptionsforschung eingeführt. Ich möchte ihm auch für die Möglichkeit danken, an internationalen Kongressen teilnehmen zu dürfen, wo ich die Teilergebnisse meiner Arbeit präsentieren und wertvolle Erfahrungen sammeln konnte.

Herrn Prof. Dr. Rudolf Grosschedl danke ich dafür, daß er mir die Möglichkeit gegeben hat, die vorliegende Arbeit in einem hervorragenden wissenschaftlichen Umfeld, dem Genzentrum, anzufertigen. Ich danke ihm auch für seine Erstellung des Zweitgutachtens.

Gar nicht genug kann ich Frau Gertraud Stelzer danken, die durch ihre fachliche Kompetenz und hilfreichen Ratschläge zum großen Teil am Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat. Ohne ihre tatkräftige Mithilfe und intensive Beteiligung hätte manche der hier vorgestellten Experimente in dieser Form nicht zustande kommen können.

Dr. Andreas Goppelt danke ich die für die wichtige Vorarbeit zum Projekt und für sein stetes Interesse am Fortgang des Projektes.

Dr. Martine Collart von der medizinischen Universität Genf danke ich ganz herzlich für die Einführung in die Arbeitsmethoden mit Hefe und besonders für die Bereitstellung der Ausgangsstämme für die Experimente in Hefe. Mein Dank gilt ihr auch wegen der wertvollen Diskussionen und der intensiven Kooperation.

Hier möchte ich auch bei allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Meisterernst ein herzliches Dankeschön sagen, für die viele anregende Tips, das angenehme Arbeitsklima und die langjährige gute Zusammenarbeit.

Mein herzlicher Dank geht auch an Ursula Mangold und Babara Güzler für die sicherlich mühsame Durchsicht dieser Arbeit.



## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADH1	Alkoholdehydrogenase Isoenzym 1
AdML	<u>A</u> denovirus <u>M</u> ajor <u>L</u> ate
Amp	Ampicilin
APS	Ammoniumperoxosulfat
ARS	autonome Replikationssequenz
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad in Celsius
cDNA	zur RNA komplementären DNA
Ci	Curie (1 Ci= $3,7 \times 10^{10}$ radioaktive Zerfälle pro Sekunden)
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm ( <u>C</u> alf <u>I</u> ntestine <u>P</u> hosphatase)
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
CTD	Carboxylterminale Domäne
dATP	2'-Desoxyladenosin-5'-triphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Deoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EMSA	Gelretardationsexperiment ( <u>E</u> lectromobility <u>S</u> hift <u>A</u> ssay)
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum ( <u>F</u> etal <u>C</u> alf <u>S</u> erum)
fmol	Femtomol
5-FOA	5-Fluororotsäure ( <u>f</u> luor <u>o</u> rotic <u>a</u> cid)
g	Gramm
G418	Gentamycin, Neomycinderivat
h	Stund(e)
HeLa	Bezeichnung für eine aus einem menschlichen Cervix-Karzinom entwickelte Zelllinie
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIV	<u>H</u> uman <u>I</u> mmunodeficiency <u>V</u> irus
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid

Jukert	Bezeichnung für eine menschliche T-Zelllinie
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
M	Mol/Liter
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (messenger-Ribonukleinsäure)
NC2	<u>N</u> egativer <u>C</u> ofaktor <u>2</u>
NCBI	<u>N</u> ational <u>C</u> enter for <u>B</u> io <u>t</u> echnology <u>I</u> nformation
ng	Nanogramm
NP-40	Nonidet P-40
nt	Nukleotid(e)
NTP	Ribonukleosid-5'-triphosphat
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
ORF	offener Leserahmen
<sup>32</sup> P	Phosphor 32
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung ( <u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pmol	Pikomol
RNA Pol II	RNA-Polymerase II
RNA	Ribonukleinsäure
RNase A	Ribonuklease A
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per <u>m</u> inute)
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
<sup>35</sup> S	Schwefel 35
<i>S. cerevisia</i>	Bäckerhefe ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )
SDS	Natriumlaurylsulfat
snRNA	Kleine kernlokalisierte RNA ( <u>s</u> mall <u>n</u> uclear RNA)
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
SV40	simian virus 40

Tab.	Tabelle
TAF <sub>II</sub>	TBP-assoziierter Faktor der Klasse II Transkription
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBP	TATA-Box-bindendes Protein
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TGE	Tris-Glycin-EDTA-Puffer
T <sub>m</sub>	minimale Schmelztemperatur
TPCK	N-Tosyl-L-Phenylalanin-chlormethyl-Keton
Tris	Trishydroxymethyl-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Enzymeinheit(en) ( <u>units</u> )
UAS	<u>u</u> pstream <u>a</u> ctivating <u>s</u> equences
ÜN	Über Nacht
USA	<u>u</u> pstream <u>s</u> timulatory <u>a</u> ctivities
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenanteil einer Flüssigkeit in einer Lösung ( <u>v</u> olume per <u>v</u> olume)
XC	Xylencyanol
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
YPD	<u>Y</u> east extract- <u>P</u> epton- <u>D</u> extrose



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
	<b>1.1. Promotoren und Promotorstrukturen.....</b>	<b>1</b>
	<b>1.2. Eukaryontische Polymerasen.....</b>	<b>2</b>
	1.2.1. Überblick.....	2
	1.2.2. Die carboxyl-terminale Domäne der größten Untereinheit von RNA-Pol II.....	3
	1.2.3. RNA-Polymerase Holoenzym.....	4
	<b>1.3. Die Bildung des Präinitiationskomplexes.....</b>	<b>5</b>
	<b>1.4. Das TATA-bindene Protein (TBP) und die TBP-assoziiierenden Faktoren (TAFs).....</b>	<b>7</b>
	<b>1.5. Histone in der Transkriptionsregulation.....</b>	<b>8</b>
	<b>1.6. Repression der Transkription.....</b>	<b>9</b>
	1.6.1. Mot1.....	10
	1.6.2. Der Not-Komplex.....	10
	1.6.3. Der basale Repressor NC2.....	11
	<b>1.7. Aufgabenstellung.....</b>	<b>13</b>
<b>2.</b>	<b>Material.....</b>	<b>14</b>
	<b>2.1. Geräte.....</b>	<b>14</b>
	<b>2.2. Chemikalien und Biochemikalien.....</b>	<b>15</b>
	<b>2.3. Radiochemikalien.....</b>	<b>18</b>
	<b>2.4. Enzyme.....</b>	<b>18</b>
	<b>2.5. Antikörper.....</b>	<b>18</b>
	<b>2.6. Lösungen, Puffer und Kulturmedien.....</b>	<b>19</b>
	2.6.1. Lösungen und Puffer.....	19
	2.6.2. Kulturmedien.....	19
	<b>2.7. Molekularbiologische Hilfsmittel.....</b>	<b>21</b>
	<b>2.8. Baktrienstämme.....</b>	<b>21</b>
	<b>2.9. Hefestämme.....</b>	<b>22</b>
	<b>2.10. DNA- und Protein-Größenstandards.....</b>	<b>22</b>
	2.10.1. DNA-Größenstandards.....	22
	2.10.2. Protein-Größenstandards.....	23
	<b>2.11. Plasmide.....</b>	<b>24</b>
	<b>2.12. Oligodeoxyribonukleotide.....</b>	<b>25</b>
<b>3.</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>27</b>
	<b>3.1. Kultivierung von Bakterien.....</b>	<b>27</b>
	3.1.1. Anzucht von Bakterienkulturen.....	27
	3.1.2. Anlegen von Dauerkulturen.....	27
	<b>3.2. Kultivierung höherer eukaryontischen Zellen.....</b>	<b>27</b>
	3.2.1. Zellenvermehrung in Suspension.....	28
	3.2.2. Anlegen von Dauerkulturen.....	28
	<b>3.3. Hefekulturen.....</b>	<b>28</b>
	3.3.1. Anzucht auf Agarplatten.....	28
	3.3.2. Vermehrung in Flüssigkultur.....	29
	3.3.3. Stammhaltung.....	29
	<b>3.4. DNA- und RNA-Arbeitstechniken.....</b>	<b>29</b>
	3.4.1. Bestimmung der Konzentration und Reinheit einer Nukleinsäure-Präparation.....	29
	3.4.2. Chloropane-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren.....	29
	3.4.3. Reinigung von DNA über Gelfiltration.....	30
	3.4.4. Reinigung von DNA über DE52-Säulen.....	31
	3.4.5. Minipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	31
	3.4.6. Amplifikation von DNA mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	32
	3.4.7. Restriktionshydrolyse von DNA.....	33
	3.4.8. Agarose-Gelelektrophorese.....	33
	3.4.9. Elution von DNA aus Agarosegelen.....	34

3.4.10.	Reinigung synthetischer Oligodeoxyribonukleotide.....	35
3.4.11.	Radioaktive Markierung von Oligodeoxyribonukleotiden am 5'-Ende.....	35
3.4.12.	Dephosphorylierung von DNA.....	36
3.4.13.	Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden.....	36
3.4.14.	Ligation von DNA.....	37
3.4.15.	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> .....	37
3.4.16.	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> .....	38
3.4.17.	Klonierung von verschiedenen NC2-Derivaten.....	38
3.4.17.1.	Klonierung von NC2-Deletionsmutanten.....	38
3.4.17.2.	Klonierung von NC2-Punktmutanten.....	39
3.4.18.	DNA-Sequenzierung.....	41
3.4.18.1.	DNA-Sequenzierung nach dem Dideoxy-Kettenabbruchverfahren.....	41
3.4.18.2.	(A+G)-Sequenzreaktion nach Maxam-Gilbert-Prozedure.....	42
3.4.18.3.	Anfertigung eines Sequenzgels und Durchführung der Gelelektrophorese.....	43
<b>3.5.</b>	<b>Protein-Arbeitstechniken.....</b>	<b>44</b>
3.5.1.	Konzentrationsbestimmung.....	44
3.5.2.	SDS-Gelelektrophorese.....	44
3.5.3.	Färbemethoden für Proteine.....	45
3.5.3.1.	Coomassie-Färbung.....	45
3.5.3.2.	Silberfärbung.....	46
3.5.4.	Herstellung von Zellkernextrakten aus HeLa-Zellen.....	46
3.5.5.	Heterologe Expression von Proteinen in <i>E. coli</i> .....	47
3.5.6.	Säulenchromatographie.....	50
3.5.6.1.	Phosphocellulose-Chromatographie.....	51
3.5.6.2.	DEAE-Cellulose (DE52)-Chromatographie.....	52
3.5.6.3.	Sepharose-Ionenaustauscher.....	52
3.5.6.4.	Gelfiltration.....	53
3.5.6.5.	Ni <sup>2+</sup> -NTA-Affinitätschromatographie.....	53
3.5.6.6.	Heparin-Sepharose-Chromatographie.....	54
3.5.6.7.	Immunopräzipitation.....	54
<b>3.6.</b>	<b>Immunochemische Arbeitstechniken.....</b>	<b>55</b>
3.6.1.	Western-Blot Analyse.....	55
<b>3.7.</b>	<b>Funktionelle Analysen.....</b>	<b>56</b>
3.7.1.	Gelretardationsanalyse (EMSA) .....	56
3.7.2.	DNase I-Footprinting Analyse.....	58
3.7.3.	Im Gel Footprinting Analyse mit 1, 10-Phenantrolin-Kupfer Ion kombiniert mit Gel-Retardationsanalyse.....	58
3.7.4.	<i>In vitro</i> -Transkription in einem rekonstituierten RNA-Polymerase II-System.....	60
<b>3.8.</b>	<b>DNA-Arbeitstechniken in Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....</b>	<b>62</b>
3.8.1.	Transformation von Plasmid-DNA in die Hefen.....	62
3.8.1.1.	Transformation mit Lithiumacetat.....	62
3.8.1.2.	Hoch-effiziente Transformationsmethode.....	63
3.8.1.3.	Carrier-DNA.....	63
3.8.2.	DNA-Isolierung aus Hefen.....	64
3.8.2.1.	Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen.....	64
3.8.2.2.	Isolierung genomischer DNA aus Hefen.....	65
<b>3.9.</b>	<b>Genetische Methoden zur Charakterisierung von Hefezellen.....</b>	<b>65</b>
3.9.1.	Kreuzung haploider Hefezellen.....	65
3.9.2.	Sporulation diploider Hefezellen.....	66
3.9.3.	Sporenfreisetzung und Tetraden-Analyse.....	66
3.9.4.	Paarungstypsbestimmung.....	67
3.9.5.	Suppressor-"Screen" zum Suchen von funktionell relevanten Faktoren in Hefe.....	67
3.9.6.	Temperatursensitivitätsbestimmung.....	68
3.9.7.	Tropftiterest.....	68
<b>3.10.</b>	<b>Proteinextraktion aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....</b>	<b>69</b>
3.10.1.	Aufschluß mit Zymolyase.....	69
3.10.2.	Mechanischer Aufschluß mit der Schwingmühle.....	69
<b>3.11.</b>	<b>Computeranalysen.....</b>	<b>70</b>

<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>71</b>
<b>4.1.</b>	<b>Vergleich von NC2 aus Mensch und Hefe.....</b>	<b>71</b>
<b>4.2.</b>	<b>Funktionelle Analyse der humanen NC2-Untereinheiten in Hefe.....</b>	<b>73</b>
4.2.1.	Einführung des humanen NC2 in Hefe durch Plasmid-Austausch.....	73
4.2.2.	Komplementation der essentiellen $\gamma$ NC2-Gene durch ihre humane Homologen.....	75
4.2.3.	Eingrenzung der funktionellen Domänen der humanen NC2-Proteine in Hefe.....	77
<b>4.3.</b>	<b>Die Funktion der hNC2 in Hefe ist Konzentrationsabhängig.....</b>	<b>79</b>
<b>4.4.</b>	<b>Isolierung eines Suppressors von niedriger NC2b-Konzentration.....</b>	<b>80</b>
4.4.1.	Suppressor-Selektion von NC2 $\beta$ -Defizienz.....	80
4.4.2.	Isolierung einer Temperatur-sensitiven Mutante.....	81
<b>4.5.</b>	<b>Genetische Charakterisierung des Temperatur-sensitiven Suppressor von NC2b.....</b>	<b>82</b>
4.5.1.	Der NC2 $\beta$ -Suppressor hat eine Punktmutation in Genom.....	82
4.5.2.	Die Punktmutation des Suppressor-Stammes lokalisiert in Toa1.....	84
4.5.3.	Die Suppressormutation ersetzt die NC2 $\beta$ -Funktion <i>in vivo</i> .....	85
4.5.4.	Die Suppressormutation ersetzt gleichzeitig NC2 $\alpha$ und NC2 $\beta$ in Hefe.....	86
<b>4.6.</b>	<b>Die Punktmutation des Suppressors liegt auf der Dimerisierungsoberfläche von <math>\gamma</math>TFIIA.....</b>	<b>87</b>
<b>4.7.</b>	<b>Biochemische Charakterisierung der Toa1-Suppressormutante.....</b>	<b>89</b>
4.7.1.	Die Toa1-Suppressormutante dimerisiert mit Toa2.....	89
4.7.2.	Die Toa1-Mutante weist Defekte in der TBP-DNA Komplexbildung vor.....	91
4.7.3.	Die Suppressor-Mutante unterstützt die TBP-Bindung an die TATA-Box.....	94
4.7.4.	Die Toa1-Mutante ist defekt in der Anti-Repressionsfunktion in der Transkription.....	98
<b>4.8.</b>	<b>Gezielte Mutagenese von hNC2 und Analyse <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>.....</b>	<b>101</b>
4.8.1.	Konstruktion von Punktmutanten in NC2 $\alpha$ und NC2 $\beta$ .....	101
4.8.2.	Untersuchung der NC2-Punktmutanten in Hefe.....	106
4.8.3.	<i>In vitro</i> -Charakterisierung der NC2-Mutanten.....	107
4.8.3.1.	Analyse der NC2-Punktmutanten in der Transkription.....	107
4.8.3.2.	Analyse der NC2-Mutanten in TBP- und DNA-Bindungsexperimenten.....	109
4.8.4.	Funktionelle Untersuchung der NC2 $\beta$ -Mutante S52R.....	112
4.8.4.1.	Untersuchung der $\beta$ S52R-Mutante im Struktur-Modell für NC2.....	112
4.8.4.2.	Analyse der Mutante $\beta$ S52R in der Komplexbildung auf DNA.....	114
4.8.4.3.	Analyse der NC2 $\beta$ -Mutante S52R in Immunopräzipitation.....	115
4.8.4.4.	Einfluß der DNA-Bindung auf die Komplexbildung von NC2-Mutante $\beta$ S52R mit TBP.....	116
4.8.4.5.	Einfluß der $\beta$ S52R-Mutation auf die Konkurrenz zwischen NC2 und TFIIA auf Promotor.....	117
4.8.4.6.	DNase I Footprinting-Analyse der NC2-Mutante $\beta$ S52R.....	118
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>121</b>
<b>5.1.</b>	<b>Funktionelles Gegenspiel zwischen TFIIA und NC2.....</b>	<b>121</b>
5.1.1.	Molekularer Mechanismus von NC2.....	121
5.1.2.	Interaktionen zwischen NC2, TFIIA und TBP.....	123
5.1.3.	Rolle des TFIIA in der Transkriptionsregulation.....	125
<b>5.2.</b>	<b>Biochemische Eigenschaften der Suppressor-Mutante.....</b>	<b>127</b>
<b>5.3.</b>	<b>Molekulare Ursache der Suppressormutante.....</b>	<b>128</b>
<b>5.4.</b>	<b>Analyse der Suppressor-Mutante in der <i>in vitro</i>-Transkription.....</b>	<b>129</b>
<b>5.5.</b>	<b>Konsequenzen der NC2-Bindung an TBP auf Promotor.....</b>	<b>130</b>
<b>5.6.</b>	<b>Funktionsanalyse von humanem NC2 in Hefe.....</b>	<b>132</b>
5.6.1.	Austauschbarkeit zwischen NC2-Untereinheiten aus Mensch und Hefe.....	132
5.6.2.	Funktionsdomänen von humanem NC2.....	133
<b>5.7.</b>	<b>Mutagenese-Studien des NC2 <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>.....</b>	<b>135</b>
<b>5.8.</b>	<b>Physiologische Rolle von NC2.....</b>	<b>137</b>
<b>5.9.</b>	<b>Ausblicke.....</b>	<b>139</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>140</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>142</b>



# 1. Einleitung

---

Die Erbinformationen einer Zelle ist in den langen DNA-Strängen gespeichert. Alle Zellen eines Organismus verfügen praktisch über die gleiche genomische Ausstattung. Sie differenzieren sich aber zu unterschiedlichen gewebespezifische Zellen, manche zu Neuronen, während die anderen zu Blutzellen werden. Entscheidend dafür ist, welche Gene zu welchem Zeitpunkt gezielt an- oder abgeschaltet werden. Reguliert wird auf der Ebene des RNA-Transportes, der RNA-Prozessierung, der Translation und vor allem auf der Transkriptionsebene. Die Regulation der Transkription von Proteincodierenden Genen findet hauptsächlich während der Transkriptionsinitiation und in der frühen Phase der Elongation statt. Verantwortlich dafür sind außer der RNA-Polymerase selbst, die generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs), TFIIA, -B, -D, -E, -F und -H, der Mediator-Komplex bestehend aus 20 Untereinheiten, verschiedene Elongationsfaktoren und ein breites Spektrum von Gen-spezifischen Regulatorproteinen. Diese Vielfalt und enorme Komplexizität erlaubt eine präzise Regulation der Transkription von 10, 000 Genen gleichzeitig in höheren Organismen.

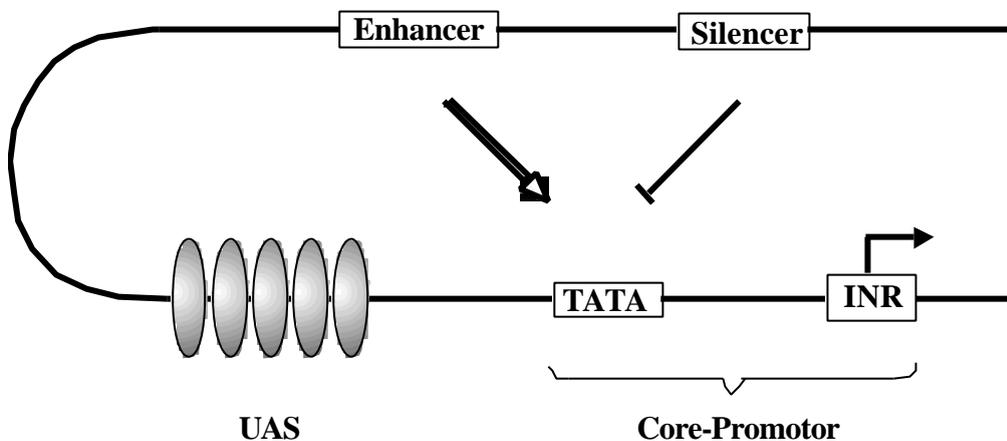
Bei der Fraktionierung humaner Kernextrakte für funktionelle Analysen im zellfreien System (*in vitro*) wurden eine weitere Gruppe von Proteinen, die sogenannten Cofaktoren entdeckt. Sie dienen als Vermittler zwischen den regulatorischen Proteinen und der basalen Transkriptionsmaschinerie, die aus Polymerase und GTFs besteht. Diese Informationsvermittlung führt letztendlich zur Aktivierung oder Repression der Transkription. Ziel dieser Arbeit war es einen negativ wirkenden Cofaktor, den Repressor NC2, *in vivo* und *in vitro* zu charakterisieren.

## 1.1. Promotoren und Promotorstrukturen

Eukaryontische Promotoren lassen sich in Promotor-Core-Elemente und regulatorische Elemente unterteilen. Core-Promotoren enthalten Kombinationen aus einer TATA-Box, lokalisiert zwischen den Positionen -30 bis -25, und einer Pyrimidin-reichen Initiator-Region um den Transkriptionsstartpunkt (+1, Abb. 1). Diese Elemente werden minimal benötigt, um eine punktgenaue Transkriptionsinitiation in einem zellfreien System zu gewährleisten. An denen assembliert der sogenannte Präinitiationskomplex (PIC) (Übersichtsartikel: Novia and Roy, 1996).

Ein drittes Core-Element ist das "*downstream Promotor Element*" (DPE), welches meist in *Drosophila* beschrieben wurde. Das DPE liegt etwa stromabwärts von dem Transkriptionsstartpunkt (+30) (Burke and Kadonaga, 1996). Das DPE bildet sich bei Promotoren ohne TATA-Box mit dem Initiator zu einem Bindungsmotiv für TFIID. Unmittelbar stromaufwärts des Core-Promotors befinden sich das proximale Promotor Element, manchmal auch "*upstream*

*activating sequences*" (UAS) genannt. Die UAS beinhalten Erkennungssequenzen für Gen-spezifische Transaktivatoren. In größerer Entfernung zum Core-Promotor liegen häufig distale Promotor-Elemente. Dazu zählen Enhancer, welche die Transkription aktivieren und Silencer, welche die Transkription inhibieren. Die Wirkung der distalen Promotor-Elemente auf die Transkription ist unabhängig von ihrer Orientierung in gewissen Grenzen auch von der Entfernung zum Transkriptionsstartpunkt (Banerji *et al.*, 1981; Moreau *et al.*, 1981). Zumeist werden diese Elemente durch hochorganisierte Strukturen bestehend aus mehreren Transkriptionsfaktoren erkannt. Für die Kommunikation mit Promotoren werden häufig auch Brückenproteine benötigt, die eine Steuerung des Promotors über eine Distanz von unter Umständen mehreren tausend Basenpaaren ermöglichen.



**Abb. 1:** Promotor-Elemente eines typischen Klasse II-Gens. Der Transkriptionsstartpunkt der RNA-Polymerase II ist durch einen Pfeil markiert. Die TATA-Box (TATA), das Initiator-Element (INR), die "upstream activating sequences", UAS, und die *distalen Promotor Elemente* Enhancer bzw. Silencer sind symbolisch dargestellt.

## 1.2. Eukaryontische Polymerasen

### 1.2.1. Überblick

Das bakterielle RNA-Polymerase-Core-Enzym besteht aus vier Untereinheiten  $\alpha_2\beta\beta'$ . Diese können die RNA-Synthese katalysieren, sind aber alleine nicht in der Lage die Transkription in einer Promotor-abhängigen Art zu initiieren. Hierfür werden  $\sigma$  Faktoren benötigt, die in Abwesenheit von DNA mit dem Core-Enzym assoziieren und das sogenannte Holoenzym ( $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ ) bilden. Im Gegensatz zum Core-Enzym ist das Holoenzym in der Lage eine akkurate Transkriptionsinitiation am Promotor zu gewährleisten.

Im Gegensatz zu Prokaryonten, die eine einzige RNA-Polymerase besitzen, existieren in eukaryontischen Zellen drei verschiedene RNA-Polymerasen, die RNA-Polymerase I, -II und

-III. Entsprechend lassen sich auch die Gene in drei Klassen unterteilen. Die RNA-Polymerase II (Pol II) ist für die Synthese aller Boten-RNAs (mRNA) und einiger kleinen Kern-RNAs (snRNA) verantwortlich. RNA-Polymerase I und -III synthetisieren die ribosomalen rRNAs, die Transfer-RNAs (tRNA) und die kleinste ribosomale RNA (5S-rRNA) (Tabelle I).

Typ	Lokalisation	Zelluläre Transkripte	Wirkung von $\alpha$ -Amanitin
Pol I	Nukleoli	18S-, 5,8S- und 28S-rRNA	unempfindlich
Pol II	Nukleoplasma	mRNA-Vorläufer, snRNA	stark hemmend
Pol III	Nukleoplasma	tRNA, 5S-rRNA, snRNA	Hemmung bei hoher Konzentration

**Tab. I** Eukaryontische RNA-Polymerasen. mRNA: messenger RNA; rRNA: ribosomale RNA; tRNA: Transfer RNA; snRNA: *small nuclear* RNA. Die drei RNA-Polymerasen lassen sich durch ihre Empfindlichkeit gegenüber den Pilzgift  $\alpha$ -Amanitin unterscheiden.

Die eukaryontische RNA-Pol II ist ein Multiprotein-Komplex aus 12 Untereinheiten, die von Hefe bis zum Mensch hochkonserviert sind (Young, 1991; Woychik and Young 1993, 1994; Cramer *et al.*, 2000). Sie besitzt zwei große Untereinheiten, genannt Rpd1 und Rpd2, die den katalytischen  $\beta$ - und  $\beta'$ -Untereinheiten der bakteriellen Polymerase ähneln. Die Untereinheit Rpb3 hat dagegen, ähnlich wie die  $\alpha$ -Untereinheit der bakteriellen RNA-Polymerase, strukturerhaltende Funktion (Woychik and Young, 1994).

### 1.2.2. Die carboxyl-terminale Domäne der größten Untereinheit von RNA-Pol II

Die Carboxyl-terminale Domäne (CTD) der größten Untereinheit (Rpb1) der Pol II besteht aus einer sich mehrfach wiederholenden Abfolge von sieben Aminosäuren (Heptapeptid). Eine ähnliche Struktur fehlt der bakteriellen RNA-Polymerase wie auch in der eukaryontischen RNA-Polymerase I und -III Komplexe. Die Sequenz des Heptapeptids Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser ist innerhalb des eukaryontischen Reiches hochkonserviert (Übersichtsartikel: Corden, 1990; Young, 1991). Lediglich die Anzahl der Repetitionen variiert von Organismus zu Organismus. So hat Hefe 27 und Säuger bis zu 50 solcher Motive. Entfernt man Teile oder die gesamte Repetition sind die Zellen nicht mehr lebensfähig (Nonet *et al.*, 1987; Allison *et al.*, 1988; Bartolomei *et al.*, 1988; Zehring *et al.*, 1988).

In eukaryontischen Zellen liegt die Pol II hauptsächlich in zwei Formen vor: ein mit unmodifizierter oder hypophosphorylierter CTD und ein mit hyperphosphorylierter CTD (Dahmus, 1996a; Kolodziej *et al.*, 1990). Die Phosphorylierung der CTD findet vor und nach der Transkriptionsinitiation statt (Übersichtsartikel: Dahmus 1996b; Hengartner *et al.*, 1995, 1998). Prominente Beispiele für CTD-Kinasen sind der generelle Transkriptionsfaktor TFIIF, das Cyclin-

Kinase-Paar Cdk8-Cyclin C (Srb10-Srb11) (Liao *et al.*, 1995) und der Elongationsfaktor p-TEFb (Marshall *et al.*, 1996). Der Phosphorylierungsgrad der CTD spielt eine wichtige Rolle in der Polymerase-Funktion. Untersuchungen haben gezeigt, daß eine Phosphorylierung der CTD vor der Transkriptionsinitiation die Polymerase inhibiert, während die Elongation von vielen Genen eine phosphorylierte CTD erfordert (Hengartner *et al.*, 1998; Lee and Lis, 1998).

Die Deletion von 8 bis 10 Repetitionen des CTD generiert einen kältesensitiven Phänotyp in der Hefe. Dieser Phänotyp wurde verwendet um Suppressoren außerhalb des Rpb1-Gens zu identifizieren. So wurden eine Reihe von Suppressoren der RNA-Polymerase B (SRBs) isoliert, die mit RNA-Polymerase II komplexiert vorliegen und zusammen mit generellen Faktoren ein Holoenzym bilden (Bjorklund and Kim, 1996; Li *et al.*, 1996).

### **1.2.3. RNA-Polymerase Holoenzym**

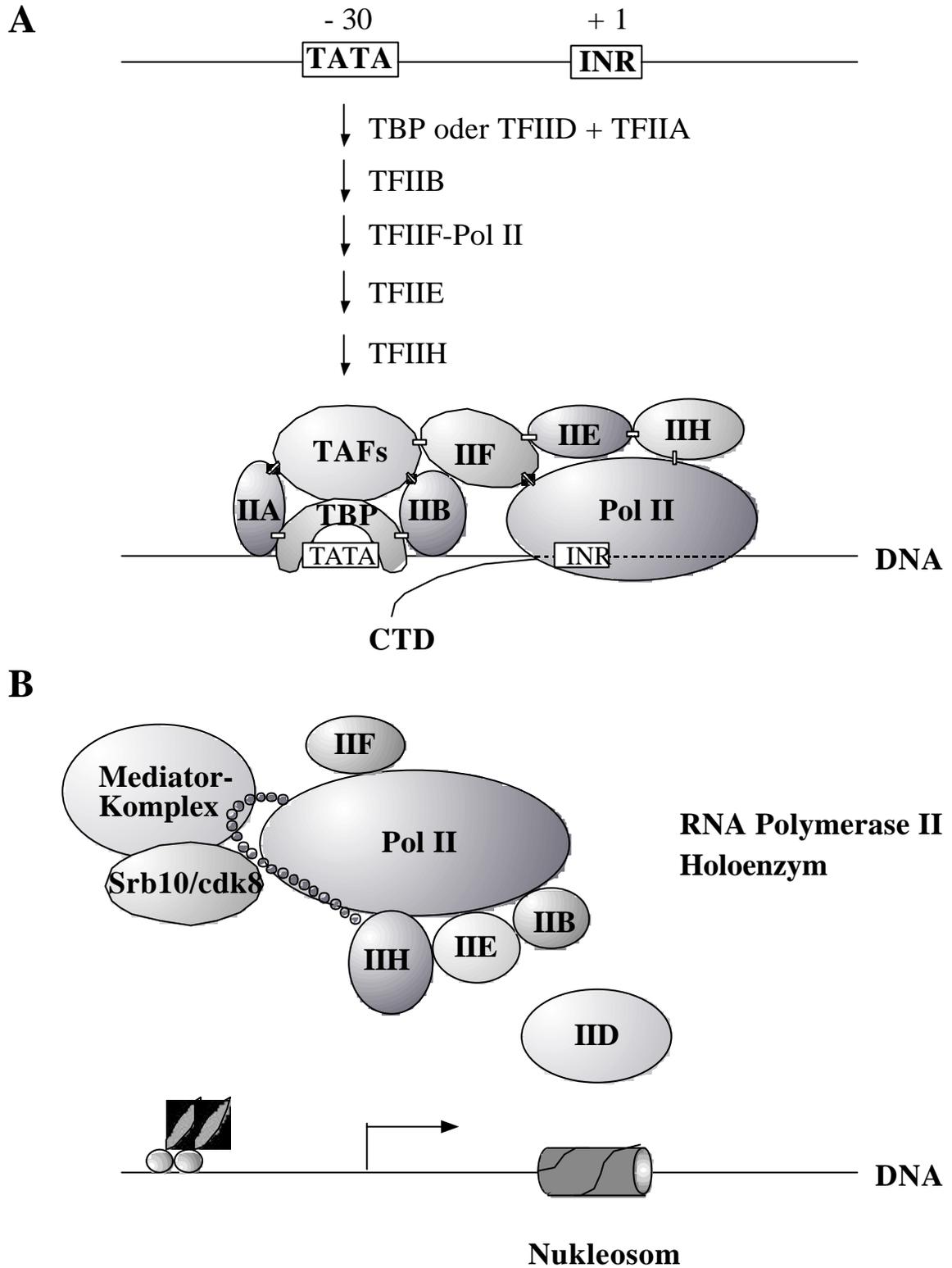
Für die Bildung des Transkriptionskomplexes gibt es unterschiedliche Modelle. In einem schrittweisen Assoziationsmodell binden Pol II und die generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs) in einer definierten Abfolge an den Promotor und bilden den Präinitiationskomplex (PIC) aus (Van *et al.*, 1988; Maldonado *et al.*, 1990; Übersichtsartikel: Roeder, 1996; Abb. 2A).

Ein alternatives Modell beruht auf biochemischen und genetischen Studien in Hefe *S. cerevisiae*. So liegen einige GTFs in Abwesenheit von DNA mit Pol II, SRB-Proteinen und Mediator-Komplex assoziiert vor (Koleske and Young, 1994, 1995; Björklund and Kim, 1996; Orphanides *et al.*, 1996; Malik and Roeder, 2000). Wenn auch die genaue Zusammensetzung des Pol II-Holoenzym noch diskutiert wird, so wurde auch ein Holoenzym in Säugerzellen beschrieben (Chao *et al.*, 1996; Maldonado *et al.*, 1996; Übersichtsartikel: Parvin and Young, 1998; Abb. 2B).

### 1.3. Die Bildung des Präinitiationskomplexes

Die eukaryontische Pol II benötigt zur Initiation der Transkription noch die generelle Transkriptionsfaktoren (GTFs), TFIIA, -IIB, -IID, -IIE, -IIF und -IIH (Übersichtsartikel: Zawel and Reinberg, 1995; Orphanides *et al.*, 1996; Roeder, 1996). In dem schrittweisen Assoziationsmodell bindet im ersten Schritt der TFIID-Komplex zusammen mit TFIIA an die TATA-Box. Die DNA-bindende Untereinheit von TFIID, TBP, induziert eine Verbiegung am Promotor wodurch sich die stromaufwärts und -abwärts gelegenen Bereiche näher kommen (Burley and Roeder, 1996). Die Röntgenstruktur-Analyse weist darauf hin, daß die hochkonservierte C-terminale Domäne von TBP eine pseudosymmetrische sattelförmige Struktur mit einer großen konvexen Oberfläche ausbildet. Antiparallel angeordnete  $\beta$ -Faltblättern bilden den Kontakt mit DNA. Zwei  $\alpha$ -Helices, die sich auf der konkaven Oberfläche befinden, liefern eine Oberfläche für andere Proteinkontakte (Kim *et al.*, 1993; Nikolov and Burley, 1994; Nikolov *et al.*, 1995; Geiger *et al.*, 1996). Die Bindung von TBP knickt die DNA um ca.  $90^\circ$  (Horikoshi *et al.*, 1992) während die Assoziation von TFIIA und TFIIB keine weiteren Konformationsänderungen der DNA induziert (Geiger *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 1996).

TFIIA beschleunigt und verstärkt die Bindung von TFIID an die DNA. TFIIB bindet den Promotor asymmetrisch. Diese wird durch direkte Interaktion mit TBP und durch Sequenz-spezifische Kontakte in der großen Furche stromaufwärts und in der kleinen Furche stromabwärts der TATA-Box bewirkt. Dadurch wird die Orientierung des PIC festgelegt (Lagrange *et al.*, 1996, 1998; Tsai and Sigler, 2000). Nach einer Assoziation der Pol II zusammen mit TFIIF, entsteht ein geschlossener Präinitiationskomplex. TFIIE und TFIIH tragen zur Öffnung des Promotors bei (Übersichtsartikel: Buratowski *et al.*, 1989; Orphanides *et al.*, 1996; Roeder, 1996).



**Abb. 2:** Modelle zur Initiation der Pol II Transkription. **(A)** Schrittweise Assoziation der GTFs zur Bildung des Präinitiationskomplexes (nach Roeder, 1996). Ein minimaler Promotor mit TATA-Box ist schematisch dargestellt. Position der TATA-Box und des Initiator-Elements überlappend mit dem Transkriptionstartpunkt (+1) sind angegeben. Die kleinen weißen Balken stehen für Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen den basalen Transkriptionsfaktoren. CTD steht für die C-terminale Domäne der Pol II. **(B)** Initiation des Pol II-Holoenzym (Orphanides *et al.*, 1998). Es umfaßt Multiprotein-Komplexe wie Pol II Core-Enzym (12 Untereinheiten), Mediator-Komplex, SRB10/Cdk8-Kinase-Komplex (4 Untereinheiten) und die generellen Transkriptionsfaktor TFIIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIIF und TFIIH.

#### 1.4. Das TATA-bindene Protein (TBP) und die TBP-assoziierenden Faktoren (TAFs)

Das TATA-bindende Protein, TBP, spielt eine Schlüssel-Rolle in der Initiation aller drei eukaryontischer RNA-Polymerasen (Übersichtsartikel: Hernandez, 1993; Hampsey, 1998). So dient TBP als universelle Komponente in SL1-Komplex der Pol I, in TFIID auf Klasse II-Genen und in TFIIB auf Pol III-Genen. TBP ist von der Hefe bis zum Mensch hochkonserviert. Insbesondere ist die carboxyl-terminale Region von TBP, welche aus zwei sich direkt wiederholenden Domänen besteht, die durch eine kurze basische Sequenz getrennt sind. Im Gegensatz zu vielen DNA-bindenden Proteinen, bindet TBP in der kleinen Furche der DNA. Die TFIID-Bindung an den Promotor ist wahrscheinlich der Geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Transkriptionsinitiation (Klein and Struhl, 1994; Kobayashi *et al.*, 1995). Verschiedene molekulare Modelle werden diskutiert. In einem Modell erfolgt die Komplex-Formation zwischen TBP und TATA-Element in zwei Schritten. Nach einer langsamen TBP-TATA-Assoziation folgt eine rasche Konformationsänderung zur Bildung stabiler Komplexe (Hoopes *et al.*, 1992). Es gibt auch Hinweise darauf, daß TBP mit sich selbst dimerisiert und die Dissoziation dieses TBP-TBP Dimers der Geschwindigkeitslimitierende Schritt in der TBP-Promotor-Erkennung ist. Die langsame Dissoziation des TBP-Dimers kann direkt durch TFIIA beschleunigt werden (Coleman *et al.*, 1999).

*In vivo* ist TBP mit verschiedenen Proteinen den sogenannten TAFs (TBP assoziierte Faktoren) komplexiert. TBP allein bindet an die TATA-Box und erlaubt die Anlagerung anderer GTFs und der Polymerase an den Promotor. Es gibt aber keinen Beweis für freie TBP in der Zelle und Transkriptionsaktivierung ist abhängig vom Multiprotein-Komplex TFIID (Meisterernst *et al.*, 1990; Pugh and Tjian, 1990; Dynlacht *et al.*, 1991; Übersichtsartikel: Albright and Tjian, 2000). TAF<sub>II</sub>s sind als Zielproteine für eine Vielzahl von Transaktivatoren beschrieben worden (Übersichtsartikel: Sauer and Tjian, 1997; Albright and Tjian, 2000). So wurden Wechselwirkungen zwischen der Glutamin-reichen Aktivierungsdomäne von Sp1 mit *Drosophila* TAF<sub>II</sub>110 (dTAF<sub>II</sub>); der Prolin-reichen Aktivierungsdomäne von CTF mit humanem TAF<sub>II</sub>55 (hTAF<sub>II</sub>) und der sauren Aktivierungsdomäne von VP16 bzw. p53 mit dTAF<sub>II</sub>40 und dTAF<sub>II</sub>60 beobachtet (Übersichtsartikel: Verrijzer and Tjian, 1996). TAF<sub>II</sub>s sind auch direkt an der Promotor-Orientierung beteiligt. Spezifische TAFs sind z.B. für eine Erkennung der Initiator-Sequenz und des *downstream promoter element*s, DPE bei TATA-losen Promotoren verantwortlich (Martinez *et al.*, 1994; Verrijzer *et al.*, 1994).

Einige TAF<sub>II</sub>s wurden auch in Histon-Acetyltransferase-Komplexen (HAT-Komplex) identifiziert (Grant *et al.*, 1998a; Ogryzko *et al.*, 1998). Beispiele sind der SAGA-Komplex aus Hefe und der humane P/CAF-Komplex, welche Genexpression vermutlich durch Modifikation der Chromatin-Struktur über ihre HAT-Aktivität reguliert (siehe auch 1.5). Diese Beobachtung brachte die Erkenntnis, daß TAFs über potentielle Funktionen außerhalb des TFIID-Komplexes verfügen.

## 1.5. Histone in der Transkriptionsregulation

Das Genom der Eukaryonten ist in einer kompakten Struktur verpackt, die als Chromatin bezeichnet wird. Der Grundbaustein des Chromatins ist das Nukleosom (Arents *et al.*, 1991; Luger *et al.*, 1997). Das Nukleosom besteht aus einem Oktamer, in dem die Histone H3, H4, H2A und H2B jeweils zweifach vorliegen. Um das Nukleosom können etwa 146 bp DNA zweimal herumgewunden wird. Nukleosomen sitzen wie Perlen auf der DNA, und sind durch freie DNA-Stücke ("linker"-DNA) verbunden. Das Histon H1 Molekül bindet von außen an die um das Oktamer gewickelte DNA und führt so zu einer linkshändigen Spiralisierung des Chromatins und zur Bildung von Fasern mit einem Durchmesser von 30 nm.

Durch seine kompakte Struktur wirkt Chromatin zunächst inhibitorisch auf die Transkription. Enzyme, die Histone modifizieren oder Nukleosomen verschieben ändern die Struktur des Chromatins in einer regulierten Prozess (Übersichtsartikel: Tsukiyama and Wu, 1995; Grunstein, 1997; Wolffe and Guschin, 2000). Somit dienen die Nukleosomen nicht nur als Verpackungseinheiten des Erbmaterials, sondern sie spielen auch eine essentielle Rolle in der Transkriptionsregulation.

Jedes Histon ist in zwei Domänen organisiert, eine strukturierte sogenannte "Histone-Fold"-Domäne und eine unstrukturierte N-terminale Domäne. Die Nukleosom-Kerne sind aus den "Histone-Fold"-Domänen ausgebildet, während die N-Termini aus dem Kern hinaus ragen. Letzte sind in transkriptionsaktiven Bereichen oft acetyliert. Als Histon-Acetyltransferasen (HATs) dienen z.B. der SAGA-Komplex aus Hefe (Grant *et al.*, 1997, 1998b), der humane P/CAF-Komplex (*P300/CBP associated factor*) (Yang *et al.*, 1996) bzw. der Transkriptionsfaktor P300/CBP selbst (Ogryzko *et al.*, 1996). Auch die größte Untereinheit des TFIID, TAF<sub>II</sub>250, enthält eine HAT-Aktivität (Mizzen *et al.*, 1996). Die Histon-Acetylierung bewirkt wahrscheinlich eine Lockerung der Nukleosomen-DNA-Bindung, möglicherweise innerhalb der "linker"-DNA (Bauer *et al.*, 1994; Krajewski and Becker, 1998). Es ist auch möglich, daß Acetylierung die übergeordnete Struktur der Nukleosomen beeinflusst. Für die Aktivierung der Transkription müssen Nukleosomen immer wieder verschoben werden. Dies bewerkstelligen andere Multiprotein-Komplexe, wie z.B. SWI/SNF, ISWI, NURF und CHRAC (sogenannte Chromatin-Remodeling Faktoren) (Übersichtsartikel: Wolffe and Guschi, 2000). Struktur und Position des Nukleosoms auf der DNA werden in einem ATP-abhängigen Prozeß verändert. Es wurde angenommen, daß die Chromatin-Remodeling Faktoren entweder die Assoziation von Histonen H2A und H2B innerhalb der Nukleosom-Kernpartikeln destabilisieren (Schnitzler *et al.*, 1998) oder durch ihre Topoisomerase II-Aktivität die superspiralisierte DNA relaxieren (Hamiche *et al.*, 1999; Längst *et al.*, 1999). Das Chromatin kann auch durch anderen Prozesse wie Phosphorylierung (Hendzel *et al.*, 1997; Wei *et al.*, 1999), Methylierung (Kass *et al.*, 1997a, b; Nan *et al.*, 1998) und Deacetylierung (Taunton *et al.*, 1996) modifiziert werden.

## 1.6. Repression der Transkription

Transkriptionsrepression spielt eine entscheidende Rolle in der Kontrolle der Genexpression in Prokaryonten. Vor etwa 40 Jahren erkannten Jacob und Monod, daß Bakterien ihre Genaktivität in erster Linie negativ regulieren (Jacob and Monod, 1961). Diese Repression erfolgt zumeist durch direkte Inhibition des Bindens der RNA-Polymerase während der Transkriptionsinitiation und -Elongation (Mishra and Chatterji, 1993; Eick *et al.*, 1994).

Bei Eukaryonten bildet das Chromatin die erste Barriere für die Genaktivierung. Im Laufe der Evolution haben sich in eukaryontischen Zellen Mechanismen entwickelt, um diese inhibitorische Funktion von Chromatin zu überwinden oder aufrechtzuerhalten. Außer dieser Repression durch die Chromatin-Struktur, kontrollieren Eukaryonten ihre Genexpression auch aktiv durch Transkriptionsrepressoren. Die Repressorproteine können ihre Zielgene entweder direkt durch Bindung an DNA-Sequenzen oder indirekt durch Interaktionen mit weiteren DNA-bindenden Proteinen erkennen (Übersichtsartikel: Hanna and Hansen, 1996; Maldonado *et al.*, 1999). So können sie (i) die Aktivierungsdomänen der Aktivatoren maskieren, (ii) kompetitiv den Zugang von Aktivatorproteinen oder den Komponenten der Transkriptionsmaschine zu DNA blockieren oder (iii) DNA-gebundene Aktivatoren von ihren Erkennungsstellen freisetzen (Übersichtsartikel: Johnson, 1995). Darüber hinaus können Repressoren auch an der Struktur des Chromatins direkt angreifen (Cooper *et al.*, 1994).

Die eukaryontischen Repressoren wie auch Aktivatoren bestehen entweder aus einem Polypeptid mit verschiedenen Funktionsdomänen oder einem Multiprotein-Komplex mit unterschiedlichen Funktionsuntereinheiten (Übersichtsartikel: Hanna and Hansen, 1996). Einige Repressor-Domänen wurden bereits charakterisiert. Beispiele sind die Alanin-reiche Domäne des *Drosophila* Zinkfinger-Proteins "Krüppel" (Licht *et al.*, 1994); die Prolin-reiche Region des Tumorsuppressor-Proteins WT1 (Madden *et al.*, 1993); die Glutamin- und Alanin (QA)-reiche Domäne der  $\beta$ -Untereinheit des negativen Corepressors 2 (NC2) (Inostroza *et al.*, 1992; Goppelt *et al.*, 1996) und des *Drosophila* Proteins "even-skipped" (Han and Manley, 1993).

Man kann generelle und Gen-spezifische Repressoren unterscheiden. Die generelle Repressoren beeinflussen die Transkription einer Reihe von Genen, die funktionell irrelevant sind. Sie wirken auf die Chromatine, inklusive der Histone und Histon-Deacetylasen oder auf die basale Faktoren der Transkriptionsmaschine.

Eine Klasse von generellen Repressoren kontrolliert die Transkription durch direkten Einfluß auf die Funktion des TATA-bindenden Proteins, TBP. Dazu zählen unter anderem der negative Cofaktor 2 (NC2), das Hefeprotein Mot1 sowie der Not-Komplex, welche aus mindestens 5 Komponenten zusammengesetzt ist.

### 1.6.1. Mot1

Mot1 wurde biochemisch und genetisch in Hefe identifiziert. Mot1 dissoziiert TBP von DNA in einem ATP-abhängigen Prozeß (Auble and Hahn, 1993), weshalb es auch ADI (ATP-dependent Inhibitor) bezeichnet wird. Mot1 kompetitiert mit TFIIA um die gleiche Bindungsfläche an TBP (Auble and Hahn, 1993). Der Wachstumsdefekt einer dominant negativen Mutation in Mot1 kann durch Überexpression von TBP oder TFIIA aufgehoben werden (Auble *et al.*, 1994). Genetische Untersuchungen in Hefe haben gezeigt, daß Mutationen im Mot1-Protein mit gleichzeitigen Mutationen in TFIIA bzw. Spt3 synthetisch letal sind (Madison and Winston, 1997). Spt3 ist ein Transkriptionsfaktor, der für die Pol II-abhängige Transkription benötigt wird. "Synthetische Letalität" bedeutet, daß nicht die einzelne Mutation innerhalb eines Proteins alleine, sondern die Kombination von Mutationen zweier Proteine gemeinsam zum Tod der Zellen führen.

Mot1 gehört zur Familie der Swi2/Snf2-ATPasen. Seine Funktion ist aber im Gegensatz zu den restlichen Mitgliedern, nicht durch DNA induzierbar (Auble *et al.*, 1997). Das humane Homolog von Mot1 wurde zuerst in einem Komplex mit TBP dem sogenannten B-TFIID-Komplex nachgewiesen (Timmers and Sharp, 1991). In Säugerzellen befindet sich der größte Anteil von TBP im B-TFIID-Komplex. Bisher konnte im Gegensatz zu TFIID keine Aktivator-abhängige Funktion von B-TFIID nachgewiesen werden (Timmers *et al.*, 1992).

*In vitro* führt eine Mutation im *MOT1*-Gen zur Reduktion der Transkription an TATA-losen Promotoren, z.B. des *HIS3*- und *HIS4*-Gens (Collart, 1996). Es wurde diskutiert, daß Mot1 zusammen mit TFIIA und Spt3 die Verteilung des TBP zwischen "Promotor"- und "Nicht-Promotor-DNA" (Muldrow *et al.*, 1999) oder zwischen TBP-Bindungsstellen mit hoher (wie TATA-haltiger Promotor) und mit niedriger Affinität (wie TATA-loser Promotor) kontrolliert. Mot1 ist wahrscheinlich verantwortlich für die TBP-Freisetzung von nichtfunktionellen TATA-Elementen während TFIIA und Spt3 die TBP-Assoziation zu funktionellen TATA-Boxen unterstützen (Madison and Winston, 1997).

### 1.6.2. Der Not-Komplex

Der *HIS3*-Promotor der Hefe enthält zwei funktionell unterschiedliche TATA-Elemente,  $T_C$  und  $T_R$ . Das  $T_C$  kontrolliert eine konstitutive *HIS3*-Expression, während das  $T_R$  für die Aktivierung durch den Transkriptionsaktivator Gcn4 benötigt wird.  $T_C$  ist ein Promotor-Element dem die klassische TATA-Sequenz fehlt, während das  $T_R$ -Element eine intakte TATA-Box enthält.

In einer genetischen Selektion für Mutanten, welche die *HIS3*-Expression in Anwesenheit einer *gcn4*-Mutation verstärkt, wurden die Gene *NOT1* bis *NOT5* isoliert. Sie stimulierten spezifisch die Transkription via dem  $T_C$ -Element des *HIS3*-Promotors (Collart and Struhl, 1993, 1994; Oberholzer and Collart, 1998).

Der Not-Komplex und das Mot1 zeigen gegenteilige Wirkung auf TATA-lose Promotoren. Während die Not-Mutanten die "TATA-lose" Transkription verstärkt, eine Mot1-Mutante reduziert sie (vgl. Kapitel 1.6.1). Ein Modell für die Funktion von Mot1, Spt3 und dem NOT-Komplex an

spezifischen Promotoren zeigt, daß an der Kontrolle der TBP-Verteilung in der Zelle neben Mot1 und Spt3 auch der Not-Komplex beteiligt ist, wobei er die Spt3-Aktivität negativ reguliert (Madison and Winston, 1997). Dies ist ein zusätzlicher Hinweis auf das Zusammenspiel von positiven und negativen Faktoren in der Transkriptionsregulation.

### 1.6.3. Der basale Repressor NC2

Der negative Cofaktor 2 (NC2 auch DR1-DRAP1 genannt) wurde ursprünglich aus menschlichen Kernextrakten von Tumorzellen isoliert, als eine Aktivität, die direkt an den basalen Initiationskomplex, spezifisch TBP, bindet und die Transkription der Klasse II-Gene reprimiert (Meisterernst *et al.*, 1991; Meisterernst and Roeder, 1991). Die Bindung von NC2 an TBP wirkt inhibitorisch auf die weitere Anlagerung von TFIIA und TFIIB an TBP. Es kommt zum Abbruch der Bildung des Präinitiationskomplexes (Goppelt *et al.*, 1996).

Der NC2-Komplex besteht aus zwei Untereinheiten, die als NC2 $\alpha$  und NC2 $\beta$  bezeichnet werden (Inostroza *et al.*, 1992; Goppelt *et al.*, 1996). Beide Untereinheiten sind für die Komplexbildung mit TBP und für die Transkriptionsrepression *in vitro* erforderlich (Goppelt *et al.*, 1996). NC2 ist evolutionär von Hefe über *C. elegans* bis zum Mensch konserviert. Hefe besitzt zwei stark homologe Proteine zum menschlichen NC2. *In vitro*-Untersuchungen haben gezeigt, daß die NC2-Untereinheiten vom Mensch und Hefe teilweise funktionell austauschbar sind (Goppelt and Meisterernst, 1991).

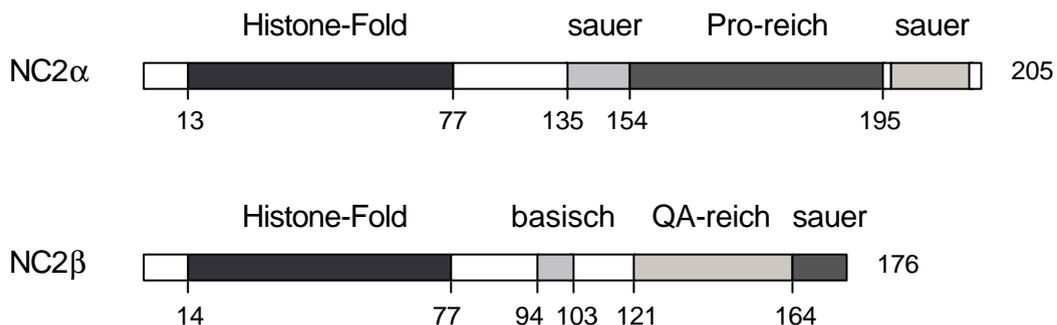
Beide NC2-Untereinheiten besitzen ein amino-terminales "Histone-Fold"-Motiv, welches in allen vier Core-Histonen hochkonserviert ist. Dieses Motiv wurde auch in der Untereinheiten des CCAAT-bindenden Faktors CBF und seiner Hefehomologe (HAP-Komplex) identifiziert (Goppelt *et al.*, 1996; Sinha *et al.*, 1995, 1996) (Abb. 3A). Es wird angenommen, daß NC2 über diese "Histone-Fold"-Domäne dimerisiert und sich eine molekulare Struktur, welche ähnlich zu den Histone-Paaren in Nukleosom ist, ausbildet (Goppelt *et al.*, 1996).

Der C-terminale Bereich von humanem NC2 $\alpha$  (hNC2 $\alpha$ ) enthält saure und Prolin-reiche Regionen, die auch bei vielen anderen Transkriptionsfaktoren zu finden sind (Yeung *et al.*, 1994, 1997; Goppelt *et al.*, 1996; S.J.Kim *et al.*, 1997) (Abb. 3B). In der C-terminalen Domäne von humanem NC2 $\beta$  (hNC2 $\beta$ ) wurde neben der sauren und basischen Region, eine weitere Domäne identifiziert, die reich an Glutamin- und Alanin-Resten (QA) ist (Abb. 3B). Diese QA-reiche Region wurde in Transfektionsexperimenten als Repressionsdomäne von NC2 $\beta$  charakterisiert (Yeung *et al.*, 1994).

## A

		Helix I	Helix I	Helix I																																																																
H2A	25-	F	E	V	G	R	V	H	R	L	L	R	K	G	N	-	Y	A	E	R	V	G	A	G	A	P	V	I	L	A	V	L	E	Y	L	T	A	E	I	L	E	L	A	G	N	A	A	R	D	N	K	T	R	I	I	P	R	H	L	Q	L	A	I	R	N	D	- 90	
NC2 $\alpha$	12-	F	P	P	A	R	I	K	K	I	M	O	T	D	E	-	E	I	G	K	V	A	A	A	V	P	V	I	I	S	R	A	L	E	L	F	L	E	S	L	L	K	K	A	C	Q	V	T	Q	S	R	N	A	K	T	M	T	S	H	L	K	O	C	I	E	L	E	- 77
ceNC2 $\alpha$	66-	I	Q	E	T	R	I	K	K	V	M	O	S	D	E	-	D	I	G	R	M	V	Q	S	V	P	V	S	I	G	R	A	M	E	H	F	A	E	K	F	L	Q	A	A	E	A	T	O	F	T	S	S	K	T	L	N	P	O	H	M	K	O	A	V	L	N	T	- 131
yNC2 $\alpha$	53-	F	P	P	A	K	V	K	K	I	M	O	T	D	E	-	D	I	G	K	V	S	Q	A	T	P	V	I	A	G	S	L	E	F	F	I	A	L	L	V	K	K	S	G	E	M	A	R	G	Q	G	T	K	R	I	T	A	E	I	L	K	K	T	L	N	D	- 118	
CBF-C	43-	L	P	I	A	R	I	K	K	I	M	K	I	D	E	-	D	V	K	M	I	S	A	E	A	P	V	L	F	A	K	A	Q	I	F	I	T	E	L	T	L	R	A	W	I	H	E	D	N	K	R	T	L	Q	R	N	D	I	A	M	A	T	K	F	- 108			
HAP5	134-	L	P	F	A	R	I	R	K	V	M	K	T	D	E	-	D	V	K	M	I	S	A	E	A	P	I	F	A	K	A	C	E	I	F	I	T	E	L	T	M	R	A	W	C	V	A	E	R	N	K	R	T	L	Q	K	A	D	I	A	E	A	L	Q	K	S	- 199	
NC2 $\beta$	13-	I	P	R	A	A	I	N	K	M	I	K	E	T	L	P	-	N	V	R	V	A	N	D	A	R	E	L	V	N	C	T	E	F	I	H	L	S	S	E	A	N	E	I	C	N	K	S	E	K	K	T	I	S	P	E	H	V	I	Q	A	L	E	S	L	- 78		
ceNC2 $\beta$	22-	L	P	Q	K	G	I	N	Q	I	L	K	E	V	V	E	-	E	M	R	I	A	N	E	S	R	D	M	I	N	A	C	C	V	E	F	V	K	H	I	A	R	E	A	Q	R	I	A	S	Q	D	R	K	T	I	Y	H	E	H	V	Q	K	A	L	Q	N	L	- 87
yNC2 $\beta$	10-	L	P	K	A	I	V	Q	K	M	I	S	E	L	D	Q	D	L	M	F	T	K	D	A	R	E	I	I	N	S	G	I	E	F	I	M	L	S	S	M	A	S	E	M	A	D	N	E	A	K	K	T	I	A	P	E	H	V	I	K	A	L	E	T	- 75			
CBF-A	58-	L	P	I	A	N	V	A	R	I	M	K	N	A	I	P	T	G	K	I	A	K	D	A	K	E	C	V	Q	E	C	V	S	E	F	I	S	F	T	S	E	A	S	E	R	C	H	Q	E	K	R	T	I	N	G	E	D	I	L	F	A	M	S	T	L	- 124		
HAP3	28-	L	P	I	N	N	V	A	R	I	M	K	N	T	L	P	P	S	A	K	V	S	K	D	A	K	E	C	M	Q	E	C	V	S	E	L	I	S	F	V	T	S	E	A	S	D	R	C	A	A	D	K	R	T	I	N	G	E	D	I	L	I	S	H	A	L	- 93	
H2B	37-	S	Y	S	I	Y	V	Y	K	V	L	K	Q	V	H	D	T	G	-	I	S	S	K	A	M	G	S	M	N	S	F	V	N	D	I	F	E	R	I	A	G	E	A	S	R	L	A	H	Y	N	K	E	S	T	I	T	S	R	E	I	Q	T	A	V	R	L	L	- 102

## B



**Abb. 3:** Primäre Struktur der NC2-Untereinheiten. (A) Sequenzvergleich der NC2-Untereinheiten aus Mensch (NC2 $\alpha$  und NC2 $\beta$ ), Hefe (yNC2 $\alpha$  und yNC2 $\beta$ ) und *C. elegans* (CeNC2 $\alpha$  und CeNC2 $\beta$ ) mit den "Histone-Fold"-Domäne der Histone H2A und H2B, Untereinheiten des CBF-Komplexes (CBF-C und CBF-A) aus Ratte und des HAP-Komplexes (HAP5 und HAP3) aus Hefe. Die schattierten Positionen in der Histonen und den humanen NC2 bezeichnen Aminosäuren, die zu einem Mitglied der entsprechenden Klasse homolog sind. Die Positionen der drei Helices der "Histone-Fold"-Domäne sind mit durchgezogenen Linien angegeben (nach Luger *et al.*, 1997). (B) Schematische Darstellung der Strukturen der NC2-Untereinheiten. Die "Histone-Fold"-Domänen, die basische, saure, Prolin-reiche (Pro-reich) und Glutamin/Alanin-reiche (QA-reich) Regionen sind verschieden gekennzeichnet. Die Aminosäure-Positionen sind angegeben.

## 1.7. Aufgabenstellung

Die hisherige Erkenntnisse und der molekulare Mechanismus der NC2-Repression basiert auf *in vitro*-Studien. Als ein Heterodimer-Komplex aus NC2 $\alpha$  und NC2 $\beta$  bindet NC2 stabil an TBP auf DNA und inhibiert die basale Transkription verschiedener Promotoren in rekonstituierten Transkriptionssystemen. Die Bindung von NC2 an TBP verhindert die Anlagerung von TFIIA und TFIIIB an TBP und die darauf folgte Bildung des Initiationskomplexes. Es wurde gezeigt, daß die

Histone-Fold Domänen beider NC2-Untereinheiten für die spezifisch Komplexbildung mit TBP essentiell sind. Seine Funktion in der *in vitro*-Transkription erfordert außerdem die C-terminale Region von NC2.

Die Aufgabe dieser Arbeit besteht darin, die Funktionen von NC2 unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Aus diesem Grund sollte ein *in vivo*-Modellsystem etabliert werden. Da die Hefe zwei stark homologe Gene zum menschlichen NC2 besitzt, wurde sie als Modellorganismus ausgewählt. Ziel dieser Arbeit war es, die funktionellen Domänen von humanem NC2 unter physiologischen Bedingungen zu charakterisieren und Beweise für den vorhergesagte Wirkungsmechanismus in lebenden Zellen zu erhalten.

## 2. Material

---

### 2.1. Geräte

Direct Imager	Instant Imager, Packard
Entwicklermaschine	Hyperprocessor, Amersham
Elektroblot-Apparatur	BioRad
Elektrophorese-Apparaturen	Hoefel
	Harnischmacher
FPLC	Pharmacia
Gefrierschränke	Forma Scientific
Geldokumentationssystem	Eagle Eye II Still Video System, Stratagene
Geltrockner	Slab Gel Dryer, Modell SE1160, Hoefel Scientific Instruments
	Sigma
Glassperle (0,5-0,7 mm)	Eppendorf-Thermostat 5320
Heizblöcke	Ikamag RCT, Bachhofer
Heizrührgerät	Pharmacia LKB
HPLC	Douncer, Wheaton
Homogenisator	WTC Binder
Inkubator (Brutschrank)	Heraeus Typ BB 6220
	Typ IM 35, Zeiss
Lichtmikroskop	BioRad
Naßblotapparatur	761 Calimatic, Bachofer
pH-Meter	Gilson Pipetman P2, P10, P20, P200, P1000
Pipetten	Beckman DU-640 Spektrophotometer
Photometer	Modell P1, Pharmacia
Pumpen	Modell P50, Pharmacia
	Eppendorf-Thermomixer 5437, 5438
Reaktionsgefäßschüttler	Sorvall SS34, GSA, GS3, SLA-1500, SLA-300, SA600
Rotoren	Beckmann 50.2 Ti
	Mini S PC 3.2/3 (0,24 ml) (3,2 mm x 30 mm), Pharmacia
Säulen	Mono Q PC 1.6/5 (0,1 ml) (1,6 mm x 50 mm), Pharmacia
	Mono S PC1.6/5 (0,1 ml) (1,6 mm x 50 mm), Pharmacia
	Q-Sepharose (1 ml), Pharmacia
	Superose 12 PC 3.2/30 (2,4 ml) (3,2 mm x 300 mm), Pharmacia
	Superose 6 PC 3.2/30 (2,4 ml) (3,2 mm x 300 mm), Pharmacia
	Superdex 75 HR 10/30 (24 ml) (10 mm x 300 mm), Pharmacia
	µRPC C2/18 PC3.2/3 (0,1 ml) (3,3 mm x 30 mm), Pharmacia
	C <sub>18</sub> Reversed Phase PAK 201 TP1010

## 3. Methoden

---

### 3.1. Kultivierung von Bakterien

#### 3.1.1. Anzucht von Bakterienkulturen

Alle Arbeiten mit Bakterien werden unter einer sterilen Werkbank oder direkt neben einer Bunsenbrennerflamme durchgeführt. Kunststoffgeräte wie Reaktionsgefäße und Pipetten-spitzen werden autoklaviert. Glaswaren werden bei 180°C für 3 h trocken autoklaviert. Platinösen werden in offener Flamme durch Ausglühen sterilisiert, andere hitzebeständige Geräte oder Gefäße durch kurzes Abflammen keimfrei gemacht. Die Anzucht der Bakterienkulturen erfolgt in sterilen Reagenzgläsern. *Escherichia coli* wird in Flüssigkultur unter guter Belüftung bei 37°C im Schüttler inkubiert; dies erfolgt entweder in LB-Medium oder in einem mit einem Antibiotikum versetzten LB-Medium.

Auf Festmedien wird *E. coli* mit einer sterilen Platinöse im Verdünnungsausstrich überimpft und bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Antibiotika:	Ampicillin 100 µg/ml	Stammlösung	100mg/ml in H <sub>2</sub> O
	Tetracyclin 12,5 µg/ml	Stammlösung	12,5 mg/ml in 70% EtOH
	Kanamycin 70 µg/ml	Stammlösung	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O
	Chloramphenicol 25 µg/ml	Stammlösung	34 mg/ml in 100% EtOH

Festmedien: 1,5% (w/v) Bacto-Agar in LB-Medium

#### 3.1.2. Anlegen von Dauerkulturen

Für Dauerkulturen von *E. coli* werden 1 ml einer stationär gewachsenen Bakterienkultur abzentrifugiert und das Zellpellet mit 500 µl sterilem, 20%igem Glycerin (v/v) in LB-Medium vermischt und in 2 ml Nunc-Reaktionsgefäßen mit Schraubdeckeln bei - 80°C eingefroren.

### 3.2. Kultivierung höherer eukaryontischen Zellen

#### 3.2.1. Zellenvermehrung in Suspension

Alle Arbeiten werden unter Laminarfluß mit autoklavierten oder sterilfiltrierten Lösungen, autoklavierten Glaswaren und mit vom Hersteller entkeimten Kunststoffmaterialien sowie Nährmedien durchgeführt. Die teilweise adhärenenten HeLa-Zellen werden in Joklik-Medium, bei

37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit gehalten. Das Medium wird mit 5% FCS (v/v), 2 mM L-Glutamin sowie 75 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin supplementiert. Vor Gebrauch wird das FCS 30 min bei 55°C hitzeinaktiviert. HeLa-Zelllinien werden bis zu einem Kulturvolumen von 200 ml in Medium hochgezogen, welches 200 g/ml Neomycin (G418) enthält. Bei größeren Volumina in Spinnergefäßen (10 Liter) wird auf diese Selektion verzichtet. Die 8wq16-Hybridomasuspensionszellen werden in RPMI 1640-Medium gehalten, das entweder mit 5% (v/v) FCS oder 2% (v/v) Ultrosor-Lösung supplementiert wird. Die Haltung erfolgt in horizontal gelagerten Zellkulturflaschen oder Spinnergefäßen auf Magnetrührern. Suspensionszellen werden jeden Tag 1:2 verdünnt und so bei einer konstanten Zelldichte von  $5,5 \times 10^5$  Zellen/ml gehalten. Bei logarithmischem Wachstum verdoppelt sich die Zelldichte bei 37°C in 24 h. In einer Neubauer-Zählkammer werden unter dem Lichtmikroskop die Zellen gezählt. Alle kontaminierten Einwegmaterialien werden autoklaviert und dann dem Abfall zugeführt. Mediumreste werden durch Hypochlorid-Lösung sterilisiert.

### **3.2.2. Anlegen von Dauerkulturen**

Für Dauerkulturen eukaryontischer Zellen wird eine logarithmisch wachsende Suspensionskultur abzentrifugiert (Heraeus, 1500 rpm, 5 min). Es werden je  $1 \times 10^7$  Zellen mit 1 ml eiskaltem Freeze-Medium aufgenommen, und in 2 ml Nunc-Reaktionsgefäßen mit Schraubdeckeln gut wärmeisoliert 48 h bei -80°C gelagert. Endgültig gelagert werden die Aliquots in flüssigem Stickstoff. Zum Auftauen werden die Zellen rasch auf 37°C erwärmt, mit 10 ml komplettem Medium vermischt, abzentrifugiert (Heraeus, 1500 rpm, 5 min), und in 10 ml neuem Medium resuspendiert.

Freeze-Medium:           80 % (v/v) RPMI- bzw. Joklik-Medium  
                              10% (v/v) FCS  
                              10% (v/v) DMSO

## **3.3. Hefekulturen**

### **3.3.1. Anzucht auf Agarplatten**

Aus Glycerin- oder Flüssigkulturen wurden mit einer sterilen Impföse die Hefen auf entsprechenden Agarplatten ausgestrichen. Flüssigkulturen konnten nach geeigneter Verdünnung auch direkt ausplattiert werden um vereinzelte Kolonien zu bekommen. Die Platten werden bei 30°C für 2-10 Tage inkubiert. Für die Bestimmung der Temperatursensitivität wurden die Platten bei 37°C oder 16°C inkubiert.

### 3.3.2. Vermehrung in Flüssigkultur

Zur Anzucht von Hefen wurden Einzelkolonien von Kulturplatten in 5-20 ml des entsprechenden Mediums angeimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Übernachtskultur wurde in frischem Medium auf eine  $D_{600} = 0,1$  verdünnt und unter Schütteln (200 rpm, aerobe Bedingungen) weiter bei 30°C inkubiert. Entsprechend der weiteren Verwendung der Hefen wurden sie bei unterschiedlichen OD-Werten geerntet. Für Transformationen sollten sich die Hefen in der frühen logarithmischen Wachstumsphase befinden, d.h. sie wurden bei einer  $OD_{600}$  zwischen 0,6 - 0,8 geerntet. Für Proteinextraktion konnten sie bis zu einer  $OD_{600}$  von 3 wachsen.

### 3.3.3. Stammhaltung

Übernachtskulturen der einzelnen Stämme wurden abzentrifugiert und das Zellpellet wurde mit 60% Glycerin in 1 x TE resuspendiert, bei - 80°C eingefroren. Um Glycerinkulturen von Plattenkultur anzulegen, mußten die Hefen dicht auf einer Platte ausgeschtrichen werden. Nach 2 - 3 tagige Inkubation bei 30°C wurde der Zellrasen mit einer Impföse abgekratzt und in 60% Glycerin in 1 x TE suspendiert. Glycerinkulturen sind bei - 80°C für mehrere Jahren haltbar.

## 3.4. DNA- und RNA-Arbeitstechniken

### 3.4.1. Bestimmung der Konzentration und Reinheit einer Nukleinsäure-Präparation

Die Konzentration der DNA-Lösung wird über ihre Absorption bei 260 nm ermittelt. Dabei entspricht 1  $OD_{260}$  einer Konzentration von 50  $\mu\text{g}$  ds-DNA/ml. Als Kriterium für die Reinheit einer DNA-Präparation wird das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  herangezogen. Für reine DNA schwankt dieser Wert je nach G/C-Gehalt der Probe zwischen 1,8 und 2,0. Niedrigere Quotienten zeigen Proteinverunreinigungen an, höhere lassen auf die Anwesenheit von RNA schließen. Bei RNA-Lösungen entspricht 1  $OD_{260}$  einer RNA-Konzentration von 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

### 3.4.2. Chloroform-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren

Die Chloroform-Extraktion ist eine Routinemethode zur Denaturierung und Entfernung von Proteinen aus Lösungen von Nukleinsäuren und Proteinen. Wenn nicht anders beschrieben, wird die Nukleinsäure-Lösung mit einem Volumenanteil Chloroform versetzt, auf dem Vortex vermischt, und

für 3 min bei RT zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, 14.000 rpm, RT). Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit einem Volumenanteil Chloroform/Isoamylalkohol [24:1(v/v)] gemischt und erneut für 3 min zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, 14.000 rpm, RT). Der wäßrige Überstand wird abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Restliches Chloropane wird durch anschließende Ethanol-fällung der DNA entfernt. Bei der Zugabe von Alkohol kommt es in Gegenwart relativ hoher Konzentrationen an monovalenten Kationen zur Aggregation der Nukleinsäure-Moleküle und zur nachfolgenden Präzipitation. Niedermolekulare Oligonukleotide, Nukleotide und Salze bleiben dabei in Lösung. Die Nukleinsäuren werden aus der Lösung durch Zugabe von 1/10 Volumenanteil 3 M Natriumacetat (pH 5,0) und 2,5 Volumenanteilen eiskaltem Ethanol (100%) gefällt. Der Ansatz wird vermischt und 10 - 20 min bei -20°C inkubiert. Nach einer zehnmütigen Zentrifugation (Heraeus Biofuge 28 RS, 20.000 rpm, 4°C) wird das Präzipitat mit 70%igem Ethanol gewaschen, nochmals für 10 min zentrifugiert und in der Lyophille getrocknet. Schließlich wird die DNA in einem geeigneten Volumen TE gelöst.

Chloropane: Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol [25:24:1 (v/v)], gesättigt mit TE-Puffer

### 3.4.3. Reinigung von DNA über Gelfiltration

• **Reinigung über eine Sephadex G50:** Die DNA wird in einem Volumen bis 0,1 ml auf eine mit TE äquilibrierte 1 ml Sephadex G50-Säule ("Nick column", Pharmacia) aufgetragen. Die Säule wird mit TE eluiert und der Durchlauf fraktioniert gesammelt. Die erste Fraktion von 0,35 ml wird verworfen, in der zweiten Fraktion von 0,4 ml eluiert die DNA. Hierbei werden Salze, Nukleotide und grobe Verunreinigungen abgetrennt. Bevorzugt wird die Methode zur Abtrennung der DNA von <sup>32</sup>P-markierten Nukleotiden eingesetzt. Es können noch einzel-strängige Oligonukleotide einer Länge von 20 - 25 Basen von freien Nukleotiden abgetrennt werden.

• **Reinigung über eine "micro-spin column":** Diese Methode hat sich bei der Reinigung langer DNA-Fragmente (230 bp) bewährt, die in EMSAs eingesetzt wurden. Dazu wird das Volumen eines Markierungsansatzes mit TE auf 50 µl aufgefüllt. Die mit TE äquilibrierte Gelfiltrationssäule wird auf dem Vortex gut durchmischt und anschließend nach Abbrechen des unteren Verschlusses mit leicht geöffnetem Deckel auf ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gesetzt. Zur Entfernung von überschüssigem TE wird die Säule zentrifugiert (Tischzentrifuge, 3.500 rpm, 1 min) und anschließend auf ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß gesetzt. Die Säule wird mit dem Markierungsansatz beladen und erneut zentrifugiert (Tischzentrifuge, 2 min, 3.500 rpm). Das gereinigte DNA-Fragment befindet sich unverdünnt im Eluat. Zur Aktivitätsbestimmung wird 1 µl im Szintillationszähler gemessen.

### 3.4.4. Reinigung von DNA über DE52-Säulen

DNA kann in beliebigen Volumina in 0,2 x STE-Puffer auf mit 0,2 x STE äquilibrierte Säulen aufgetragen, ebenfalls mit 0,2 x STE gewaschen und mit 0,5 x STE eluiert werden. Hierbei werden alle Salze, Nukleotide und viele Proteine abgetrennt. Dazu werden 0,5 ml Säulen-material in eine mit silikonisierter Glaswatte verschlossene 1 ml Plastikspritze gegeben. Die Säule wird mit 0,2 x STE äquilibriert, mit der DNA beladen, fünfmal mit je 0,5 ml 0,2 x STE gewaschen, und schließlich dreimal mit 0,15 ml 0,5 x STE eluiert.

Mit dieser Methode werden radioaktiv markierte DNA-Proben für das Durchmustern von Genbanken sowie für Northern Blot Analysen über DE52 gereinigt. Es hat sich bewährt, diese Proben vor der Hybridisierung steril zu filtrieren, um weniger Hintergrundsignale zu erhalten.

0,2x STE: 200 mM NaCl in TE  
0,5x STE: 500 mM NaCl in TE

### 3.4.5. Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Del Sal *et al.*, 1988)

2 ml einer ÜN-Kultur werden abzentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge, 14.000 rpm, 30 s, RT). Der Überstand wird möglichst quantitativ abgenommen und verworfen. Das Sediment wird in 200 ml STET-Puffer mit 2 mg/ml Lysozym auf dem Vortex suspendiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT werden die Proben in einem Heizblock 45 s bis 60 s auf 95°C erhitzt und anschließend 10 min bei RT zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge, 14.000 rpm). Die Bakterienreste mit der chromosomalen DNA sind nach der Zentrifugation zu einem gallertartigen Klumpen verdichtet, der mit einem Zahnstocher restlos aus dem Reaktionsgefäß entfernt wird. Zum plasmidhaltigen Überstand werden dann 8 ml einer 5%igen CTAB-Lösung (w/v; in H<sub>2</sub>O) pipettiert. Das entstehende Präzipitat wird nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge, 14.000 rpm, 10 min, RT) und, nachdem der Überstand restlos entfernt worden ist, wieder in 300 ml 1,2 M NaCl gelöst. Die Nukleinsäuren werden anschließend durch Zugabe von 750 ml absolutem Ethanol gefällt, nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT abzentrifugiert (Heraeus Biofuge 28 RS, 20.000 rpm, 10 min, 4°C), in 750 ml 70% Ethanol gewaschen und dann erneut zentrifugiert. Das Präzipitat wird 5 min im Ölpumpenvakuum getrocknet und schließlich in 50 ml TE-Puffer aufgenommen. Zwischen 3 ml und 5 ml dieser Präparation reichen für eine analytische Restriktionshydrolyse aus.

STET-Puffer: 8% (w/v) Saccharose  
0,1% (v/v) Triton-X-100

50 mM EDTA  
50 mM Tris-HCl, pH 8,0

### 3.4.6. Amplifikation von DNA mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von NC2 $\alpha$ - und NC2 $\beta$ /Dr1-Derivaten aus Plasmid-DNA bzw. aus HeLa-cDNA über die Polymerase-Kettenreaktion (Saiki *et al.*, 1988) wird Taq- oder Vent-DNA-Polymerase verwendet. Die Vent-DNA-Polymerase besitzt eine 3'→5' "Proofreading"-Exonukleaseaktivität, die im Vergleich zur Taq-DNA-Polymerase zu einer zehnfach höheren Genauigkeit der DNA-Synthese führt. Ein weiterer Unterschied zur Taq-DNA-Polymerase besteht darin, daß die Reaktionsprodukte glatte Enden besitzen, was die nachfolgende Klonierung erleichtert.

Der Reaktionsansatz enthält jeweils 200 pmol Primer, 100 ng genomische (oder 20 ng Plasmid) DNA, 400  $\mu$ M jedes dNTPs, 10  $\mu$ l des vom Hersteller mitgelieferten 10 x PCR-Puffers und 0,5  $\mu$ l Enzym-Mix in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu$ l. Der Ansatz wird auf Eis zusammenpipettiert und die Reaktion durch Zugabe des Enzyms bei 94°C in der PCR-Maschine gestartet ("Hot start"). Dadurch werden unspezifische Paarungen der Primer in der ersten Amplifikationsrunde vermieden. Die Hybridisierungstemperatur wird mit Hilfe des Computer-Programms OLIGO 4.0-s bestimmt: für jedes G oder C im hybridisierenden Bereich der PCR-Primer ergibt sich eine Erhöhung der Temperatur (von 0°C ausgehend) um ca. 4°C, für jedes A oder T eine Erhöhung um ca. 2°C. Die Polymerisationsdauer wird durch die Länge der zu amplifizierenden Sequenz bestimmt, da die Synthesegeschwindigkeit der verwendeten hitzestabilen Polymerase bei 72°C bei ca. 1000 Nukleotiden pro min liegt. Im folgenden ist ein Beispiel für die Amplifikation von PCR-Fragmenten bis zu 1 kb in einer PCR-Maschine angegeben:

Zyklennummer	1		2-3		4-25		26	
Denaturierung	94°C	120 s	94°C	30 s	94°C	30 s		
Hybridisierung			56°C	30 s	62°C	30 s		
Elongation			72°C	60 s	72°C	60 s	72°C	5 min

Es wird dabei eine anfängliche Hybridisierungstemperatur der Primer von 56°C voraus-gesetzt. Durch zusätzliche DNA-Sequenzen mit Restriktionsschnittstellen am 5'-Ende des Primers wird nach den ersten Amplifikationsrunden die Hybridisierungstemperatur auf 62°C erhöht. In der letzten Runde werden in dem verlängerten Elongationsschritt evtl. nicht fertig synthetisierte Produkte aufgefüllt. Jeweils 5  $\mu$ l eines PCR-Ansatzes werden anschließend über eine Agarosegelelektrophorese analysiert.

Um eine amplifizierte cDNA gerichtet in den bakteriellen Expressionsvektor pET15b kloniert zu können, besitzen die Primer üblicherweise Schnittstellen für die Restriktions-enzyme *NdeI* und *BamHI*.

10 x Vent-PCR Puffer:     100 mM KCl  
                              200 mM Tris/HCl, pH 8,8 (25°C)  
                              100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
                              20 mM MgSO<sub>4</sub>  
                              1% (v/v) Triton X-100

### 3.4.7. Restriktionshydrolyse von DNA

Im allgemeinen werden 3-5 µl einer CTAB-Plasmidminipräparation (300-600 ng) in einem Volumen von 10 µl hydrolysiert. Die Ansätze enthalten neben dem für das jeweilige Enzym optimalen Restriktionspuffer noch 0,5-1 µg/ml RNase A und 0,5-1 µl des Restriktions-enzym (2-10 U). Die Reaktionen werden für 1 h bei der vom Hersteller angegebenen optimalen Temperatur inkubiert. Soll eine Spaltung mit zwei verschiedenen Enzymen durchgeführt werden, kann ein Doppelverdau in einem Spaltungsansatz durchgeführt werden, sofern beide Restriktionsenzyme unter gleichen Pufferbedingungen spalten. Ist dies nicht der Fall, wird die Nukleinsäure zunächst mit einem Enzym geschnitten, der Ansatz mit Chloroform extrahiert, die DNA mit Ethanol gefällt und anschließend mit dem zweiten Enzym hydrolysiert.

RNase A:           10mg/ml in  
                      10 mM Tris-HCl, pH 7,5  
                      15 mM NaCl  
                      15 min kochen

### 3.4.8. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird in horizontalen Gelapparaturen durchgeführt. Je nach der Größe der zu trennenden Nukleinsäure-Fragmente schwankt die Agarosekonzentration zwischen 0,7% und 2% (w/v). Als Laufpuffer dient 1x TBE; die aufzutrennenden Proben werden in 1 x Auftragspuffer aufgetragen. Um die Nukleinsäuren unter UV-Licht sichtbar zu machen, wird der Gellösung unmittelbar vor dem Gießen Ethidiumbromid (0,5 µg/ml Endkonzentration) zugesetzt oder das Gel 30 min in 1 x TBE mit Ethidiumbromid nachgefärbt. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Feldstärke von 5 V/cm.

5 x Auftragspuffer:        30% (v/v) Glycerin in H<sub>2</sub>O  
                                  0,25% (w/v) BPB  
                                  0,25% (w/v) XC

### 3.4.9. Elution von DNA aus Agarosegelen

• **Gelelution mittels des "Gel Elution Kit"** (Qiagen): Das ausgeschnittene Agarosegelstück mit dem gewünschten DNA-Fragment wird in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert, gewogen, und mit drei Volumenanteilen Puffer QX1 versetzt. Nach 10 min Erhitzen auf 50°C und zwei- bis dreimaligem Mischen ist die Gelmatrix gelöst. Man setzt 10 µl 3 M NaOAc (pH 5,0) zu und pipettiert die Lösung auf eine Säuleneinheit (QIAquick Spin Column), die in einem 2 ml Reaktionsgefäß plaziert ist. Nach 1 min Zentrifugation (Tischzentrifuge, 14.000 rpm) bei RT wird die gebundene DNA mit 0,75 ml PE-Puffer gewaschen, und nach 5 min Stehenlassen erneut zentrifugiert. Der Waschpuffer wird verworfen, und ein weiterer Zentrifugationsschritt befreit die Säulenmatrix von letzten Pufferresten. Man plaziert die Säuleneinheit in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß, pipettiert 40 µl TE auf die Matrix, beläßt sie für 5 min auf RT und zentrifugiert die eluierte DNA ab (Tischzentrifuge, 14.000 rpm).

Die Puffer QX1 und PE sind dem Kit beigelegt.

• **"Freeze-thaw"-Methode:** Die gewünschte DNA-Bande wird unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 365 nm detektiert und ausgeschnitten. Nach dem Transfer in eine Ultrafree-Filtereinheit wird die Probe auf Trockeneis eingefroren und bei RT aufgetaut. Viermaliges Wiederholen dieser Prozedur vervollständigt die Zerstörung der Gelmatrix. Das Gelstückchen wird in halbgefrorenem Zustand zentrifugiert (Sigma 2K15 Kühlzentrifuge, 2.000 rpm, 15 min, 4°C). Das Eluat wird mit Chloroform extrahiert, die DNA wird mit EtOH gefällt und in 10-50 µl TE aufgenommen.

• **Elektroelution:** Das Agarosegel wird in seiner Gießform in die Elektrophoreseapparatur gelegt, wobei darauf geachtet wird, daß der TBE-Puffer das Gel gerade nicht mehr bedeckt. Vor der gewünschten Bande wird mit dem Skalpell ein rechteckiger Trog ausgeschnitten, der mit einer vorbehandelten Dialysemembran (Spectropor, Ausschlußvolumen 9 kDa) ausgekleidet wird. Dieser Trog wird mit ca. 0,3 - 0,4 ml 1 x TBE-Puffer gefüllt. Die Elektrophorese wird fortgesetzt, bis die Bande in den Trog eingewandert ist, was unter UV-Licht einer Wellenlänge von 365 nm kontrolliert werden kann. Schließlich polt man die Elektroden für 30 s um, überführt die DNA-haltige Pufferlösung in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß, extrahiert und fällt sie wie oben beschrieben.

### 3.4.10. Reinigung synthetischer Oligodeoxyribonukleotide

Da die automatische Oligodeoxyribonukleotid-Synthese nicht mit 100%iger Ausbeute verläuft, sind in jeder Rohpräparation noch Oligodeoxyribonukleotide vorhanden, die kürzer als das erwünschte sind. Diese müssen erst über eine Gelelektrophorese abgetrennt werden. Dazu wird die lyophilisierte Oligodeoxyribonukleotidpräparation in 40 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und mit einem Volumenanteil Formamid-Auftragspuffer versetzt. Es schließt sich eine gelelektrophoretische Auftrennung in einem 1,5 mm dicken, 11 - 15%igem (je nach der Länge der Oligodeoxyribonukleotide) denaturierenden Polyacrylamidgel an. Nach der Gelelektrophorese kann die der DNA entsprechende Bande durch UV-Löschung bei 254 nm sichtbar gemacht und ausgeschnitten werden. Die zerkleinerte Gelmatrix wird mit 500 µl H<sub>2</sub>O über Nacht bei 37°C geschüttelt. Durch eine Zentrifugation in einer Millipore Ultrafree Filtereinheit (Eppendorf-Zentrifuge, 2.000 rpm, 10 min, RT) werden Polyacrylamid-bruchstücke von der wässrigen Lösung abgetrennt. Durch Zugabe von 1/100 Volumenanteil 1 M MgCl<sub>2</sub>, 1/10 Volumenanteil 3 M Natriumacetat (pH 5,0) und 2,5 Volumenanteilen eiskalten Ethanol (100%) werden die Oligodeoxyribonukleotide gefällt. Nach zehnminütiger Kühlung bei - 20°C wird die DNA abzentrifugiert (Heraeus Biofuge 28 RS, 20.000 rpm, 10 min, 4°C) und nach einem Waschschrift mit 70% Ethanol und Trocknung in der Lyophilie in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Zur Konzentrationsbestimmung wird ein Aliquot dieser Lösung 1:200 verdünnt und die optische Dichte bei 260 nm gemessen.

Formamid-Auftragslösung:      0,1% (w/v) BPB  
   0,1% (w/v) Xylencyanol  
   0,5 mM EDTA  
   98% (v/v) Formamid

### 3.4.11. Radioaktive Markierung von Oligodeoxyribonukleotiden am 5'-Ende

Oligodeoxyribonukleotide tragen synthesebedingt keinen Phosphatrest an ihrem 5'-Ende. Einzel- oder doppelsträngige DNA wird mit T4-Polynukleotidkinase am 5'-Ende der DNA markiert und zum Beispiel für die Ligation in dephosphorylierte Vektoren vorbereitet.

Für die Endmarkierung werden 10 pmol dephosphorylierter DNA mit 1 U T4-Polynukleotidkinase in Gegenwart von 50 mCi (16,5 pmol)  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]ATP in dem vom Hersteller mitgelieferten Kinase-Puffer 1 h bei 37°C inkubiert. Das Enzym wird sukzessive in zwei Aliquots à 0,5 µl zugegeben, da es bei 37°C eine geringe Halbwertszeit besitzt. Anschließend wird die DNA vom restlichen ATP wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben über Sephadex G-50 abgetrennt. Wird DNA mit unmarkiertem ATP phosphoryliert, liegt die ATP-Konzentration bei 10 µM und es werden 0,5 U Polynukleotidkinase pro pmol DNA-Fragment eingesetzt.

10 x Polynukleotidkinase-Puffer: 700 mM Tris/HCl, pH 7,6  
100 mM MgCl<sub>2</sub>  
50 mM DTT

### 3.4.12. Dephosphorylierung von DNA

Die alkalische Phosphatase aus Kälberdarm entfernt in einem linearen, doppelsträngigen DNA-Molekül endständige 5'-Phosphatgruppen. Eine Entfernung von Phosphatresten wird durchgeführt, wenn bei Klonierungen die interne Religation eines Vektors durch die anschließende DNA-Ligase-Reaktion verhindert werden soll.

Es werden in einem Reaktionsansatz 0,1 U Enzym pro pmol DNA mit kohäsiven 5'-überhängenden Enden eingesetzt. Die Reaktion wird für 1 h bei 37°C im Reaktionspuffer durchgeführt. Zur Inaktivierung der alkalischen Phosphatase wird dann EDTA (pH 8,0) zu einer Endkonzentration von 5 mM zugegeben und 10 min auf 75°C erhitzt. Die DNA wird anschließend mit Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt.

Phosphatasepuffer: 50 mM NaCl  
10 mM Tris-HCl, pH 7,9  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM DTT

### 3.4.13. Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden

Das Klenow-Fragment ist die große Untereinheit der DNA-Polymerase I aus *E. coli*, der die 5'→3' Exonukleaseaktivität fehlt. In Gegenwart von Deoxyribonukleotiden füllt das Klenow-Fragment 5'-überhängende DNA-Enden auf. Dazu werden in einem Volumen von 50 µl 0,1 bis 1 µg DNA, 5 µl 10 x Klenow-Polymerase Puffer, 100 µM dNTPs und 5 U Klenow-Polymerase für 20 min bei RT inkubiert. Das Enzym wird anschließend für 20 min bei 75°C inaktiviert.

Für die radioaktive Endmarkierung von Oligodeoxyribonukleotiden enthält die Reaktion: 10 pmol DNA, 2 µl 10 x Klenow-Polymerase Puffer, 5 U Klenow-Polymerase, 1 mM dGTP, 1 mM dCTP, 1 mM dTTP, und 5 µl α-[<sup>32</sup>P]dATP (3000 Ci/mmol) in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Die Reaktionen werden für 30 min bei RT inkubiert. Die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide erfolgt über eine Sephadex G50-Säule. Die radioaktiv markierten Oligodeoxyribonukleotide können bis zu 6 Wochen bei -20°C gelagert werden.

Der Einbau des terminalen Nukleotids verläuft sehr ineffektiv (5-10%). Bei radioaktiven Markierungen sollten Nukleotide daher an der innersten Position, zumindest aber an der zweitäußersten Position eingebaut werden.

10 x Klenow-Polymerase Puffer (New England Biolabs): 100 mM Tris/HCl (pH 7,5)  
50 mM MgCl<sub>2</sub>  
75 mM DTT

#### 3.4.14. Ligation von DNA

Zunächst werden Aliquots der zu ligierenden DNA-Fragmente nebeneinander auf einem Agarose-Gel aufgetrennt, um die Mengenverhältnisse abschätzen zu können. Für die Ligation wird ein molares Verhältnis Fragment:Vektor von 3:1 bis 5:1 gewählt, wobei die Gesamtmenge an DNA zwischen 50 ng und 100 ng liegt. Vektor-DNA, die lediglich mit einem Restriktionsenzym linearisiert wurde, wird im allgemeinen vor der Ligationsreaktion an ihren Enden dephosphoryliert, um eine Religation des Plasmides zu verhindern. Gilt es lediglich, einzelne DNA-Fragmente zu zirkularisieren, so wird in einem 50 µl Ansatz ligiert, während man bei dem Einsetzen von Fragmenten in Vektoren in einem Reaktionsvolumen von 20 µl arbeitet. In den Ansätzen sind außer den DNA-Lösungen und Wasser noch 1/10 Volumenanteil 10 x Ligasepuffer und T4-DNA-Ligase (200 - 400 U der Ligase von New England Biolabs, bzw. 0,5 - 1 U der Ligase von Boehringer Mannheim) enthalten. Die Reaktion erfolgt 3 - 16 h bei 16°C.

10 x Ligasepuffer (New England Biolabs): 500 mM Tris-HCl, pH 7,5  
100 mM MgCl<sub>2</sub>  
100 mM DTT  
10 mM ATP  
25 µg/ml BSA

#### 3.4.15. Herstellung transformationskompetenter *E. coli* (nach M. Scott, unveröffentlicht)

Der Bakterienstamm wird auf einer LB-Platte ausgestrichen, die gegebenenfalls mit einem geeigneten Antibiotikum versetzt ist, und ÜN bei 37°C bebrütet. Eine einzelne Kolonie wird in 20 ml TYM bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,2 - 0,8 vermehrt. Die Suspension wird auf 100 ml TYM verdünnt und in einem 1 Liter-Kolben bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 gezogen. Nun wird durch sanftes Schütteln des Kolbens in einem Eis/Kochsalzbad rasch auf 0°C heruntergekühlt, bei 4000 U/min und 0°C im GSA-Rotor 15 min zentrifugiert und das Sediment vorsichtig in 100 ml TfbI suspendiert. Danach wird wie oben, jedoch nur 8 min, abzentrifugiert, der Überstand abgossen und das Sediment durch vorsichtiges Schütteln auf Eis in 20 ml kaltem TfbII suspendiert. Schließlich werden 0,1 ml Aliquots in vorgekühlte Eppendorf-Gefäße pipettiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

TYM-Medium: 2% (w/v) Bactotrypton  
0,5% (w/v) Hefeextrakt  
100 mM NaCl  
10 mM MgSO<sub>4</sub>

TfBI: 30 mM KOAc  
50 mM MnCl<sub>2</sub>  
100 mM NaCl  
10 mM MgSO<sub>4</sub>

TfBII: 10 mM MOPS pH 7,0  
75 mM CaCl<sub>2</sub>  
10 mM KCl  
10% (v/v) Glycerin

### 3.4.16. Transformation kompetenter *E. coli* (nach M. Scott, unveröffentlicht)

100 µl einer kompetenten *E. coli* Suspension werden auf Eis aufgetaut und 20 - 50 µl eines mit TE 1:5 verdünnten Ligationsansatzes vorsichtig zugemischt. Der Ansatz wird 30 min auf Eis inkubiert, 5 min auf 37°C erwärmt, erneut 2 min auf Eis gestellt und schließlich mit 0,9 ml vorgewärmten LB-Medium vermischt 45 - 60 min bei 37°C geschüttelt. Je nach eingesetzter DNA-Menge werden 50 µl bis 1000 µl Aliquots auf LB-Agarplatten mit Zusatz von Antibiotikum ausgestrichen und ÜN bei 37°C inkubiert.

### 3.4.17. Klonierung von verschiedenen NC2-Derivaten

#### 3.4.17.1. Klonierung von NC2-Deletionsmutanten

NC2 $\alpha$ - und NC2 $\beta$ -Deletionsmutanten  $\alpha$ 8-80,  $\alpha$ 8-88,  $\alpha$ 8-125 und  $\beta$ 10-129 wurden mit den entsprechenden Primerpaaren a8to13/a80, a8to13/a88, a8to13/a125 und b10to16/b129 aus der in pET15b klonierten NC2 $\alpha$  (NC2 $\beta$ )-cDNA über PCR amplifiziert. Nach Hydrolyse mit *Nde* I und *Bam*H I wurden die PCR-Produkte in ein modifiziertes pET15b-Plasmid kloniert, das mit *Nde* I und *Bam*H I geschnitten worden war, bzw. in ein pET11a-Derivat umklont.

Um die NC2-Deletionsmutanten in die Hefeexpressionsvektor (pMAC102 oder pJX14) zu klonieren, werden sie zuerst als *Nde* I/*Bam*H I-Fragmente aus dem pET15b-Vektor ausgeschnitten. Die 5'-überhängenden DNA-Enden wurden mit dem Klenow-Polymerase (beschrieben in 3.4.11) aufgefüllt. Die Fragmenten mit glatten Enden wurden anschließend in Hefeexpressionsvektor ligiert, die mit *Sma* I geschnitten und dephosphoreliert waren. Dabei wurden die Mutanten der NC2 $\alpha$  ins pMAC102 und die der NC2 $\beta$  ins pJX14 kloniert.

### 3.4.17.2. Klonierung von NC2-Punktmutanten (Mutagenese nach Kunkel *et al.*, 1987)

Für die Mutagenese nach Kunkel wird uracilhaltige Einzelstrang DNA benötigt. Dieser wird gewonnen erstens durch Transformation von kompetenten *dut<sup>-</sup>, ung<sup>-</sup> E. coli* CJ236 Zellen (Lindahl, 1974; Konrad and Lehman, 1975; Duncan *et al.*, 1978; Hochhauser and Weiss, 1978) mit Plasmid-DNA (pRCCMV-hNC2 $\alpha$  oder pRCCMV-hNC2 $\beta$ ) und zweitens durch die Infektion dieser Transformanten über F-Pilis mit dem Helferphagen M13K07 (Dotto and Zinder, 1984, Phamacia) und anschließender Einzelstrangpräparation. Der Helferphage verpackt den uracilhaltigen, einzelsträngigen, plus Strang und knospt als Phage aus der infizierten Zellen. Aus den sich im Überstand befindlichen Phagenpartikeln wird der uracilhaltige ss-Strang gewonnen.

Das Fehlen der durch *dut* kodierten dUTPase läßt die Konzentration an dUTP in Bakterienzellen CJ236 ansteigen. Dieses konkurriert dann mit dTTP um den Einbau in die DNA. Da diese Zellen durch den *ung<sup>-</sup>* nicht über das Enzym Uracil-N-Glykosidase vergnügen, wird in die DNA eingebaute Uracil nicht wieder entfernt. Dieser gewonnene uracilhaltige Einzelstrang wird im Rahmen der *in vitro*-Mutagenese mit einem am 5'-phosphorelierten Primer, das die Mutation beinhaltet, hybridisiert, welcher mit Hilfe der T4-DNA-Polymeraseverlängert und über die T4-DNA-Ligase zirkuliert wird. Die so gebildete Heteroduplex-DNA wird in einen *dut<sup>+</sup>, ung<sup>+</sup> E. coli*-Stamm SURE transformiert. Die Uracil-N-Glykosidase schädigt nun durch Entfernung der Uracilreste den parental Strang und verschafft so der gewünschte Mutante einen Selektionsvorteil in der ersten Replikationsrunde. Die so erzielte Mutageneseausbeute liegt bei höher als 50%.

- **Synthese von Einzelstrang-Phagen-DNA:** Die Präparation der Phagen-Einzelstrang-DNA erfolgt nach der Protokoll von Sambrook *et al.*, 1989.

10 ng Plasmid-DNA (pRCCMV-hNC2 $\alpha$  oder pRCCMV-hNC2 $\beta$ ) werden in die Bakterien CJ236 transformiert und auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100  $\mu$ g/ml) und Chloramphenicol (25  $\mu$ g/ml) ÜN bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen werden 3 ml 2xYT-Medium (enthält 100  $\mu$ g/ml Ampicillin und 25  $\mu$ g/ml Chloramphenicol) mit einer Bakterienkolonie angeimpft und 6 h bei 37°C, 200 rpm geschüttelt. Nach Zugabe von Helferphagen M13K07 in einer Endkonzentration von  $2 \times 10^7$  pfu/ml Medium wird die Bakterienkultur 2 h bei 37°C, 200 rpm inkubiert. Kanamycin wird in einer Endkonzentration von 70  $\mu$ g/ml zugegeben und die Kultur wird ÜN bei 37°C, 200 rpm geschüttelt.

- **Präparation der ss-DNA:** Die Bakteriensuspension wird zur Präparation der Einzelstrang-DNA bei 4°C, 1000 rpm für 15 min abzentrifugiert. Der phagenhaltige Überstand wird in ein frisches Reaktinagefaß überführt und erneute unter gleicher Bedingungen abzentrifugiert. Der zweite Überstand mit Phagenpartikeln wird gefällt durch Zugabe von 1/5 vol. 5x PEG/NaCl und eine Inkubation von 15 min bei RT. Die Phagenpartikeln werden durch eine Zentrifugation bei 14000 rpm



37,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
5 mM DTT

Zur Klonierung der NC2-Punktmutanten in die Hefeexpressionsvektor (pMAC102 oder pJX14), wurden sie zuerst als *Pst* I/*Not* I-Fragmente aus dem pRCCMV-Vektor ausgeschnitten. Die Fragmenten mit wurden anschließend in Hefeexpressionsvektor ligiert, die mit *Pst* I/*Not* I geschnitten und dephosphoreliert waren. Dabei wurden die Mutanten der NC2 $\alpha$  ins pMAC102 und die der NC2 $\beta$  ins pJX14 kloniert.

### 3.4.18. DNA-Sequenzierung

#### 3.4.18.1. DNA-Sequenzierung nach dem Dideoxy-Kettenabbruchverfahren

Die DNA-Sequenzierung wird mit einem Sequenzier-Kit der Firma Pharmacia durchgeführt, der auf dem von Sanger *et al.* (1977) entwickelten Kettenabbruchverfahren basiert. Diese Methode wurde für die Sequenzierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA modifiziert (Chen and Seeburg, 1985). Es werden die mitgelieferten "short range" Nukleotidpräparationen verwendet, die eine Sequenzierung von bis zu 500 nt pro Reaktionsansatz ermöglichen. Die Reaktionen werden leicht modifiziert nach Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

- **Denaturierung der DNA:** 2  $\mu$ g doppelsträngige Plasmid-DNA werden in 0,2 N NaOH in 10  $\mu$ l Gesamtvolumen für 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 2  $\mu$ l Primer (5 pmol/ $\mu$ l) wird die Lösung durch Zugabe von 3  $\mu$ l 3 M Natriumacetat und 5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O neutralisiert.
- **Fällen der DNA:** Nach Zugabe von 50  $\mu$ l absolutem Ethanol wird der Ansatz 10 min bei RT inkubiert, anschließend 15 min zentrifugiert (Sorvall-Kühlzentrifuge, 15.000 rpm, 4°C). Es folgt ein Waschschrift mit 70%igem Ethanol (Sorvall-Kühlzentrifuge, 5 min, 15.000 rpm, 4°C). Die gefällte DNA wird für 5 min in der Speed Vac getrocknet.
- **Annealing:** Die DNA wird in 10  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und nach Zugabe von 2  $\mu$ l Annealing-Puffer zunächst für 20 min bei 37°C inkubiert, anschließend 10 min bei RT belassen.
- **Kettenabbruch und Markierung:** Für jeden Reaktionsansatz werden je 2,5  $\mu$ l der ddNTP-Terminationsgemische in ein Reaktionsgefäß pipettiert und bei 37°C vorinkubiert. Die Markierungsreaktion der annealten DNA erfolgt durch Zugabe von 3  $\mu$ l des Markierungs-gemisches (dATP), 0,5  $\mu$ l  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dATP (10  $\mu$ Ci/  $\mu$ l) und 2  $\mu$ l T7-DNA-Polymerase (verdünnt mit Enzym-Verdünnungspuffer auf 1,6 U/  $\mu$ l). Nach fünfminütiger Inkubation bei RT werden je 4,5  $\mu$ l des

markierten Reaktionsansatzes zu den Terminationsgemischen gegeben und 5 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von je 5 µl Formamid-Auftragspuffer gestoppt. Die Proben werden kurz zentrifugiert und können bis zum Auftragen bei -20°C gelagert werden. Es werden jeweils 1,5 µl jeder Reaktion nach dreiminütigem Erhitzen auf 95°C auf ein Sequenzgel aufgetragen.

Der Annealing-Puffer, der Enzym-Verdünnungspuffer, die ddNTP-Terminationsgemische, und das Markierungsgemisch sind dem Kit beigelegt.

Formamid-Auftragspuffer:            97,5% (v/v) deionisiertes Formamid  
  10 mM EDTA pH 7,5  
  0,3% (w/v) Bromphenolblau  
  0,3% (w/v) Xylencyanol

### **3.4.18.2. (A+G)-Sequenzreaktion nach Maxam-Gilbert-Prozedure (Bencini *et al.*, 1984)**

Für die Sequenzreaktion des DNase I- bzw. [OP]<sub>2</sub>Cu<sup>+</sup>-Footprints wurden die (A+G)-Reaktion der Maxam-Gilbert-Prozedure durchgeführt. Dazu wurde mit dem "Oligonukleotide-Sequenzanalyse" Kit der Firma Merck gearbeitet. 20 µl (50 x 5 =250 fmol) einseitig 5'-markierte Doppelsträngige DNA wird mit 2 µl Carrier (Salmon sperm-DNA, 2 µg/µl) vermischt und 50 µl Ameisensäure zugesetzt. Das Gemisch wird für 3-4 min bei RT inkubiert und gestoppt mit 200 µl "ACT-Stop"-Lösung. Nach Zugabe von 1 ml 100% kaltem EtOH wird die DNA gefällt by einer Inubation auf Trockeneis für 15 min. Nach Zentrifugation bei 4°C, 1000 rpm für 10 min, wird das DNA-Pellet in 100 µl 0,3 M NaOAc aufgenommen und erneut mit 100%igem EtOH gefällt. Nach dem Waschen mit 70%igem EtOH wird das DNA-Pellet getrocknet. Das trockene Pellet wird mit 100 µl verdünnter Piperidin (frisch verdünnt 1:10 mit ddH<sub>2</sub>O) resuspendiert. Der folgende Piperidin-Verdau der DNA-Fragmente erfolgt bei 90°C für 30 min. Die Reaktion wird durch Zugabe von 400 µl Transkriptionsstop-Puffer gestoppt und die geschnittene DNA wird erneut gefällt. Nach dem Trocknen wird sie in 30 µl Formamid-Auftragspuffer aufgenommen.

Die Ameisensäure, 3 M NaOAc-Lösung, der ACT-StopPuffer, und Piperidin sind dem Kit beigelegt.

Transkriptionsstop-Puffer:        10 mM TrisHCl, pH 7,8  
  0,1 M LiCl  
  0,5% SDS  
  7 M Harnstoff  
  10 mM EDTA, pH 8,0  
  0,3 M NaOAc, pH 5,3  
  0,2 mg/ml tRNA

### **3.4.18.3. Anfertigung eines Sequenzgels und Durchführung der Gelelektrophorese**

Für die Anfertigung eines Sequenzgels werden zwei Glasplatten gründlich mit Spülmittel gereinigt, mit destilliertem Wasser abgespült und mit Ethanol trocken gerieben. Die Ohrenplatte (20 cm x 50 cm) wird mit 15 ml 5%igem (v/v) Dichlordimethylsilan (in Chloroform gelöst) eingerieben und nach kurzem Trocknen mit Ethanol poliert. Beide Platten werden dann - durch Abstandshalter (0,5 mm) getrennt - waagrecht plaziert. Nach Einsetzen des Kammes werden 60 ml einer 6% Acrylamidlösung mit 300 µl 10%igem APS und 60 µl TEMED gemischt und die Lösung sofort zwischen die Platten gegossen. Dabei ist es von Vorteil, wenn die Glasplatten am oberen Ende leicht erhöht liegen. Das Gel polymerisiert über einen Zeitraum von mindestens 1,5 h aus.

Die Elektrophorese erfolgt in einer vertikalen Apparatur bei 1500 V (20 mA). Als Laufpuffer wird 1 x TBE verwendet. Vor dem Probenauftrag erfolgt ein Vorlauf über mindestens 30 min bei 1500 V. Anschließend werden die Geltaschen mehrere Male mit 1 x TBE gespült, um den aus dem Gel herausgetretenen Harnstoff zu entfernen. Die Proben werden mit abgeflachten Pipettenspitzen aufgetragen. Für eine gleichmäßige Erwärmung des Gels während des Laufs sorgt eine vor eine Glasplatte geklammerte Aluminiumplatte. Nach der Elektrophorese wird die Ohrenplatte vorsichtig abgenommen und die Haftplatte mit dem Gel für 30 min in 10%iger Essigsäure und 20%igem MeOH eingelegt, um die DNA-Fragmente in der Gelmatrix zu fixieren. Das Gel wird auf Whatman 3MM Papier überführt, und 1 h bei 80°C (oder 2 h bei 65°C) unter Wasserstrahlvakuum getrocknet. Das Gel wird bei Verwendung von  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dATP bei RT autoradiographiert.

Gellösung:        6-13% (w/v) Acrylamid (Acrylamid: Bisacrylamid = 19:1)  
                     8 M Harnstoff  
                     in 1 x TBE  
                     Die Acrylamidlösung wird filtriert und bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

### 3.5. Protein-Arbeitstechniken

#### 3.5.1. Konzentrationsbestimmung

Proteinkonzentrationen werden nach der Methode von Bradford bestimmt. Zunächst wird eine Eichkurve mit BSA erstellt. Der Nachweis beruht auf der Beobachtung von Bradford (1976), wonach das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung von Coomassie Brilliant Blue nach Ausbildung von Proteinkomplexen von 465 nm zu 595 nm verschoben wird. Für die Eichkurve werden 1-20 µg BSA mit 1 ml 1:5 mit Wasser verdünnter und filtrierter Farblösung (Coomassie Blue, Phosphorsäure, Methanol) gemischt. Nach fünfminütiger Inkubation wird die Extinktion bei 595 nm gegenüber dem Leerwert bestimmt. Mit den Proteinproben wird analog Verfahren und die Proteinkonzentration aus der Eichkurve abgelesen. Erfahrungsgemäß ergibt sich aus einer Proteinkonzentration von 5 µg/ml eine OD<sub>595</sub> von 0,2.

### 3.5.2. SDS-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgt unter denaturierenden Bedingungen [0,1% (w/v) SDS] über eine eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Zum Gießen der Gele und für den Gellauf werden Mini-Gelapparaturen, Abstandshalter und Kämmen der Firma Hoefer verwendet. Zwei Glasplatten mit den Ausmaßen von 8 cm x 10 cm werden zunächst gründlich mit Spülmittel und einfach destilliertem Wasser gesäubert und trocken mit zwei Abstandhaltern (0,75 mm) in einer Gießapparatur vertikal fixiert. Das Trenngel wird bis zu einer Höhe von 4,5 cm zwischen beide Glasplatten mit einer dünnen Glaspipette gegossen und anschließend mit 0,5 cm einfach destilliertem Wasser überschichtet, um eine glatte Gelfront zu erhalten. Die Polymerisation des Trenngels ist nach ca. 20 min beendet. Nach Abgießen des Wassers wird das Sammelgel 2 cm hoch über das Trenngel gegossen und sofort der Kamm eingesetzt. Nach ungefähr 10 min ist die Polymerisation des Sammelgels beendet, der Kamm wird vorsichtig entfernt und das Gel in eine vertikale Gelelektrophorese-Apparatur mit 1 x TGS als Laufpuffer eingesetzt. Die Proteinlösungen werden vor dem Auftragen auf das Gel mit einem Volumenanteil 2 x SDS-Auftragspuffer gemischt, 3 min bei 95°C erhitzt und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt (Eppendorf-Zentrifuge, 2 min 14.000 rpm, RT). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 30 mA unter Wasserkühlung, bis das Bromphenolblau des Auftragspuffers den unteren Glasplattenrand erreicht hat. Anschließend wird das Gel entweder angefärbt oder auf eine Nitrocellulosemembran geblottet.

Trenngellösung [15% (1:175) für 2 Gele]

H <sub>2</sub> O	1,94 ml
30% (w/v) Acrylamid	5 ml
2% (w/v) Bisacrylamid	0,43 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	2,5 ml
10% (w/v) SDS	0,1 ml
10% (w/v) APS	33 µl
TEMED	8,3 µl

Sammelgellösung (für 2 Gele)

H <sub>2</sub> O	1,84 ml
30% (w/v) Acrylamid	0,51 ml
2% (w/v) Bisacrylamid	0,21 ml
1 M Tris, pH 6,8	0,38 ml
10% (w/v) SDS	33 µl
10% (w/v) APS	15 µl
TEMED	7,5 µl

2 x Harnstoff-SDS-Auftragspuffer:

150 mM Tris-HCl (pH 6,8)  
8 M Harnstoff  
4% (w/v) SDS  
0,5% (w/v) Bromphenolblau  
frisch zugeben: 10 mM DTT

8 x SDS-Auftragspuffer:

400 mM Tris, pH 6,8  
0,8% (w/v) SDS  
40% (v/v) Glycerin  
0,5% (w/v) BPB

5 mM DTT frisch zusetzen

### 3.5.3. Färbemethoden für Proteine

#### 3.5.3.1. Coomassie-Färbung

Um Proteine nach erfolgter PAGE sichtbar zu machen, werden sie im Gel mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Das Gel wird zunächst 20 min in Färbelösung und anschließend in Entfärbelösung geschwenkt, bis die Proteine als blaue Banden vor dem klaren Hintergrund sichtbar sind. Zum Trocknen wird das Gel luftblasenfrei zwischen zwei in Wasser getränkte, durchsichtige Cellulosefolien in einen Rahmen gespannt ("Gel Drying Kit", Promega) und über Nacht vertikal aufgestellt. Die untere Nachweisgrenze dieser Färbung liegt bei ca. 100 - 200 ng Protein.

Entfärbelösung: 40% (v/v) Methanol  
10% (v/v) Essigsäure

Färbelösung: 0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue in Entfärbelösung

#### 3.5.3.2. Silberfärbung

Mit einer Silberfärbung ("Silver Stain Kit: plus" der Firma Pharmacia Biotech) lassen sich Proteine noch im Nanogrammbereich nachweisen. Alle Arbeiten werden in sehr sauberen Plastikgefäßen durchgeführt. Das SDS-Polyacrylamidgel (8 cm x 10 cm) wird für 30 min sanft in 125 ml Fixierlösung, dann 30 min in 125 ml Sensibilisierungslösung und dreimal für je 5 min mit 100 ml deionisiertem Wasser gewaschen. Danach erfolgt die Färbung für 20 min in 125 ml Silberreaktionslösung, zweimal einminütiges Waschen in je 100 ml deionisiertem Wasser und anschließendes Entwickeln in 125 ml Entwicklerlösung. Bei Erreichen der gewünschten Farbintensität wird die Reaktion mit 100 ml Stopplösung beendet. Das Gel wird zwischen zwei in Wasser getränkte Cellophanfolien luftblasenfrei in einen Rahmen eingespannt und über Nacht getrocknet.

Fixierlösung: 50 ml Ethanol  
12,5 ml Eisessig  
62,5 ml deionisiertes Wasser

Sensibilisierungslösung: 37,5 ml Ethanol  
0,62 ml Glutardialdehyd (25% w/v)  
5 ml Natriumthiosulfat (5% w/v)  
8,5 g Natriumacetat  
auffüllen auf 125 ml mit deionisiertem Wasser

Silberlösung:	12,5 ml Silbernitratlösung (2,5% w/v) 0,05 ml Formaldehyd (37% w/v) 100 ml deionisiertes Wasser
Entwicklerlösung:	3,15 g Natriumcarbonat 0,025 ml Formaldehyd (37% w/v) auffüllen auf 125 ml mit deionisiertem Wasser
Stopplösung:	1,83 g EDTA 125 ml deionisiertes Wasser

### 3.5.4. Herstellung von Zellkernextrakten aus HeLa-Zellen

Die Präparation und die Extraktion von HeLa-Zellkernen wird in Anlehnung an das Protokoll von Dignam *et al.* (1983) durchgeführt. Es werden HeLa-Zellen einer Dichte von  $5,5 \times 10^5$  Zellen/ml aufgearbeitet. Die Zellen werden abzentrifugiert (Beckman J-6B, 10 min, 3.000 rpm, 4°C). Die Sedimente werden in wenig 1 x PBS suspendiert, vereinigt, in 50 ml Falcon Polypropylenröhrchen überführt, und erneut zentrifugiert (Heraeus, 2.500 rpm, 4°C). Das Volumen des Sedimentes (PCV, "packed cell volume") wird bestimmt, sollte jedoch unter 5 ml pro Röhrchen liegen. Ist es größer, werden die Zellen auf mehrere Röhrchen verteilt.

Ab dem folgenden Schritt werden alle Arbeiten bei 4°C im Kühlraum durchgeführt. Nach Abdekantieren des überstehenden Puffers werden die Röhrchen mit HB-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert (Heraeus, 2.500 rpm, 5 min, 4°C). Der Puffer HB liefert hypotone Bedingungen, was zum Anschwellen der Zellen führt. Das Volumen des Sediments (SCV, "swollen cell volume") sollte bei Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase zweifach höher sein als das der gepackten Zellen (PCV). Niedrigere Werte lassen darauf schließen, daß die Zellen nicht optimal gewachsen sind. Der Überstand wird vorsichtig abdekantiert, und die Sedimente werden im insgesamt vierfachen SCV an HB-Puffer suspendiert. In diesem Puffer läßt man die Zellen noch 10 min auf Eis schwellen. Der Fortgang des Anschwellens wird im Lichtmikroskop überprüft, wobei ein davor entnommenes Aliquot als Referenz dient. Anschließend wird die Suspension in einen vorgekühlten Glashomogenisator (Typ B) mit dicht sitzendem Pistill überführt. Die Zellsuspension wird durch 15 harte Stöße mit dem Pistill homogenisiert. Bei diesem Vorgang platzt die äußere Zellmembran, die Zellkerne jedoch bleiben intakt, was im Phasenkontrastmikroskop kontrolliert wird. Eine erneute Zentrifugation (Heraeus, 3.900 rpm, 15 min, 4°C) trennt die cytosolische Fraktion von den Zellkernen, die getrennt weiterverarbeitet werden.

• **Aufarbeiten des Cytosols:** Man mischt den Überstand mit 11% Volumenanteilen an 10 x Puffer, überführt die Suspension in mehrere vorgekühlte 50.2 Ti-Polycarbonatröhrchen und zentrifugiert unlösliche Bestandteile wie Membranfragmente, Mitochondrien sowie Ribosomen in der

Ultrazentrifuge ab (Beckman, 30.000 rpm, 1 h, 4°C). Das schmierige Sediment wird mit einem Spatel in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der Überstand wird in vorbehandelte Dialyseschläuche (Spektra/Por, molekulare Ausschlußgrenze 6.000 - 8.000) überführt, und für 5 h gegen 2 liter BC-100 dialysiert. Nach erneuter Zentrifugation (Sorvall, SS34, 16.000 rpm, 30 min, 4°C) wird der Überstand (jedoch ohne die auf der Oberfläche flotierende Lipidphase) aliquotiert und in Stickstoff eingefroren. Die gewonnene cytosolische Proteinlösung wird als S-100 bezeichnet.

• **Aufarbeiten der Zellkerne:** Bei der Herstellung von transkriptionsaktiven Zellkernextrakten hat es sich bewährt, über den präparierten Zellkernen ca. 3 mm des Cytosols stehenzulassen. Das Volumen der Zellkerne (NPV) wird bestimmt. Zu den Zellkernen gibt man ein halbes NPV kalten Niedrigsalzpuffer, überführt sie in den Homogenisator (Typ B), durchmischt die Suspension sechsmal vorsichtig mit dem Pistill, und legt diese Suspension in einem Plastik-becher vor. Die eigentliche Extraktion der Kerne vollzieht sich durch langsames Zutropfen eines halben NPV Hochsalzpuffers über einen Zeitraum von 30 min unter ständigem Rühren. Nach weiteren 30 min Rühren wird der Extrakt abzentrifugiert (Sorvall, SS34, 14.000 rpm, 30 min, 4°C). Das Sediment besitzt durch den hohen Gehalt an chromosomaler DNA eine gummiartige Konsistenz. Es wird in den Homogenisator (Typ B) transferiert, mit 10 ml TGME-Puffer versetzt, durch 20 Stöße mit dem Pistill homogenisiert, und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hieraus kann später RNA-Polymerase II präpariert werden. Der klare Zellkernextrakt wird in Dialyseschläuche überführt und gegen BC0 dialysiert, bis die Leitfähigkeit von BC100 erreicht ist (ca. 50 min). Es schließt sich ein letzter Zentrifugationsschritt an (Sorvall, SS34, 18.000 rpm, 20 min, 4°C), bevor der Zellkernextrakt aliquotiert in flüssigem Stickstoff eingefroren wird.

In einem typischen Ansatz werden bis zu  $1 \times 10^{10}$  Zellen aufgearbeitet. Daraus werden ca. 80 ml Zellkernextrakt einer Konzentration von 9 mg/ml sowie ca. 100 ml der cytosolischen Fraktion einer Konzentration von 11 mg/ml gewonnen.

Die Puffer werden mit Tris pH 6,8 bei RT eingestellt (entspricht pH 7,3 bei 4°C). Den BC-Puffern wird vor Gebrauch 5 mM DTT, 1 mM PMSF (Stocklösung 200 mM in DMSO) zugesetzt.

HB - Puffer:	10 mM Tris, pH 6,8 (RT) 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM KCl	10 x Puffer:	30 mM MgCl <sub>2</sub> 300 mM Tris, pH 6,8 (RT) 1400 mM KCl
Niedrigsalzpuffer:	20 mM Tris, pH 6,8 (RT) 25% (v/v) Glycerin 20 mM KCl 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,2 mM EDTA	Hochsalzpuffer:	20 mM Tris, pH 6,8 (RT) 25% (v/v) Glycerin 1200 mM KCl 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,2 mM EDTA

TGME-Puffer:	25% (v/v) Glycerin 50 mM Tris, pH 7,3 (RT) 5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,1 mM EDTA	BC0:	20 mM Tris, pH 6,8 (RT) 20% (v/v) Glycerin 0,2 mM EDTA
BC100:	20 mM Tris, pH 6,8 (RT) 20% (v/v) Glycerin 0,2 mM EDTA 100 mM KCl		

### 3.5.5. Heterologe Expression von Proteinen in *E. coli*

Die Überexpression von Proteinen in *E. coli* basiert auf dem von Studier und Moffatt (1986) entwickelten System, bei der die cDNA des Proteins unter Kontrolle des T7-RNA-Polymerase-Promotors steht. Die T7-RNA-Polymerase selbst ist durch Zugabe von IPTG induzierbar. In dieser Arbeit wurden die Expressionsplasmide pET15b und pET11a sowie die *E. coli*-Stämme BL21(DE3) bzw. BL21(DE3) pLysS (Novagen) verwendet.

- **Expression:** 250 ml TBG-M9 Medium werden mit einer Kolonie rekombinanter *E. coli* BL21(DE3) bzw. BL21(DE3) pLysS angeimpft und über Nacht bei RT geschüttelt. Am nächsten Tag wird die Kultur bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 angezogen. Bei der Expression schwerlöslicher Proteine hat es sich bewährt, die gesamte Expression bei RT durchzuführen. Die Expression des Proteins wird durch Zugabe von 0,4 mM IPTG induziert. Nach weiteren 3 h Wachstum werden die Zellen im GSA-Rotor abzentrifugiert (15 min, 3500 rpm, 4 °C) und anschließend das Naßgewicht des Bakteriensediments bestimmt. Die Zellen können vor ihrer Weiterverarbeitung an dieser Stelle in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert werden.

Der Verlauf der Induktion wird durch stündliche Probenentnahme dokumentiert. Dazu werden jeweils 0,2 ml Zellsuspension entnommen, in der Tischzentrifuge sedimentiert (30 s, 11.000 rpm, RT), und in 0,1 ml 1 x Harnstoff-Auftragspuffer aufgenommen. Die entnommenen Proben erhitzt man 5 min bei 95°C und mischt kräftig auf dem Vortex. Diese Prozedur wird zweimal wiederholt, wobei die chromosomale DNA soweit fragmentiert wird, daß die Proben ihre hohe Viskosität verlieren. Auf einem SDS-Proteingel werden jeweils 10 µl Aliquots analysiert, die einer Zelldichte von OD<sub>600</sub> = 0,6 entsprechen.

- **Denaturierende Aufarbeitung:** Zur Aufreinigung yTFIIA-Untereinheiten wt-Toa1, mt-Toa1 und Toa2 wird denaturierende Aufarbeitung eingesetzt. Man nimmt die Zellen in 5 ml Puffer A pro g Bakteriensediment auf, mischt und inkubiert 30 min bei RT unter sanftem Schwenken, bis die vollständige Lyse der Zellen eingetreten ist. Unlösliche Membran- und Lipidanteile werden

abzentrifugiert (SS34, 18.000 rpm, 15 min), der Überstand wird bei 4°C gelagert. Für die denaturierende Aufarbeitung hat es sich bewährt, ein Protein bei 37°C so stark zu überexprimieren, daß es größtenteils in den Bakterien in Einschlusskörpern eingelagert wird. Diese lassen sich durch wiederholte Ultraschallbehandlung (siehe unten) aufreinigen, da hierbei nur zelluläre Proteine in Lösung gehen, nicht aber die Einschlusskörper. Meist wird nach dreimaliger Ultraschallbehandlung ein weißes Sediment erhalten, das in 20 ml Puffer A gelöst wird.

• **Native Aufarbeitung:** Für die native Reinigung des überexprimierten Proteins suspendiert man die Bakterien in 20 ml Lysispuffer, dem folgende Proteaseinhibitoren frisch zugesetzt worden sind: AEBSF (in H<sub>2</sub>O) ad 1 mM, β-Mercaptoethanol ad 20 mM, Leupeptin (in H<sub>2</sub>O) ad 20 µg/ml, Aprotinin (in H<sub>2</sub>O) ad 10 µg/ml, Benzamidin (in DMSO) ad 20 µg/ml, TPCK (in DMSO) ad 2 µg/ml, und EDTA ad 1 mM. Auf EDTA wird verzichtet, wenn das Protein nachfolgend über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt werden soll. Alternativ zu AEBSF wird PMSF (in DMSO) ad 1 mM zugesetzt. Dieser und alle folgenden Arbeitsschritte werden im Kühlraum auf Eis durchgeführt.

Die Zellen werden mit Hilfe von Ultraschall aufgeschlossen (Branson Sonifier W 250, spitze Form r = 0,25 cm). Die Bakteriensuspension wird in einem 50 ml Falcon Polypropylenröhrchen eiskühlt zweimal 10 min bei einer Pulsdauer von 30% und einer Pulsstärke von 3-4 Einheiten auf der Geräteskala beschallt, wobei zwei Pausen von jeweils 5 min eingelegt werden. Das leicht bewegliche Lysat wird 30 min in einem SS34-Rotor zentrifugiert (30 min, 18.000 rpm, 4°C). Je ein Aliquot vom Überstand und Sediment wird für eine SDS-PAGE abgezweigt.

Optional schließt sich hier eine Ammoniumsulfatfällung an, die sich bei der Aufreinigung rekombinanter Transkriptionsfaktoren bewährt hat (Hoffmann und Roeder, 1991). Zum Überstand wird langsam ein Volumenanteil (20 ml) eiskaltes H<sub>2</sub>O unter Rühren zugegeben. Man tropft über einen Zeitraum von 30 min einen Volumenanteil (20 ml) gesättigte Ammoniumsulfatlösung unter ständigem Rühren zu (Endkonzentration 33%). Danach wird die Lösung für 1 h weitergerührt. Das Präzipitat der Fällung wird in einem SS34-Rotor abzentrifugiert (30 min, 18.000 rpm, 4°C), der verbleibende Überstand wird bei 4°C aufgehoben. Je ein Aliquot vom Überstand und Sediment wird für eine SDS-PAGE entnommen, wobei der Überstand wegen seines hohen Salzgehalts vor der Analyse gegen BC100 dialysiert werden sollte.

Puffer A:           8 M Harnstoff  
                      20 mM Tris-HCl, pH 7,3  
                      0,2 mM EDTA, pH 8,0  
                      20% Glycerol  
                      100 mM KCl

Lysispuffer:       10% (v/v) Glycerin  
                      500 mM NaCl  
                      20 mM Tris-HCl, pH 7,3  
                      0,1% (v/v) NP-40  
                      20 mM β-Mercaptoethanol

### 3.5.6. Säulenchromatographie

Für die Chromatographie werden Säulen entweder mit Austauschermaterial beschickt oder es werden bereits fertig gepackte Säulen verwendet, die an das FPLC-System oder an das SMART-System (Pharmacia Biotech) angeschlossen werden. Mit Hilfe dieser Anlagen gelingt es, die Reinigung weitgehend zu automatisieren.

Die einzelnen Chromatographieschritte werden photometrisch parallel bei Wellenlängen von 215 nm, 260 nm, und 280 nm verfolgt und die Säuleneluate fraktioniert gesammelt. Da die Dimension einer Säule von der spezifischen Bindungskapazität sowie der Proteinbeladung abhängt, werden die verwendeten Volumina an Puffer und die Flußraten auf das Säulenvolumen bezogen (CV, Säulenvolumen; CV/h, Säulenvolumen pro Stunde). Wird die Chromatographie auf dem SMART-System durchgeführt, so werden modifizierte BC-Puffer eingesetzt, die statt 20% (v/v) nur 10% (v/v) Glycerin enthalten, was die Viskosität des Laufmittels herabsetzt. Alle Puffer werden vor ihrer Verwendung durch Filtration im Wasserstrahlvakuum (Porendurchmesser des Filters: 0,45 µm) von makroskopischen Partikeln befreit. Die Elution von Ionenaustauschersäulen erfolgt, wenn nicht anders beschrieben, über einen linearen Salzgradienten von 100 mM bis zu 1000 mM KCl (bzw. NaCl) über 10 Säulenvolumen. Die Elutionsfraktionen werden in Aliquots von einem halben Säulenvolumen gesammelt. Gegebenenfalls werden die Elutionsfraktionen im Mikromaßstab dialysiert. Proben, die in SDS-PAGE oder Immunoblots analysiert werden sollen, werden ohne BSA in flüssigem Stickstoff eingefroren. Proben, die funktionell untersucht werden sollen, und deren Proteinkonzentration unter 0,5 mg/ml liegt, wird BSA bis zu einer Proteingesamt-konzentration von 0,5 mg/ml zugegeben, bevor sie in flüssigem Stickstoff eingefroren werden.

#### 3.5.6.1. Phosphocellulose-Chromatographie

Das Kationenaustauschermaterial Phosphocellulose wird in einem Fraktionierungsschema nach Roeder und Kollegen (Matsui *et al.*, 1980) als erstes eingesetzt, um die generellen Transkriptionsfaktoren und Cofaktoren in einem HeLa-Zellkernextrakt chromatographisch aufzutrennen. Phosphocellulose besitzt eine sehr hohe Proteinbindungskapazität (10-20 mg/ml) und eignet sich daher auch gut zum Konzentrieren von Lösungen mit niedrigem Proteingehalt.

- **Vorbereiten des Säulenmaterials:** Das Phosphocellulosematerial (P11, Whatman) wird mehrmals in Wasser gewaschen. Es werden 25 Volumenanteile (bezogen auf das Volumen des gequollenen Materials) 0,5 N Natronlauge zugegeben und nach 5 min über eine Fritte im

Wasserstrahlvakuum abgesaugt. Das Material wird mit Wasser gewaschen, bis der Durchlauf einen pH-Wert von 1 Liter erreicht hat. Die Phosphocellulose wird mit 25 Volumenanteilen 0,5 N Salzsäure 5 min inkubiert, die dann ebenfalls abgesaugt wird. Es schließt sich ein weiterer Waschschrift mit Wasser an, bis ein pH-Wert von 3 erreicht ist. Das Material wird über Nacht mit 1 M Tris pH 7,0 äquilibriert, bis der pH-Wert konstant bei 7,0 bleibt. Das Säulenmaterial kann so bei 4°C mehrere Wochen aufbewahrt werden.

- **Chromatographie:** Eine Leersäule ("Econo-column", BioRad) wird mit dem in BC100 äquilibrierten Phosphocellulosematerial unter Gravitationsfluß beschickt. Die Menge des eingefüllten Säulenmaterials richtet sich nach der zu ladenden Proteinmenge, wobei unter den gewählten Bedingungen ca. 50% des Gesamtproteins eines Zellkernextrakts an die Säule binden. Der Zellkernextrakt wird mit einer konstanten Flußrate von einem Säulenvolumen (1 CV/h) pro Stunde geladen (Pumpentyp P1, Pharmacia). Die Säule wird mit 10 CV BC100 bei einer Flußrate von 5 CV/h gewaschen. In drei weiteren aufeinanderfolgenden Elutionschritten werden die Phosphocellulose 0,3 M KCl-, die 0,5 M KCl- und die 0,85 M KCl-Fractionen abgetrennt. Zwischen zwei Elutionsschritten wird mit mindestens 10 CV bei einer Flußrate von 5 CV/h gewaschen. Bei der Elution einer Fraktion wird eine Flußrate von 3 CV/h eingehalten. Erfahrungsgemäß enthalten die Phosphocellulose 0,1 M KCl-Fraktion ca. 50%, die 0,3 M KCl-Fraktion ca. 35%, die 0,5 M KCl-Fraktion ca. 10% und die 0,85 M KCl-Fraktion ca. 4% des Gesamtproteins eines Zellkernextrakts.

### 3.5.6.2. DEAE-Cellulose (DE52)-Chromatographie

Das schwache Anionenaustauschermaterial DEAE-Cellulose DE52 wird meistens nach einer Phosphocellulose eingesetzt, um die Transkriptionsfaktoren weiter chromatographisch aufzutrennen. DE52 besteht aus an Cellulose gebundenen Diethylaminoethylgruppen und besitzt eine durchschnittliche Proteinbindungskapazität (4 - 10 mg/ml).

- **Vorbereiten des Säulenmaterials:** 100g DEAE-Cellulosematerial (DE52, Whatman) werden mehrmals in Wasser gewaschen und anschließend über Nacht in 500 ml Puffer (0,5 M Tris, pH 7,4; 0,5 M Ammoniumsulfat, pH 7,9) equilibriert und kann bei 4°C und 0,02% Azid mehrere Wochen gelagert werden. Nach Abziehen des Puffers über eine Fritte im Wasserstrahlvakuum wird das Material mehrfach mit BC-Puffer der gewünschten Ionenstärke gewaschen.

- **Chromatographie:** Eine Leersäule ("Econo-column", BioRad) wird mit dem in BC100 äquilibrierten DEAE-Cellulosematerial unter Gravitationsfluß beschickt. Die Menge des eingefüllten Säulenmaterials richtet sich nach der zu ladenden Proteinmenge. Die Proteinfraction wird mit einer konstanten Flußrate von einem Säulenvolumen (2 CV/h) pro Stunde geladen (Pumpentyp P1,

Pharmacia). Die Säule wird mit 10 CV BC100 bei einer Flußrate von 5 CV/h gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgt in einem Gradienten von 5-10 CV und einer Flußrate von 3-4 CV/h.

### 3.5.6.3. Sepharose-Ionenaustauscher

Die Mono Q- bzw. die Q-Sepharose-Säulen sind starke Anionenaustauscher, die quartäre Amine  $[-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3]$  als Austauschergruppen enthalten. Mono S- bzw. S-Sepharose-Säulen sind dagegen Kationenaustauscher mit Sulfonsäuregruppen  $[-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-]$  als Austauschergruppen. Diese Säulen haben sich ebenfalls als effiziente Werkzeuge zur Reinigung von Transkriptionsfaktoren erwiesen. Die hier beschriebenen Säulen sind vom Hersteller (Pharmacia-Biotech) bereits fertig gepackt. Mit dieser Methode lassen sich die rekombinanten NC2 $\beta$  und NC2 $\beta$ -Derivate aufreinigen.

### 3.5.6.4. Gelfiltration

Die Gelfiltration ist neben der Proteinreinigung auch dazu geeignet, native Größen von Proteinen (oder Proteinkomplexen) abzuschätzen. Die Superdex 75-Säule (SMART-System) wird zur Untersuchung der Dimerisierung von yTFIIA-Untereinheiten Toa1 (bzw. Toa1-Suppressormutante) und Toa2 verwendet. Sie trennt optimal im Molekulargewichtsbereich zwischen 3-70 kDa. Die Flußrate beträgt 20 - 40  $\mu\text{l}/\text{min}$  bei einem Druck von 1 - 2 MPa. Die Fraktionsvolumina betragen im allgemeinen 30 - 50  $\mu\text{l}$ . Es können bis zu 0,5 mg Gesamtprotein in einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$  aufgetragen werden. Die Gelfiltration wird mit Größenstandards bekannten Molekulargewichts geeicht. wt- und mt-Toa1 und Toa2 werden getrennt expremiert in *E. coli*. Die unlösliche Überexprimierte Proteine werden gereinigt über Einschlußkörper. Gleiche Menge von Toa1- und Toa2-Untereinheit werden co-renaturiert (beschrieben in Kapitel 3.5.5). Das molekulare Gewicht der nativen Toa1 ist 32 kDa und das der Toa2 liegt bei 13,5 kDa.

### 3.5.6.5. Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie

Als Säulenmaterial wird mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen beladene immobilisierte Nitrilotriessigsäure (NTA) verwendet, die dann spezifisch an Cluster von Histidinresten bindet (Hochuli *et al.*, 1987). Dies wird bei der Reinigung rekombinanter Proteine ausgenutzt, die als Fusionsproteine mit einem Hexahistidinrest expremiert werden.

• **Denaturierende Aufreinigung:** Alle Schritte werden bei RT durchgeführt. Die Bakterienzellen bzw. die vorgereinigten Einschlußkörper liegen gelöst in Puffer A vor (siehe Kapitel 3.5.5). Das

Beladen der in Puffer A äquilibrierten Säulenmatrix erfolgt in einem 50 ml Falcon-Gefäß durch Zugabe des Lysats und Inkubation für 1 h auf einem Drehrad. Das Säulenmaterial wird dann zentrifugiert, und dreimal in 50 ml Puffer A gewaschen (jeweils 10 min Drehrad, 3 min Heraeus Zentrifuge, 2500 rpm). Anschließend wird das Säulenmaterial mit Puffer B äquilibriert und zweimal mit 50 ml des gleichen Puffers gewaschen. In acht aufeinanderfolgenden Schritten wird durch Zugabe von jeweils einem Volumenanteil BC400 die Harnstoffkonzentration in jeden Schritt halbiert. Sobald die Proteinlösung weniger als 2 M Harnstoff enthält, wird auf Eis weitergearbeitet. Die Säulenmatrix wird abschließend in BC400 äquilibriert. Die Elution des gebundenen Proteins folgt dem im nächsten Kapitel beschriebenen Protokoll.

hTFIIA ( $\alpha\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit) wird zum Beispiel wie oben beschrieben gereinigt (bereitgestellt von AG Meisterernst).  $\gamma$ TFIIA-Untereinheiten Toa1, mt-Toa1 und Toa2 werden denaturierend getrennt in *E. coli* exprimiert und Toa1- zusammen mit Toa2-Untereinheit werden über Dialyse mit schrittweise reduzierter Harnstoff-Konzentration renaturiert. Die vorgereinigten Einschlusskörper befinden sich gelöst in Puffer A. Gleiche Menge wt-Toa1 und Toa2 oder mt-Toa1 und Toa2 werden gemischt und auf Drehrad gegen Puffer A mit 4 M Harnstoff für 6 h bei RT dialysiert. Anschließend wird die Proteinlösung gegen Puffer A mit 2 M Harnstoff ÜN dialysiert. Die aktive Proteinlösungen werden erhalten bei einer Dialyse gegen Puffer A ohne Harnstoff bei 6°C für 12 h.

• **Native Aufreinigung:** Alle Arbeiten werden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Die Proteinlösung wird mit 2 mM Imidazol versetzt auf eine  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarosesäule geladen, die in dem gleichen Puffer äquilibriert worden ist. Die gebundene Proteinfraction wird mit BC400-Puffer gewaschen, der 15 mM Imidazol enthält, und mit BC400-Puffer eluiert, der 200 mM Imidazol enthält. Die eluierten Proteinfractionen werden über SDS-PAGE analysiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80°C gelagert.

Puffer B:            8 M Harnstoff  
                      0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
                      0,01 M Tris  
                      0,1 M NaCl  
                      pH mit NaOH auf 8,0 einstellen

### 3.5.6.6. Heparin-Sepharose-Chromatographie

Im Gegensatz zu vielen Transkriptionsfaktoren bindet nur ein geringer Bruchteil der *E. coli* Proteine unter den gewählten Bedingungen an die Heparin-Sepharosematrix. Deshalb schließt sich der Nickelsäule oft eine Heparinsäule an, wenn hohe Reinheitsgrade einer Proteinpräparation gefordert sind. Mit einer Proteinbindungskapazität von 10 mg/ml eignet sich dieser

Kationenaustauscher mit den Eigenschaften eines DNA-Analogons auch gut zum Konzentrieren einer Proteinlösung.

Das Protein wird in BC200 auf das nach Herstellerangaben vorbehandelte Säulenmaterial geladen, extensiv mit dem gleichen Puffer gewaschen, und mit BC600 eluiert. Mit dieser Methode lassen sich rekombinantes NC2 $\alpha$  und NC2 $\alpha$ -Derivate effizient reinigen und anreichern.

### **3.5.6.7. Immunopräzipitation**

Durch die Immunopräzipitation läßt sich nachweisen, daß verschiedene Proteine in Lösung miteinander assoziiert sind. Zum Nachweisen der Bindungsaffinität von NC2 (NC2-Mutante) zu TBP wird Antikörper gegen einer Untereinheit von NC2 (NC2 $\alpha$ ) an eine Protein G-Säule kovalent gekoppelt. 50 ml Antikörper-Überstand, der 20-50 ng/ $\mu$ l Protein enthält wird mit 150  $\mu$ l Protein G-Beads inkubiert, dadurch wird eine Ladung von 17  $\mu$ g Proteine/pro  $\mu$ l Beads erreicht. In einer Puffergemisch mit einem Gesamtvolumen von 1 ml, werden hTBP (480 ng) und NC2 (700 und 1750 ng) für 30 min bei RT vorinkubiert bevor 10  $\mu$ l 10% NP40 und 5  $\mu$ l (großer Überschuß zum Test-Proteine) der Sepharosematrix mit gekoppelter Antikörper zugegeben werden. Die Pufferbedingungen werden so gewählt, daß sie für die Protein-Protein-Assoziation optimal ist. Die werden vorher in Gel-shift Experiment (EMSA) ausgetestet. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei RT. Der Beads werden durch kurz Anzentrifugation (RT, 2000 rpm für 3-5 min) pellettiert. Nach 3x waschen mit Inkubationspuffer inklusive 0,1% NP40 werden die gebundene Proteine mit 20  $\mu$ l SDS-Auftragspuffer durch Aufkochen eluiert. Die Anwesenheit der Test-Proteine werden in Western-Blot nachgewiesen.

## **3.6. Immunochemische Arbeitstechniken**

### **3.6.1. Western-Blot Analyse**

Der Immunoblot dient der Identifizierung eines spezifischen Antigens mittels eines polyklonalen oder monoklonalen Antikörpers, der gegen das Antigen gerichtet ist. Ein zweiter Antikörper bindet nachfolgend an eine konservierte Domäne des ersten Antikörpers, der seinerseits das spezifische Antigen erkennt. An den zweiten Antikörper ist kovalent ein Enzym gekoppelt, das durch den Umsatz seiner Substrate die Detektion des Sandwichkomplexes erlaubt. Als Nachweisreaktionen werden entweder die Bildung eines schwerlöslichen Farbstoffes oder aber die Entstehung photolabiler Komplexe verwendet, die über ihre Chemolumineszenz detektiert werden.

Zunächst werden die Proteinfractionen über SDS-PAGE aufgetrennt. Als Marker wird ein vorgefärbter Längenstandard (Bio-Rad) aufgetragen, dessen Banden bereits während der Elektrophorese erkennbar sind. Nach der Elektrophorese wird das Gel unter Transferpuffer mit einer ebenso großen, angefeuchteten Nitrocellulosemembran (0,45 µm Porengröße) bedeckt. Zwischen zwei Doppellagen angefeuchtetem 3 MM Papier (Whatman) werden die Proteine in einer Naßblotapparatur (BioRad) auf die Nitrocellulosematrix für 2 h bei 70 V (oder 20 V, ÜN) im Kühlraum transferiert. Der erfolgreiche Transfer ist an der Übertragung des vorgefärbten Molekulargewichtsstandards erkennbar. Wird alternativ ein ungefärbter Längenstandard eingesetzt, der eine exaktere Zuordnung der Größen erlaubt, kann man den Blot reversibel mit Ponceau S-Lösung anfärben. Der Blot läßt sich durch fünfminütiges Waschen mit Wasser wieder völlig entfärben.

Die Membran mit den gebundenen Proteinen wird zunächst für 30 min in TBS mit 6% (w/v) Magermilchpulver bei RT geschüttelt, um unspezifische Bindungsstellen auf der Matrix abzusättigen. Für die anschließende Inkubation mit dem ersten Antikörper werden Verdünnungen von 1:10 bis 1:1000 in TBST verwendet. Die Membran wird zweimal je 5 min mit TBST gewaschen. Der entweder an alkalische Phosphatase oder Peroxidase gekoppelte zweite Antikörper wird 1:2.000 bis 1:10.000 in TBST verdünnt eingesetzt. Nach zwei weiteren je fünfminütigen Waschschritten in TBST wird der Blot kurz getrocknet und dann entwickelt.

Der Nachweis erfolgt bei phosphatasegekoppelten Antikörpern in 10 ml AP-Puffer, dem 66 µl NBT-Lösung und 33 µl BCIP-Lösung frisch zugesetzt werden. Bei Erreichen der gewünschten Farbintensität wird die Reaktion durch Waschen des Blots in Wasser gestoppt. Der Blot wird getrocknet und lichtgeschützt aufbewahrt. Peroxidasegekoppelte Antikörper werden über eine photochemische Reaktion nachgewiesen. Dabei wird die Membran noch zwei weitere Male intensiv in TBST gewaschen und feucht für 1 min unter Lichtausschluß mit den 1:1 gemischten Reagenzlösungen (ECL Western blotting detection reagents 1 und 2, Amersham Buchler) inkubiert. Der Nachweis erfolgt durch Exposition der in Frischhaltefolie eingewickelten Membran auf einem Film in einer Autoradiographiekassette (10 Sec bis 5 Min).

Transfer-Puffer:	192 mM Glycin 25 mM Tris 20% (v/v) Methanol	BCIP:	50 mg/ml (in DMF gelöst)
TBS:	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 150 mM NaCl	NBT:	50 mg/ml (in DMF gelöst)
TBST:	0,05% (v/v) Tween-20 in TBS	AP-Puffer:	100 mM Tris/HCl, pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub>
Ponceau S-Lösung:	0,5 g Ponceau S in 1 ml Eisessig lösen H <sub>2</sub> O ad 100 ml, Lösung filtrieren		

### 3.7. Funktionelle Analysen

#### 3.7.1. Gelretardationsanalyse (EMSA)

Mit der Gelretardationsanalyse lassen sich DNA-bindende Proteine über die im Vergleich zur freien DNA geringere Mobilität von Protein-DNA-Komplexen in nativen Gelsystemen nachweisen (Fried und Crothers, 1981). Die Proteinlösung wird mit 25-50 fmol eines  $^{32}\text{P}$ -endmarkierten DNA-Fragments 30 min in Puffer N oder alternativ unter Transkriptionsbedingungen (siehe Kapitel 3.8.3) bei 28°C inkubiert. In DNA-Bindungsexperimenten werden 5-50 ng hTBP oder  $\gamma$ TBP, 1-50 ng aktive  $\gamma$ TFIIA (bestimmt durch Titration von Proteinen bei einer Überschuß von TBP und DNA in EMSA-Experiment), bis zu 200 ng NC2-Derivate und 25-75 fmol klenow-markierte 60 bp-Oligonukleotide mit HIV Corepromoter oder 90 bp-Oligonukleotide mit ML-Promoter eingesetzt. Auf diese Konzentrationen der NC2-Derivate wird im Text als Standardkonzentrationen Bezug genommen. Bei der Analyse von TBP- $\gamma$ TFIIA-DNA-Komplexen werden dem Gel 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT und dem Laufpuffer 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$  zugesetzt. Lange DNA-Fragmente (230 bp) werden in 4,5%igen (19:1) Polyacrylamidgelen, kürzere (60 bp und 90 bp) Oligodeoxyribonukleotide in 5%igen (50:1) Polyacrylamidgelen analysiert.

- **Herstellung eines nativen Polyacrylamidgels:** 50 ml der Gellösung werden mit 0,4 ml 30% (w/v) APS-Lösung und 20  $\mu\text{l}$  TEMED vermischt und zwischen die Glasplatten (20 cm x 16 cm) gegossen. Nach Einsetzen des Geltaschenformers polymerisiert das Gel für mindestens 2 h aus.
- **Gellauf:** Bei EMSA-Gelen dient 1 x TGE (evtl. mit 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) als Laufpuffer elektrophoretisiert werden. Vor dem Probenauftrag wird 2 h eine Vorelektrophorese bei 120 V, RT oder 140 V bei 6°C durchgeführt; danach wird der Laufpuffer ausgewechselt. Die Elektrophorese erfolgt bei Spannungen von 120 V bei RT oder 140 V bei 6°C über einen Zeitraum von 3 h bis 15 h. Als Laufmarker dienen BPB und XC. Doppelsträngige Oligodeoxyribonukleotide einer Länge von 60 bp laufen in 5%igen Gelen etwa auf Höhe des BPB-Markers, ein 230 bp DNA-Fragment etwa halb so schnell wie der XC-Marker. Das Gel wird nach der Elektrophorese auf ein Whatman 3 MM-Papier übertragen, mit Frischhaltefolie bedeckt und zwischen zwei Lagen saugfähigem Papier 1 h bei 80°C auf dem Geltrockner getrocknet. Für die quantitative Analyse wird das getrocknete Gel auf einem Direct Imager ausgewertet. Die Autoradiographie der bei 80°C im Wasserstrahlvakuum getrockneten Gele erfolgt bei - 80°C mit Verstärkerfolie.

Puffer N:           5 mM  $\text{MgCl}_2$   
                      5 mM DTT  
                      1 mM PMSF  
                      0,2 mg/ml BSA  
                      25 mM Hepes-KOH, pH 8,2

2,5 µg/ml pdGdC

Gellösung: 5% (w/v) (50:1) Acrylamid/Bisacrylamid  
optional 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 x TGE

10 x TGE: 250 mM Tris  
1,24 M Glycin  
10 mM EDTA, pH 8,0

• **Zirkuläre Permutationsanalyse:** Aus dem Laufverhalten von Protein-DNA-Komplexen, deren Bindungsstelle auf einem DNA-Fragment verschoben wird (zirkulär permutiert wird), kann abgeleitet werden, ob das Protein die DNA verbiegt.

Die 224 bp DNA-Fragmente stammen aus dem Plasmide pBL2-MLP, das mit den Restriktionsenzymen *Mlu* I, *EcoR* V, *Sma* I und *BamH* I hydrolysiert wurde.

### 3.7.2. DNase I-Footprinting Analyse

DNase I-Footprinting (Galas und Schmitz, 1978) von spezifisch DNA-bindenden Proteinen wird nach einer modifizierten Methode von Jones *et al.* (1987) durchgeführt. Ein Bindungsansatz enthält drei- bis fünffach höhere Konzentrationen an hTBP und yTBP als in den Gelretardationsexperimenten (Kapitel 3.7.1) und 10-25 ng yTFIIA in einem Gesamt-volumen von 20 µl. Darüberhinaus enthalten die Reaktionsansätze 0,5 µg pdGdC und 50 fmol eines durch T4-Polynukleotidkinase endmarkierten 60 bp oder 90 bp HIV-Corepromotor-fragment. Um in jedem Ansatz die gleiche DNase I-Aktivität zu erhalten, empfiehlt es sich, die Proteinkonzentration jeweils durch Zugabe von BSA anzugleichen. Die Bindungsansätze werden 1:3 mit Verdünnungspuffer verdünnt, 2 min bei RT inkubiert, mit 0,15% (v/v) DNase I-Lösung (0,4 mg/ml) und 1 min bei RT inkubiert. Die Verdünnung ist zum einen notwendig, um den Prozentsatz des Glycerins (bis zu 20% (v/v) Endkonzentration) aus den Proteinlösungen zu senken, und zum anderen, um die Proteinkonzentration (bis zu 1,5 µg/ml) zu erniedrigen. Die Bedingungen werden so gewählt, daß etwa 50% der DNA einmal durch DNase I genickt werden. Nach dem DNase I-Verdau werden die Proben wie in den Transkriptionsreaktionen prozessiert (siehe Kapitel 3.7.4.) und über denaturierende Sequenzgel analysiert.

Verdünnungspuffer: 10 mM HEPES-KOH, pH 8,2  
0,5 mg/ml BSA  
5 mM CaCl<sub>2</sub>  
50 mM KCl  
50 µg/ml pdGdC

### 3.7.3. Im Gel Footprinting Analyse mit 1, 10-Phenanthrolin-Kupfer Ion kombiniert mit Gel-Retardationsanalyse (Papavassiliou, A.G. 1994)

Alternative zu DNase I-footprinting Analyse, wird Kupfer-*o*-Phenanthrolin (OP-Cu), eine effiziente chemische Nuklease eingesetzt. Der 1,10-ortho-Phenanthrolin-Kupfer (I)-Komplex ( $[\text{OP}]_2\text{Cu}^+$ ) lagert sich an die kleine Furche der DNA-Doppelhelix und führt zur DNA-Spaltung nach einem komplexen Mechanismus, bei dem überwiegend das C1'-Atom der Desoxyribose angegriffen wird. Es kommt zu Eliminierung des Nukleotids zwischen zwei Phosphaten und führt dadurch zur Lückenbildungen im DNA-Rückgrat. Da Footprinting mit OP-Cu außerdem stark abhängig von der Konformation der DNA ist, kann deshalb OP-Cu auch zur Analyse der lokalen Veränderungen der DNA-Struktur eingesetzt werden.

Das Footpringmuster mit OP-Cu ist in Prinzip ähnlich wie dasjenige mit DNaseI, weil beide in der kleinen Furche der DNA sich lagern und somit die Protein-DNA-Wechselwirkung in der kleinen Furche ermitteln. Gegenüber DNase I hat OP-Cu den Vorteil, daß es eine kleinere Molekül ist, und somit auch die Grenzbereiche von DNA und gebundenen Proteine, die sonst wegen gegenseitiger sterischer Behinderung zwischen Proteine und DNase I maskiert bleiben, auflösen kann.

Eine Kombination der Footprinting-Technik mit Gelretardationsanalyse führt zur Reduktion der starken Hintergrund, der durch unvollständigen Bindung der Proteine zustande kommt. Und die Durchführung der Nukleasenbehandlung im Gel statt in Lösung bietet ein zusätzliche Vorteil mit sich, da der Gelmatrix ein Kompartiment für die Protein-DNA-Komplex dient und eine Dissoziation der Proteine von DNA verhindert.

Dazu werden zunächst die Bindungsreaktionen mit Proteine und DNA unter standard Shift-Bedingungen durchgeführt. Die Protein-DNA-Komplexen und die freie DNA-Fragmente werden in nativen Polyacrylamidgele aufgetrennt. Nach dem Lauf, wird das Gel von den Glasplatten abgetrennt und in 200 ml 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) äquilibriert. Folgende Lösungen werden frisch eingesetzt: 58 mM 3-Mercaptopropionsäure (MPA), 40 mM 1,10-Phenanthrolin (OP) und 9 mM  $\text{CuSO}_4$ . Davon werden 1 ml OP-Lösung und 1 ml  $\text{CuSO}_4$  zusammengepipettiert, und 18 ml  $\text{H}_2\text{O}$  zugesetzt. Diese 20 ml OP/ $\text{Cu}^{2+}$ -Lösung wird zu 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 zugegeben und durch Schwenken zugemischt. Die chemische Nukleasenreaktion wird gestartet durch Zugabe von 20 ml MPA-Lösung. Nach einer Inkubation für 10 min. bei 37°C wird Reaktion gestoppt durch Zufügen von 20 ml frisch eingesetzte  $(\text{OP})_2\text{Cu}^+$ -Stopplösung (28 mM 2,9,-Dimethyl-1,10-Phenanthrolin). Das Gel mit geschnittenen DNA-Fragmente wird vorsichtig 3 mal mit Bidestriliertem  $\text{H}_2\text{O}$  ausgespült, in frischhalte Folien eingepackt. Die Autoradiographie der DNA-Banden erfolgt bei in Kühlraum (6°C) für 30-60 min.

Nach den Signale auf Röntgenfilm werden die entsprechende Banden für Protein-DNA-Komplexen und für freie DNA mit einem sauberen Scapel aus dem Gel ausgeschnitten, die Gelstückchen werden in Gel-Elutionspuffer (0,5 M Ammoniumacetat) gelegt. Die Elution der DNA

aus den Gelblöckchen erfolgt in 37°C Heizblock, geschüttelt für ÜN. Am nächste Morgen werden die Überstände mit DNA mit 100% EtOH gefällt. nach dem Waschen und Trocken in 6-8 µl Formamid-Auftragspuffer aufgenommen. Die Probe werden analysiert in 10% Polyacryamidgel unter denaturierenden Bedingungen.

#### **3.7.4. *In vitro*-Transkription in einem rekonstituierten RNA-Polymerase II-System**

Wenn nicht anders beschrieben, enthält eine *in vitro*-Transkriptionsreaktion die generellen Transkriptionsfaktoren [10 ng rekombinantes TFIIE $\alpha$  und 10 ng rekombinantes TFIIE $\beta$ ; 0,8 µl natives TFIIH; 0,1 µl RNA-Polymerase II aus Kalbsthymus; 1 µl in Baculoviren exprimiertes TFIIF (je 10 ng der Untereinheiten Rap30 und Rap74); 20 ng rekombinantes TFIIB; 40 ng rekombinantes TFIIA ( $\alpha\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten); 4 ng rekombinantes TBP, natives TFIID, oder 1 µl affinitätsgereinigtes Holo-TFIID], gegebenenfalls Transkriptions-aktivatoren und Cofaktoren, acetyliertes BSA und 20 U RNase-Inhibitor in einem Endvolumen von 20 µl.

Alternativ zu diesem hochgereinigten Transkriptionssystem wird in einem grob gereinigten System gearbeitet, das aus der Phosphocellulose 0,3 - 0,5 M KCl-Fraktion (4 µg Protein) und der 0,5 - 0,85 M KCl-Fraktion (2,5 µg Protein) rekonstituiert wird. Darüberhinaus enthält eine Reaktion 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM Hepes-KOH (pH 8,2), 5 mM DTT, 1 mM PMSF sowie 20-100 ng Matrizen-DNA, die zusammen als "DNA-Mix" in den einzelnen Reaktionsgefäßen vorgelegt werden.

Die Matrize pMRG5 (Kretzschmar *et al.*, 1994), welche in den Abbildungen mit HIV bezeichnet wird, enthält stromaufwärts von den bis Position - 8 liegenden HIV-1 Promotor-sequenzen 5x GAL4-Bindungsstellen. Von -7 bis +9 folgt das Adenovirus Major Late Initiatorelement und eine 379 bp lange G-freie Kassette. pML $\Delta$ 53 (in den Abbildungen ML genannt) enthält den Major Late Corepromotor von Position -53 bis +9, gefolgt von einer verkürzten ungefähr 280 bp langen G-freien Kassette.

Die generellen Transkriptionsfaktoren werden kurz vor der Reaktion zu einem "Faktormix" vermischt. Üblicherweise werden als erstes Transkriptionsaktivatoren und Cofaktoren mit dem DNA-Mix gemischt, dann erfolgt die Zugabe des System-Mixes. Nach 30 min Inkubation bei 28°C wird die Reaktion durch Zugabe von 1 µl des Ribonukleotid-Mixes gestartet.

Die Transkriptionsreaktion wird für weitere 60 min bei 28°C inkubiert. Danach stoppt man durch Zugabe von 0,4 ml Stopp-Puffer, extrahiert einmal mit Chloroform, und fällt mit 0,4 ml eiskaltem Isopropanol für mindestens 1 h bei -20°C. Einer 30 minütigen Zentrifugation (4°C, 11.000 rpm) schließt sich das Waschen des Präzipitats mit 0,8 ml eiskaltem 70% Ethanol an. Der getrocknete Niederschlag wird in 10 µl Formamid-Auftragspuffer aufgenommen und durch 15 minütige Inkubation bei 50°C gelöst.

DNA-Mix: 50 - 100 ng Matrizen-DNA

	BC-Puffer mit variablem KCl-Gehalt H <sub>2</sub> O
Cofaktor	variabel

Die Komponenten des Faktor-Mixes werden in der hier angegebenen Reihenfolge zusammenpipettiert:

Ribonukleotid-Mix:	0, 2 µl OmG-Mix 0,8 µl α-[ <sup>32</sup> P]-CTP (3000 Ci/mmol)
OmG-Mix:	10 mM ATP 10 mM UTP 0,5 mM CTP 2 mM 3'-O-Methylguanosin-5'-triphosphat
Stopp-Puffer:	7M Harnstoff 10 mM Tris/HCl, pH 7,8 10 mM EDTA/NaOH, pH 8,0 0,5% (w/v) SDS 100 mM LiCl 0,1 mg/ml tRNA 300 mM NaAc
Formamid-Auftragspuffer:	97% Formamid (deionisiert auf Dowex) 20 mM Tris/HCl pH 7,0 10 mM EDTA/NaOH pH 8,0 0,1% (w/v) BPB; 0,1% (w/v) XC

Komponente	Volumen	Salzgehalt [mM KCl]
RNase Block	0,5 µl	50
BSA (20 mg/ml)	0,5 µl	
TFIIEα (Ni <sup>2+</sup> -NTA-Fraktion)	0,2 µl	400
TFIIEβ (Ni <sup>2+</sup> -NTA-Fraktion)	0,2 µl	400
TFIIH (DE52-Fraktion)	0,8 µl	120
TFIIF (coexprimiertes RAP30, RAP74, Superose 12-Fraktion)	0,2 µl	100
RNA-Polymerase II (DE52-Fraktion)	0,1 µl	100
TFIIB (Heparin/Sepharose-Fraktion)	0,2 µl	400
TFIID (DE52-Fraktion)	0,8 µl	400
bzw. Holo-TFIID (affinitätsgereinigt)	0,5 µl	400
bzw. TBP (Heparin-Sepharose-Fraktion)	0,1 µl	400
TFIIA (corenaturierte αβ und γ-Untereinheiten, Ni <sup>2+</sup> -NTA-Fraktion)	0,5 µl	100

• **Elektrophorese der Proben auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel:** Die Proben werden auf einem 5%igen denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgel (20 cm x 16 cm Glasplatten, 1,5 mm Abstandshalter) aufgetrennt. Zu 50 ml der Gellösung werden 0,4 ml einer 30%igen (w/v) APS-Lösung gegeben. 5 ml dieser Mischung werden mit 20 µl TEMED versetzt und daraus ein Sockel gegossen. Nach Auspolymerisieren des Sockels mischt man die restliche Gellösung mit 20 µl TEMED, gießt die Gellösung zwischen die Glasplatten, setzt den Geltaschenformer ein, und läßt das Gel für 2 h auspolymerisieren. Nach 30 min Vorlauf bei 50 mA werden die Proben aufgetragen und für ca. 90 min bei 50 mA elektrophoretisiert. Das Gel wird abgenommen, 15 min in 10%iger (v/v) Essigsäure fixiert, 5 min mit destilliertem Wasser gespült, auf 3MM Whatmanpapier übertragen und 1 h bei 70°C auf dem Geltrockner getrocknet. Die Autoradiographie erfolgt über Nacht mit einer Verstärkerfolie.

Gellösung:                   5% (w/v) (19:1) Acrylamid/Bisacrylamid  
                                  1 x TBE  
                                  8 M Harnstoff

### **3.8. DNA-Arbeitstechniken in Hefe *Saccharomyces cerevisiae***

#### **3.8.1. Transformation von Plasmid-DNA in die Hefen**

##### **3.8.1.1. Transformation mit Lithiumacetat**

Nach einer von Ito *et al.*, (1983) beschriebenen Methode lassen sich Hefenzellen durch die Behandlung mit Lithium-Ionen besonders gut transformationskompetent machen. Es wurde ein modifiziertes Protokoll von Schiestl and Gietz (1989) angewendet.

Die Hefen werden in ihrem Selektionsmedium angeimpft und ÜN bei 30°C inkubiert. Diese Vorkultur wird am nächsten Tag in 50 ml YPD-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 - 0,2 verdünnt und für 4-5 h bei 30°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 vermehrt. Die Zellen werden abzentrifugiert (2000 rpm, 5 min, RT) und in 10 ml H<sub>2</sub>O gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wird das Pellet mit 5 ml Lithiumacetat-Puffer (LiOAc) gewaschen und nochmals zentrifugiert. Nun wird das Pellet in 1 Vol. LiOAc-Puffer resuspendiert, für 30 min bei 30°C inkubiert, wobei die Zellsuspension mehrmals durchgemischt wird. In der Zwischenzeit wird die zu transformierte Plasmid-DNA (2-10 µg) in einem Eppendorfgefäß vorgelegt. Um eine höhere Transformationseffizienz zu erreichen, kann bis zu 50 µg Carrier-DNA (gescherte und denaturierte Salmon Sperm DNA) zugegeben werden. Pro Transformationsansatz wird 100 µl Hefesuspension mit der DNA gemischt und dann 700 µl PEG-Lösung vorsichtig mit der Pipette untergemischt. Der homogene Transformationsansatz wird 30 min bei 30°C unter leicht Schütteln inkubiert. Nach einem 15-minütigem Hitzeschock bei 42°C werden die Zellen abzentrifugiert, das Zellpellet in 1 ml Sorbitol vorsichtig resuspendiert. Auf

Selektionsplatten werden Aliquots von 100-500  $\mu$ l ausplattiert und die Platten bei 30°C für 2 - 5 Tage inkubiert.

LiOAc-Puffer:           100 mM LiOAc, pH 8,0  
                          10 mM Tris-HCl, pH 7,5  
                          1 mM EDTA, pH 8,0

PEG-Lösung:           100 mM LiOAc, pH 8,0  
                          10 mM Tris-HCl, pH 7,5  
                          1 mM EDTA, pH 8,0  
                          40% PEG 4000

Der LiOAc-Puffer sowie die PEG-Lösung wurden jeweils frisch aus den 10x konzentrierten Stammlösungen hergestellt.

### 3.8.1.2. Hoch-effiziente Transformationsmethode

Es wurde in 1996 von *Gietz und Schiestl* auf ihrer Homepage im Internet ([www.umanitoba.ca/faculties/medicine/units/human\\_genetics/gietz/method.html](http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine/units/human_genetics/gietz/method.html)) eine modifizierte Methode der Lithiumacetat-Transformation (*Gietz et al.*, 1995) präsentiert, die eine sehr hohe Effizienz ermöglicht.

Die Hefen werden ÜN im Selektionsmedium bei 30°C angeimpft und am nächsten Morgen in 50 ml YPD auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 eingestellt. Nach ca. 4 h bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 werden die Hefen geerntet, einmal in H<sub>2</sub>O gewaschen und einmal mit 1 ml 100 mM LiOAc, pH 8,0. Die Zellen werden in 400  $\mu$ l 100 mM LiOAc resuspendiert damit ein Endvolumen bei 500  $\mu$ l (entspricht eine Zelldichte von  $2 \times 10^9$  Zellen/ml) liegt. Die Hefesuspension wird zu 50 - 100  $\mu$ l Aliquotiert und erneut abzentrifugiert. Auf das Pellet werden in folgender Reihenfolge 240  $\mu$ l PEG, 36  $\mu$ l 1,0 M LiOAc, und 25  $\mu$ l Carrier-DNA (2 mg/ml, denaturiert) zupipettiert, und anschließend mit H<sub>2</sub>O auf einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l aufgefüllt. Das Gemisch wird für mehr als 1 min auf dem Vortexer gemischt. Dann werden die Ansätze für 30 min bei 30°C inkubiert, wobei sie alle 10 min einmal durch Schwenken gemischt werden. Diese folgt ein Hitzeschock bei 42°C für 20-25 min. Anschließend werden die Hefen pelletiert, in 1 ml 1 M Sorbitol aufgenommen und mit Aliquots von 50 - 200  $\mu$ l auf den Selektionsplatten ausplattiert. Nach 2 - 3 Tagen Inkubation bei 30°C können Einzelkolonien von den Platten umgestrichen und verwendet werden.

### 3.8.1.3. Carrier-DNA

Zur Präparierung der Carrier-DNA wurden 20 mg Salmon-Sperm-DNA in 10 ml 1x TE unter starkem Rühren im Kühlraum über Nacht gelöst. Die gelöste und gescherte DNA wird à 500 µl aliquotiert und bei - 20°C eingefroren. Vor jeder Transformation wird ein Aliquot auf Eis aufgetaucht, für 5 min aufgekocht und dann sofort auf Eis abgeschreckt.

### 3.8.2. DNA-Isolierung aus Hefen

#### 3.8.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen (Hoffman and Winston, 1987)

Aus 2 ml Übernachtskulturen von Hefen konnte genügende Plasmide-DNA isoliert werden, um sie dann in Bakterien zu retransformieren.

Die Hefenzellen in stationärer Wachstumsphase werden abzentrifugiert bei 4000 rpm, RT für 5 min. Nach dem Waschen mit H<sub>2</sub>O wird der Überstand verworfen und die Zellen werden in der restlichen Flüssigkeit durch Vortexen resuspendiert. Dazu werden 0,2 ml Hefe-Lysispuffer und 200 µl Glassperlen zugegeben. Das Gemisch wird für 2 min lang stark gevortext, und es folgt eine Zentrifugation bei 4000 rpm, RT für 5 min. Der Überstand mit Plasmid-DNA wird in neues Eppendorfggefäß überführt.

Für weitere Elektroporation in *E. coli* KC8 Stamm (zur spezifische Selektion von Trp-Plasmid) oder SURE, wird der Überstand vorher 1:2 mit H<sub>2</sub>O verdünnt wegen der zu hoher Salzgehalt, die eine Elektroporation stören kann. 2 µl der verdünnten Überstand wird in 80-100 µl elektrokompente *E. coli*-Zellen durch Elektroporation transformiert, auf Minimal-Agarplatten für KC8 oder auf LB-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Nach eine Inkubation bei 37°C für ÜN werden Einzel-Kolonien ausgebildet. 2 ml LB-Medium mit Ampicillin wird durch einer Einzel-Kolonie angeimpft, und eine Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wird angeschlossen (beschrieben in Kapital 3.4.5.)

Hefe-Lysispuffer:                                2% Triton X-100  
   1% SDS  
   100 mM NaCl  
   10 mM Tris-HCl, pH 8,0  
   1 mM EDTA, pH 8,0  
   0,2 ml Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25:24:1)

Minimal-Agarplatte für KC8:                15 g Difco Minimalagar  
   4,5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 3H<sub>2</sub>O  
   10,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
   1,0 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
   0,5 g Na<sub>3</sub>Citrat x 2 H<sub>2</sub>O wurden in 970 ml H<sub>2</sub>O autoklaviert und auf 55°C abgekühlt  
   24 mg Uracil  
   24 mg Histidin  
   24 mg Leucin in 15 ml H<sub>2</sub>O (gelöst durch Wärmen und steril filtriert)

1,0 ml 1 M  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$   
5 ml 40% Glukose-Lösung (extra autoklaviert)  
1,0 ml 1% Thiamin (Vitamin B1)-Stammlösung (frisch eingesetzt)  
100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin

### 3.8.2.2. Isolierung genomischer DNA aus Hefen

Für eine schnelle Isolierung genomischer DNA aus Hefen wurde ein von Amersham (Life Science) verwendet.

5 ml einer ÜN-Kultur von Hefen werden abzentrifugiert, einmal mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und in 540  $\mu\text{l}$  Lösung A resuspendiert. Nach Zugabe von 60  $\mu\text{l}$  Lösung B wird der Ansatz für 30 sec gevortext und dann 10 min bei  $70^\circ\text{C}$  inkubiert. 300  $\mu\text{l}$  Lösung C wird zugegeben, gemischt und der Ansatz wird für 5 min auf Eis abgekühlt. Nach 5 min Zentrifugation mit maximaler Geschwindigkeit (14 000 rpm) bei RT wird die DNA aus dem klaren Überstand mit 600  $\mu\text{l}$  Isopropanol gefällt und durch analoge Zentrifugation pelletiert. Das pellet wird mit 70 % eiskaltem EtOH gewaschen und anschließend in 50  $\mu\text{l}$  Lösung D resuspendiert.

Lösung A, B, C und D sind dem Kit mitgeliefert.

## 3.9. Genetische Methoden zur Charakterisierung von Hefezellen

### 3.9.1. Kreuzung haploider Hefezellen

Haploide Hefen unterscheiden sich in ihrem Paarungstyp, der in *Mata* oder *Mat $\alpha$*  bezeichnet wird. Nur Zellen mit entgegengesetzten Paarungstypen können zu einer Zygote fusionieren, aus der eine diploide Hefezelle hervorgeht. Wie Haploiden können sich die diploiden Zellen mitotisch teilen und vermehren. Unter stickstoffmangeligen Bedingungen können sich Diploiden auch meiotisch teilen und bringen dann vier haploide Ascussporen hervor, die wiederum zu vegetativen Haploiden auskeimen können. Die Diploidisierung leitet damit die sexuelle Fortpflanzung ein und ist bei einer gezielten Kreuzung zweier Haploiden das Mittel zur Generierung einer Nachkommen mit neuer Kombination der Gene aus beiden Elternstämmen.

Zur Kreuzung werden Zellsuspension aus logarithmischen Kulturen auf Selektionsmedium, auf dem die beiden haploide Ausgangsstämme nicht wachsen können, aufeinander getropft. Dies setzt voraus, daß sich die beiden Stämme in jeweils einem Selektionsmarker unterscheiden, der durch die Diploidbildung vom jeweiligen Allel des Partners komplementiert wird. Zur Kontrolle werden die

haploide Stämme ebenfalls auf das Selektionsmedium ausgestrichen. Diploidisierung wird durch das Wachstum kleiner Kolonie im Bereich der eingetrockneten Zellsuspensionstropfen angezeigt.

Bei fehlender Positivselektion auf das Diploidisierungsereignis lassen sich die Kreuzung auch auf YPD-Platte durchzuführen. Dies folgt eine Überstempel der ausgewachsenen Ausstriche auf Selektionsmedium um die wirklichen Diploden zu selektionieren.

### **3.9.2. Sporulation diploider Hefezellen**

Die Sporulation diploider Hefestämme wurde in Flüssig- oder Festmedium durchgeführt. Eine diploide Hefekultur wurde ÜN in flüssigem Medium bei 30°C angezogen. Nach dem Wachsen mit H<sub>2</sub>O werden die Zellen in 200 µl Minimal-Sporulationsmedium aufgenommen und entweder direkt auf eine Minimal-Sporulationsplatte getropft oder in 20 ml flüssigem Medium bei 30°C für 5 Tage geschüttelt. Dann konnte die Bildung von Asci unter dem Mikroskop überprüft werden.

Bei Hefestämme, die schwer sporulierten wurden die Hefen zunächst für 1 - 2 Tage in Präsporulationsmedium inkubiert und dann entweder auf Sporulationsmedium oder auf Minimal-Sporulationsplatten transferiert.

Minimal-Sporulationsmedium:	1% KOAC, pH 7,6
Präsporulationsmedium:	0,8% Hefeextrakt 0,3% Bacto-Pepton 10% Dextrose
Sporulationsmedium:	1% KOAC, pH 7,6 0,1% Hefeextrakt 0,05% Glukose oder Galaktose

### **3.9.3. Sporenfreisetzung und Tetraden-Analyse**

Nach der Sporulation von diploiden Hefenzellen liegen die Sporen nicht frei vor, sondern als Viererverbände (Tetraden), die von einer Ascuswand umgeschlossen sind. Die Ascuswand wird zur Freisetzung der Sporen enzymatisch mit Glusulase oder Zymolyase behandelt. Zur gezielten Analyse der Sporen werden Tetraden mit Hilfe des Mikroskops auf YPD-Platten gelegt, diese wiederum auf unterschiedlichen Selektionsplatten überstempelt werden können.

Für die Tetraden-Analyse werden die Sporen von einer Platte abgekratzt, in 10 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und 5 min mit 5 - 10 µl Glusulase bei RT inkubiert. Nach der enzymatischen Reaktion werden die Sporen zweimal gewaschen mit H<sub>2</sub>O und auf einer YPD-Platte an einer Seite

ausgestrichen. Am Mikromanipulator wird eine einzelne Tetrade mit der Nadel aufgenommen und auf eine bestimmte Position (Registrieren mit Hilfe der Monitor) der Platte hingelegt. Dort wird der Ascusverband durch Klopfen der Nadel aufgebrochen und jede der vier Sporen auf eine andere spezifische Stelle der Platte gelegt. Alle vier Sporen einer Tetrad werden gewöhnlich auf einer Reihe untergebracht, um mit den anderen Tetraden zu unterscheiden. Die YPD-Platten werden bei 30°C inkubiert. Nach einem oder mehreren Tagen konnte das Keimen der Sporen und die Ausbildung von Zellverbänden beobachtet werden.

Die unterschiedlichen Genotypen (Phänotypen) der einzelnen Spore einer Tetrade können durch replikative Überstempel der ausgewachsenen Hefeklone auf verschiedenen Selektionsplatten ermittelt werden.

### 3.9.4. Paarungstypsbestimmung

Jeder haploide Hefeklon, der durch Kreuzung erzeugt wurde, muß neben seinen phänotypisch erfaßbaren genetischen Markern auch hinsichtlich seines Paarungstyps charakterisiert werden.

Für diese Analyse stehen Testerstamm zur Verfügung, die Detektion des Paarungstyps auf Platten ohne Zusatz jeglicher Aminosäuren oder Nukleosiden ermöglichen. Üblicherweise werden die Stämme KL14-4 (*Mata*) und IL993-5C (*Mat $\alpha$* ) als Testerstämme verwendet.

Zur Paarungstypsbestimmung wurden logarithmisch wachsende Kulturen der Testerstämme auf OM-Medium ausplattiert. Frische Einzelkolonie-Ausstriche der zu definierten Stämme wurden mittels Replikaplattierung auf beide Testerstämme übergestempelt und die Platten für 3 - 5 Tagen bei 30°C inkubiert. Die Diploidbildung sollte nur mit einem der beiden Testerstämme erfolgt sein, d.h. der zu definierende Stamm hat dann den entgegengesetzten Paarungstyp.

OM-medium: 0,67 % Yeast Nitrogen base w/o Aminoacids  
2 % Glukose (extra autoklaviert)  
2 % Bacto-Agar

### 3.9.5. Suppressor-"Screen" zum Suchen von funktionell relevanten Faktoren in Hefe

Die funktionelle relevanter Genen können durch ein Suppressor-"Screen" *in vivo* z.B. in Hefe identifiziert werden. Vorausgesetzt ist eine oder mehrere ausgeprägte Phänotypen, die durch Mutationen in dem Zielgen hervorgerufen wurden. Typische für solche Phänotypen sind Temperatur-Sensitivität, Wachstumsdefekt und Nährstoff-Auxotrophie.

Aus den langsam wachsenden Hefe-Klone mit NC2 $\beta$ -Defizienz wurde eine Suppressor-Screen durchgeführt. 8 x 10 ml YPD-Flüssigmedium wird mit je einer der langsam wachsenden Kolonien

angeimpft, geschüttelt bei 30°C für 2-3 Tagen bis zur exponentionellen oder stationellen Wachstumsphase. Von diesen Flüssigkulturen, werden jeweils  $\approx 10^7$  Zellen auf einer YPD-Platte ausplattiert und inkubiert bei 30°C. Nach 2 - 3 Tagen sind die Kolonien von Ausgangsstämme noch nicht sichtbar. Zu sehen sind die Kolonien von spontanen Suppressoren, die das normale Wachstumsrate der Hefen wiederherstellen. Jedes Suppressor-Klon könnte eine andere Mutation tragen. Insgesamt wurden 53 Suppressor-Klone aus diesem "Screen" isoliert.

### **3.9.6. Temperatursensitivitätsbestimmung**

Die Wildtyp-Hefen zeigen ein breites Temperatur-Spektrum fürs vegetativen Wachstum (14-37°C). Temperatursensitivität ist einer der typischen Phänotypen, die durch Mutationen in Hefezellen verursacht werden. Um die Phänotyp verschiedener Hefezellen gegenüber Temperatur zu bestimmen, wurden sie parallel zum Vergleichstamm (Wildtyp-Hefe) auf drei YPD-Platten ausgestrichen, und je eine Platte wird bei einer anderen Temperatur inkubiert: 16°C, 30°C oder 37°C. Nach 2-7 Tagen konnte das Wachstumsverhalten der Hefen gegenüber Temperatur festgestellt werden.

### **3.9.7. Tropftitertest**

Eine Einzelkolonie von einer frisch berühten Kulturplatte (nach ca. 2 Tagen) wird mit einer Impföse abgekratzt und in 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert. Um die Zellklumpen-Bildung zu vermeiden, wird die Hefesuspension durch kurzes Vortexen gemischt. Von dieser Suspension wird eine Verdünnungsreihe bis zu  $10^{-5}$  angelegt; dazu werden je 10  $\mu\text{l}$  der Suspension entnommen und zu 90  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  vermischt. Jede Verdünnungsstufe wird gut gemischt bevor sie für die nächste Verdünnungsstufe Zellen entnommen wird. Je 5  $\mu\text{l}$  der Verdünnungen werden auf markierte Stellen einer Testplatte aufgetropft. Nachdem die Zellsuspensionen getrocknet sind, werden die Platten bei 30°C für 2 - 5 Tagen inkubiert.

Beim Auftragen verschieden Hefestämme zum Vergleich, werden die erste Zellsuspension aus Einzelkolonie durch  $\text{OD}_{600}$ -Messungen genau ausgeglichen, um eine identische Menge der Zellen zu gewährleisten.

### **3.10. Proteinextraktion aus *Saccharomyces cerevisiae***

Zur Proteinextraktion aus Hefen, können die Zellen enzymatisch mit Zymolyase oder mechanisch mit Glasperlen aufgeschlossen werden.

### 3.10.1. Aufschluß mit Zymolyase

100 ml einer logarithmisch wachsenden Kultur wurde bei einem OD<sub>600</sub>-Wert von 0,8 - 1,0 abzentrifugiert, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und in 10 x Vol. Aufschlußpuffer I aufgenommen. Der hohe Gehalt an DTT diente dazu die Zymolyase zu aktivieren. Diese Zellsuspension wird bei RT für 30 min inkubiert. Die Zellen werden dann abzentrifugiert und erneut in 2 x Vol. Aufschlußpuffer mit 1 mM DTT aufgenommen. Nach Zusatz von 50 µl Zymolyase-Lösung (10 mg/ml) wird die Zellsuspension für 30 - 60 min. bei 37°C inkubiert. Eine Bildung von Sphäroblasten werden unter dem Mikroskop kontrolliert. Bei leichter Viskosität, spricht für ausreichende Aufschlußeffizienz wird zur Lyse der Zellen und Zellkerne 1/5 Vol. 2,5 M NaCl zugesetzt. Die hohe viskose Lösung wird bei 20.000 rpm, 4°C für 20 min. abzentrifugiert und der Überstand als Proteinrohextrakt bei - 80°C eingefroren.

Aufschlußpuffer I:      100 mM NaCl  
                              25 mM Hepes-NaOH, pH 7,5  
                              5 mM EDTA, pH 8,0  
                              10 % Glycerin  
                              30 mM DTT

### 3.10.2. Mechanischer Aufschluß mit der Schwingmühle

Um die Protein-Expression im Western blot nachzuweisen, wurden aus einer ebenfalls logarithmisch wachsenden Hefekultur durch mechanischen Aufschluß mit Glasperlen mit Durchmesser von 0,5 - 0,7 mm Rohextrakt hergestellt.

Die Kultur wird abzentrifugiert, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und in 1 Vol eiskaltem Aufschlußpuffer II aufgenommen. In einem 2 ml Eppendorfgefäß werden 1,5 ml kalte Glasperlen vorgelegt, 200 µl Zellsuspension und 200 µl Aufschlußpuffer II zugegeben und gemischt. Das Gefäß wird in die Schwingmühle eingespannt und 20 min. bei voller Leistung geschüttelt. Danach wird das Eppendorfgefäß im Boden mit einer Kanüle angestochen, in ein 15 ml Rundboden-Röhrchen eingesetzt und durch Zentrifugation (1.500 rpm, 4°C, 1 min) die flüssigkeit eluiert. Die Glasperlen werden nochmal mit 200 µl Aufschlußpuffer II gewaschen und abzentrifugiert. Die Eluate werden vereinigt und bei 20.000 rpm, 4°C für 20 min abzentrifugiert. der klare Überstand wird als Proteinrohextrakt in neues Gefäß überführt und bei - 80°C weggefroren.

Aufschlußpuffer II:      500 mM NaCl

50 mM HEPES-NaOH, pH 7,9  
1 mM EDTA, pH 8,0  
10% Glycerin  
5 mM DTT

### **3.11. Computeranalysen**

Für Computer- und Homologie-Analysen wurde der BLAST-Algorithmus des NCBI verwendet (Altschul *et al.*, 1990). Zur Herstellung der Kristallstrukturen von Histonen und  $\gamma$ TFIIA-TBP-DNA-Komplex wurde der Programm Rasmol 2.7.1 und Swiss-Pro eingesetzt.

Schüttelinkubator	(250 mm x 10 mm, Porengröße 300 Å) (Vydac)
SMART-System	ISF-1-V, Adolf Kühner AG
Sonifikator	Pharmacia LKB
Spannungsgeräte	Branson Sonifier W250
	Modell PowerPac 3000, BioRad
	Microcomputer Electrophoresis Power Supply, E432, E734, CONSORT
	Power Supply PS 250-2, Sigma
Speed Vac	Vacuum Concentrator, Bachofer
Spinnergefäße	Wheaton, Witeg
Sterile Werkbank	Typ UVF 6.12 S, BDK
Stickstofftank	Typ XLC-230, MVE Cryogenics
Thermocycler (PCR-Maschine)	Perkin Elmer
	Robocycler, Stratagene
UV-Illuminatoren	Bachofer (254 nm, 366 nm)
Vortex	Vortex Genie, Bender & Hobein
Wasserbäder	Haake
	GFL
Zentrifugen	Beckmann J6 MC
	Heraeus Varifuge 3.OR
	Hettich EBA 3S Tischzentrifuge
	Eppendorf-Zentrifuge 5417
	Sigma 2K15
	Sorvall RC 5Bplus
	Sorvall RC 5Cplus

## 2.2. Chemikalien und Biochemikalien

Acetonitril	Merck
Acrylamidlösung 40%, Rotiphorese Gel 40	ICN
Acrylamidlösung 30%, Rotiphorese Gel 30	Roth
Acrylamidlösung 30%, Rotiphorese Gel A	Roth
Adeninsulfat	Sigma
Agarose	Gibco BRL
Ammoniak	Riedel-de Haën
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Merck
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Ammoniumsulfat (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Merck
Ampicillin	Boehringer Mannheim
Aprotinin	Boehringer Mannheim
Bacto Agar	Difco
Bacto Pepton	Difco
Bacto Trypton	Difco
Bacto Yeast Extract	Difco
Benzamidin	Sigma
Bisacrylamidlösung 2%, Rotiphorese Gel B	Roth

Bradford-Reagenzlösung	BioRad
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (BCIP)	Promega
Bromphenolblau	Merck
BSA-Lösung, 10 mg/ml	New England Biolabs
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck
Chloroform	Riedel-de Haën
Coomassie Brilliant Blue G-250	Sigma
DEAE-Cellulose DE52	Whatman
Deoxyribonukleosidtriphosphate	USB
Dextrose	Difco
Dichlordimethylsilan	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva
Dithiothreitol (DTT)	Boehringer Mannheim
Einzelstrang-DNA-Agarose	Sigma
Essigsäure	Riedel-de Haën
Ethanol	Roth
Ethanolamin	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Merck
Ethylenglykol	Serva
5-Fluororotsäure (5-FOA)	Bts
Fötale Kälberserum (FCS)	PAN Systems
Formamid	Merck
Freund'sches Adjuvans (komplett und inkomplett)	Sigma
G418-Sulfat	Calbiochem
Gen 32-Protein	Boehringer Mannheim
Glukose	Merck
Glutathion-Sepharose 4B	Pharmacia
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Guanidiniumhydrochlorid	Merck
Harnstoff	Merck
Heparin-Sepharose	Pharmacia
HEPES	Biomol
Imidazol	Merck
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Merck
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Boehringer Mannheim
Joklik-Medium (Festschubstanz)	Gibco
Kaliumacetat (KOAc)	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
Kupfersulfat-Pentahydrat (CuSO <sub>4</sub> • 5H <sub>2</sub> O)	Sigma
Lithiumchlorid (LiCl)	Sigma
Lithiumacetat (LiOAc)	Clontech
Leupeptin	Boehringer Mannheim
L-Arginin	Sigma
L-Aspartat	Sigma

L-Glutamat	Sigma
L-Histidin	Sigma
L-Leucin	Sigma
L-Lysin	Sigma
L-Methionin	Sigma
L-Phenylalanin	Sigma
L-Serin	Sigma
L-Threonin	Sigma
L-Tyrosin	Sigma
L-Tryptophan	Sigma
L-Uracil	Sigma
L-Valin	Sigma
Magermilchpulver	Frema
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Merck
Manganchlorid (MnCl <sub>2</sub> )	Merck
Methanol	JT Baker
β-Mercaptoethanol (β-MSH)	Merck
3-Mercaptopropionsäure (MPA)	Sigma
γ-(Methacryloxy)propyl-trimethoxysilan	Sigma
Methylenbisacrylamid	Sigma
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Newborn Calf Serum (NCS)	Gibco
Ni <sup>2+</sup> -NTA-Agarose	Qiagen
Nitro-Blau-Tetrazolium (NBT)	Promega
Nonidet P40 (NP-40)	Sigma
Nukleotide-Basen (Uracil, Adenin)	Sigma
2,9-Dimethyl-1,10-Phenanthrolin-Monohydrat	Sigma
1,10-Phenanthrolin-Monohydrat (OP)	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Phosphocellulose (P11)	Whatman
Polyethylenglykol (PEG) 4000, 6000, 8000	Serva
50% PEG	Clontech
Polyoxyethylensorbitan Monolaurat (Tween 20)	Sigma
Ponceau S	Sigma
Ribonuklease-Block	Promega
Ribonukleosidtriphosphate	USB
Rinderserumalbumin (BSA)	Boehringer Mannheim
tRNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Roth
Roti-Phenol/Chloroform Lösung	Roth
RPMI 1640-Medium (Festschubstanz)	Gibco
Salzsäure (HCl, 37%)	Riedel-de Haën
Salmon sperm-DNA (ssDNA)	Sigma
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth

Streptavidin-Agarose	Sigma
Tetracyclin	Boehringer Mannheim
N-Tosyl-L-Phenylalanin-chlormethyl-Keton (TPCK)	Sigma
N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TEMED)	Serva
Thiamin (Vitamin B1)	Sigma
Trishydroxymethyl-aminoethan (Tris)	Sigma
Triton X-100	Sigma
Xylencyanol	BioRad
Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids (YNB)	Difco
Zinkchlorid (ZnCl <sub>2</sub> )	Merck

### 2.3. Radiochemikalien

$\gamma$ -[ <sup>32</sup> P]-ATP	Amersham Buchler
$\alpha$ -[ <sup>32</sup> P]-CTP	ICN
$\alpha$ -[ <sup>32</sup> P]-dATP	Amersham Buchler

### 2.4. Enzyme

Caseinkinase II	Boehringer Mannheim
CIP (alkalische Phosphatase)	New England Biolabs
DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)	Boehringer Mannheim
Lysozym	Sigma
Lyticase	Sigma
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
	MBI Fermentas
Taq-DNA-Polymerase	Promega
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Promega
T4-Polynukleotidkinase	New England Biolabs
Pfu-DNA-Polymerase	Stratagene
Zymolyase	Medac

### 2.5. Antikörper

anti-hNC2 $\beta$ /Dr1 aus Kaninchen	Eigenproduktion
anti-hNC2 $\alpha$ aus Ratte	Eigenproduktion

anti-TBP aus Kaninchen	R. G. Roeder (Rockefeller University, New York)
anti-p62 (TFIIH) aus Kaninchen	Eigenproduktion
anti-p89 (TFIIH) aus Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology
anti-Toa2 aus Kaninchen	S. Hahn (Fred Hutchinson cancer Research Center)
anti-IgG Kaninchen (HRP-Konjugat)	Promega
anti-IgG Kaninchen (AP-Konjugat)	Promega
anti-IgG Maus (HRP-Konjugat)	Promega
anti-IgG Maus (AP-Konjugat)	Promega
anti-IgG Ratte (HRP-Konjugat)	Dianova

## 2.6. Lösungen, Puffer und Kulturmedien

### 2.6.1. Lösungen und Puffer

<b>10 x TBE:</b>	1 M Tris 1 M Borsäure 20 mM EDTA	<b>20 x PBS:</b>	160 g NaCl 4 g KCl 23 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O ad 1000 ml pH 7,2 bis 7,4
<b>10 x TGS:</b>	250 mM Tris 1,92 M Glycin 1 % (w/v) SDS	<b>10 x TE:</b>	100 mM Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA (pH 8,0)
<b>10 x M9:</b>	39 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 30 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 g NH <sub>4</sub> Cl H <sub>2</sub> O ad 1000 ml	<b>BC-Puffer:</b>	20 mM Tris-HCl (pH 7,3) 1 mM EDTA 0 - 2000 mM KCl 20 % (v/v) Glycerin frisch zugeben: 1 mM PMSF, 5 mM DTT bzw. 20 mM β-MSH
<b>10x LiOAc:</b>	1 M LiOAc, pH 7,5		

### 2.6.2. Kulturmedien

<b>LB-Medium:</b>	1 % (w/v) Bacto Trypton 0,5 % (w/v) Bacto Yeast Extract 0,5 % (w/v) NaCl 1,5 % (w/v) Bacto-Agar (nur für Festmedien) pH 7,5
-------------------	---

**TBG-Medium:** 5,0 g Trypton  
2,5 g NaCl  
H<sub>2</sub>O ad 500 ml

**TBG-M9-Medium:** 440 ml TBG  
50 ml 10 x M9  
0,5 ml 1 M MgSO<sub>4</sub> (sterilfiltriert)  
10 ml 20 % (w/v) Glukose (sterilfiltriert)  
100 µg/ml Ampicillin bzw. 25 µg/ml Chloramphenicol

**YPD-Medium:** 1 % Bacto Yeast Extract  
2 % Bacto Pepton  
2 % Glukose  
(2 % Bacto Agar für Platen)  
Zur selektion auf das Kanamycin-Gen als selectionsmarker für Disruptionen wurde dem YPD-Medium 200 µg/ml aktives Geneticin (G418) zugesetzt.

**Minimal-medium:** 0,67 % Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids  
2 % Glukose  
(2 % Bacto Agar für Platen)  
+ Aminosäuren und Nukleotiden (Endkonzentration in µg/ml, wurden steril filtriert und dann zugegeben):

Adeninsulfat	40	L-Phenylalanin	50
L-Arginin	20	L-Serin	375
L-Aspartat	100	L-Threonin	200
L-Glutamat	100	L-Tyrosin	30
L-Histidin*	240	L-Tryptophan*	40
L-Leucin*	60	Uracil*	20
L-Lysin	30	L-Valin	150
L-Methionin	20		

\* wurde je nach Transformationsansatz nicht zugegeben, um auf das entsprechende Plasmid zu selectionieren.

**5-FOA-Platen** (Boeke, J.D. *et al.*, 1984 und 1987): 7 g Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids  
1 g 5-Fluororotsäure  
50 mg Uracil  
20 g Glukose  
H<sub>2</sub>O ad 500 ml, sterilfiltriert, zugegeben zu 4% Agar in  
500 ml, autoklaviert und abgekühlt auf 65°C.

**Presporulation-Medium:** 10 g Bacto Yeast Extract  
30 g Bacto Pepton  
50 g Dextrose  
H<sub>2</sub>O ad 1000 ml

**Sporulation-Medium:** 1.25 g Bacto Yeast Extract  
10 g KOAc  
H<sub>2</sub>O ad 1000 ml

**Joklik-Medium, RPMI-Medium:** Die Medien werden nach Herstellervorschrift aus pulverförmigen Fertigmischungen bereitet. Vor Gebrauch werden die Medien jeweils frisch mit L-Glutamin (ad 2 mM), und FCS bzw. NCS ad 5% (v/v) supplementiert.

## 2.7. Molekularbiologische Hilfsmittel

Dialysefilter (0,025 µm Porendurchmesser)	Millipore
ECL Western Blot Kit	Amersham Buchler
Einwegplastikmaterial	Greiner
	Nunc
Filme	Kodak X-Omat, XAR5
	Hyperfilm-ECL, Amersham Buchler
Chromatographiesäulen	BioRad
Nitrocellulosemembran (0,45 µm)	BioRad
Nitrocelluloserundfilter (BA85)	Schleicher & Schüll
Nylonmembran	Hybond-N <sup>+</sup> , Amersham Buchler
Silver Stain Kit: plusone	Pharmacia
Sterilfilter (0,22 µm)	Millex-GP, Millipore
Ultrafree-Filtereinheit	Millipore
Whatman 3MM Papier	Bender & Hobein
Zentrifugalfilter (0,22 µm)	Ultrafree-MC, Millipore

## 2.8. Baktrienstämme

<i>E. coli</i> SURE (Greener, 1990)	<i>e14<sup>-</sup> (mcrA), Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)177, sbcC, recB, recJ, umuC::Tn5 (kan<sup>r</sup>), supE44, gyrA96, relA1, lac, thi-1, endA1, uvrC [F'proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>, lacI<sup>q</sup>ZΔM15, Tn10 (tet<sup>r</sup>)]</i> (Stratagene)
<i>E. coli</i> DH5α (Hanahan, 1985)	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(rk<sup>-</sup>. mk<sup>+</sup>), supE44, relA1, Δ[argF-lacZYA]U169, φ80dlacZΔM15, λ<sup>-</sup>, F<sup>-</sup></i>
<i>E. coli</i> KC8 (Zervos <i>et al.</i> , 1993)	<i>pyrF::Tn5, hsdR, leuB600, trpC9830, lacΔ74, strA, galK, hisB436</i>
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>F<sup>-</sup> ompT r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> (DE3) (Novagen)

(Studier und Moffat, 1986)

*E. coli* BL21 (DE3) pLysS

F<sup>-</sup> *ompT* r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup> (DE3) pLysS (Cm<sup>r</sup>)

(Studier und Moffat, 1986)

*E. coli* CJ236 (Sambrook *et al.*, 1989)

*dut-1*, *ung-1*, *thi-1*, *relA1*, pCJ105 (Cm<sup>r</sup>, F')  
(Invitrogene)

## 2.9. Hefestämme

Stamm	Genotyp	Referenz
MY1	<i>Mata</i> , <i>trp</i> Δ1, <i>ura3-52</i> , <i>gcn4</i> Δ, <i>leu2::PET56</i> , <i>gal2</i>	Hope and Struhl, 1986
MY2	isogenetisch zum MY1 außer <i>Mat</i> α	Collart and Struhl, 1994
MY4	isogenetisch zum MY1 außer <i>Mat</i> α, <i>his3::TRP1</i>	J.Xie <i>et al.</i> , 2000
MY1780	isogenetisch zum MY1 außer <i>ync2b::KAN</i> + <i>pURA3-ync2b</i>	J.Xie <i>et al.</i> , 2000
MY1781	isogenetisch zum MY1780 außer <i>Mat</i> α	J.Xie <i>et al.</i> , 2000
MY1784	isogenetisch zum MY2 außer <i>ync2a::KAN</i> + <i>pURA3-ync2a</i>	J.Xie <i>et al.</i> , 2000
MY1791	isogenetisch zum MY2 außer <i>his3::TRP1</i> , <i>ync2a::KAN</i> , <i>ync2b::KAN</i> + <i>pURA3-ync2a-ync2b</i>	J.Xie <i>et al.</i> , 2000
JY20	isogenetisch zum MY1 außer <i>ync2b::KAN-pMAC102-hNC2b</i>	J.Xie <i>et al.</i> , 2000
MY1802	isogenetisch zum JY20 außer <i>toa1-2</i>	J.Xie <i>et al.</i> , 2000
MY1855	isogenetisch zum JY20 außer <i>Mat</i> α, <i>his3::TRP1</i>	J.Xie <i>et al.</i> , 2000
MY1870	isogenetisch zum MY1 außer <i>toa1-2</i>	J.Xie <i>et al.</i> , 2000
MLY542	a/α diploid isogenetisch zum MY1 außer <i>his3::TRP1/HIS3</i>	J.Xie <i>et al.</i> , 2000
MLY31	isogenetisch zum MY542 außer <i>ync2a::KAN/ync2a</i>	J.Xie <i>et al.</i> , 2000
MLY462	a/α diploid <i>toa1::URA3/TOA1</i> , <i>HIS3/his3::TRP1</i>	J.Xie <i>et al.</i> , 2000
MLY465	<i>Mata</i> , <i>toa1::URA3</i> , <i>his3::TRP1</i> + pML83	J.Xie <i>et al.</i> , 2000
MLY504	<i>Mata</i> , <i>toa1::URA3</i> , <i>his3::TRP1</i> , <i>ync2b::KAN</i> + pML83	J.Xie <i>et al.</i> , 2000
IL993-5C	<i>Mat</i> α, <i>ilv5</i>	Wolf <i>et al.</i> , 1973
KL114-4A	<i>Mata</i> , <i>his1</i> , <i>trp2</i>	Wolf <i>et al.</i> , 1973

## 2.10. DNA- und Protein-Größenstandards

### 2.10.1. DNA-Größenstandards

1) Längenstandard VI (pBR328-DNA geschnitten mit *Bgl* I und *Hinf* I), Boehringer Mannheim

Fragmentlängen in [bp]: 2.176, 1.766, 1.230, 1.033, 653, 517, 453, 394, 298, 234, 220, 154

## 2) Kilobasen (kb) DNA-Leiter, Gibco BRL

Fragmentlängen in [bp]: 12.216, 11.198, 10.180, 9.162, 8.144, 7.126, 6.108, 5.090, 4.072, 3.054, 2.036, 1.636, 1.018, 517, 506, 396, 344, 298, 220, 201, 154, 134, 75

### 2.10.2. Protein-Größenstandards

- 1) SDS-PAGE Protein-Standard, niedriger Bereich BioRad  
 2) SDS-PAGE Protein-Standard, hoher Bereich BioRad

Zusammensetzung und Molekulargewichte der SDS-PAGE-Standards:

Protein	Molekulargewicht (Daltons)	Protein Standard niedriger Bereich	Protein Standard hoher Bereich
Myosin	200.000		X
β-Galaktosidase	116.250		X
Phosphorylase B	97.400	X	X
Serum Albumin	66.200	X	X
Ovalbumin	45.000	X	X
Carboanhydrase	31.000	X	
Trypsin-Inhibitor	21.500	X	
Lysozym	14.400	X	

- 3) Vorgefärbter SDS-PAGE Protein-Standard, niedriger Bereich BioRad  
 4) Vorgefärbter SDS-PAGE Protein-Standard, weiter Bereich BioRad

Zusammensetzung und ungefähre Molekulargewichte (in Daltons) der vorgefärbten SDS-PAGE Standards:

Protein	Protein Standard niedriger Bereich	Protein Standard weiter Bereich
Myosin		203.000
$\beta$ -Galaktosidase		118.000
Phosphorylase B	106.000	
Serum Albumin	80.000	86.000
Ovalbumin	49.500	51.600
Carboanhydrase	32.500	34.100
Trypsin-Inhibitor	27.500	29.000
Lysozym	18.000	19.200
Aprotinin		7.500

## 2.11. Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pBS SK (+)	Klonierung	Alting-Mees and Short, 1989
pET15b	<i>E. coli</i> Expressionsvektor	Rosenberg <i>et al.</i> , 1987; Studier <i>et al.</i> , 1990
pET11a	<i>E. coli</i> Expressionsvektor	Rosenberg <i>et al.</i> , 1987; Studier <i>et al.</i> , 1990
pET15b-hNC2 $\alpha$ 1–77	Expression in <i>E. coli</i>	Goppelt <i>et al.</i> , 1996
pET15b-hNC2 $\alpha$ 8–80	Expression in <i>E. coli</i>	Goppelt <i>et al.</i> , 1996
pET15b-hNC2 $\beta$ 1–83	Expression in <i>E. coli</i>	Goppelt <i>et al.</i> , 1996
pET15b-hNC2 $\beta$ 1–112	Expression in <i>E. coli</i>	Goppelt <i>et al.</i> , 1996
pML $\Delta$ 53	<i>in vitro</i> -Transkription	Meisterernst <i>et al.</i> , 1991
pMRG5	<i>in vitro</i> -Transkription	Kretzschmar <i>et al.</i> , 1994
pRS424	Hefe-Expressionsvektor	Christianson <i>et al.</i> , 1992
pRS425	Hefe-Expressionsvektor	Christianson <i>et al.</i> , 1992
pMac102	Plasmid-Shuffling Vector, <i>ADHI</i> -Promotor, <i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>Amp</i>	Xie <i>et al.</i> , 2000
pRS424–1	Plasmid-Shuffling Vector, <i>ADHI</i> -Promotor, 2 $\mu$ , <i>TRP1</i> , <i>Amp</i>	Xie <i>et al.</i> , 2000
pJX1	Wildtyp- <i>hNC2a</i> in pMAC102	Xie <i>et al.</i> , 2000
pJX3	Wildtyp- <i>hNC2b</i> in pMAC102	Xie <i>et al.</i> , 2000
pJX4	<i>hnc2a</i> (Aminosäuren 8-88) in pMAC102	Xie <i>et al.</i> , 2000
pJX5	<i>hnc2a</i> (Aminosäuren 1-77) in pMAC102	Xie <i>et al.</i> , 2000
pJX6	<i>hnc2a</i> (Aminosäuren 8-125) in pMAC102	Xie <i>et al.</i> , 2000
pJX23	<i>hnc2a</i> (Aminosäuren 8-80) in pMAC102	Xie <i>et al.</i> , 2000

pJX14	Plasmid-Shuffling Vector, <i>ADHI</i> -Promotor, 2 $\mu$ , <i>TRP1</i> , <i>Amp</i>	Xie <i>et al.</i> , 2000
pJX8	Wildtyp- <i>hNC2b</i> in pJX14	Xie <i>et al.</i> , 2000
pJX9	<i>hNC2b</i> (Aminosäuren 1-83) in pJX14	Xie <i>et al.</i> , 2000
pJX20	<i>hNC2b</i> (Aminosäuren 1-112) in pJX14	Xie <i>et al.</i> , 2000
pJX26	<i>hNC2b</i> (Aminosäuren 10-129) in pJX14	Xie <i>et al.</i> , 2000
pML83	<i>toa1</i> ( <i>V251F</i> ) in pBS SK (+)	Xie <i>et al.</i> , 2000
pJX27	<i>toa1</i> ( <i>V251F</i> ) in pET15b	Xie <i>et al.</i> , 2000
pJX43	<i>hNC2b S52R</i> in pET15b	diese Arbeit
pJX42	<i>hNC2b E45K</i> in pET15b	diese Arbeit
pJX51	<i>hNC2a A33E</i> in pET15b	diese Arbeit
pJX24	<i>hNC2a DE24,25GN</i> in pET15b	diese Arbeit
Plasmid	Beschreibung	Referenz
PJX39	<i>hNC2a FL24,25LT</i> in pET15b	diese Arbeit
pJX19	<i>hNC2b S52R</i> in pJX14	diese Arbeit
pJX18	<i>hNC2b E45K</i> in pJX14	diese Arbeit
pJX15	<i>hNC2b P14R</i> in pJX14	diese Arbeit
pJX16	<i>hNC2b K20P</i> in pJX14	diese Arbeit
pJX17	<i>hNC2b E37K</i> in pJX14	diese Arbeit
pJX10	<i>hNC2a A33E</i> in pMAC102	diese Arbeit
pJX12	<i>hNC2a DE24,25GN</i> in pMAC102	diese Arbeit
pJX13	<i>hNC2a FL45,46LT</i> in pMAC102	diese Arbeit

## 2.12. Oligodeoxyribonukleotide

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz
250	EMSA	5' - CCCTCAGATG CTGCATATAA GCAGCTGCTT
	Footprint	TTTGCCCGTC CTCACTCTCT TCCGCATCGC -3'
251	EMSA	5' - GCGCTGCGGA AGAGAGTGAG GACGGGCAAA
	Footprint	AAGCAGCTGC TTATATGCAG CATCTG -3'
792	EMSA	5' - GCGATGCGGA AGAGAGTGAG GACGGGCAAA
	Footprint	AAGCAGCTGC TTATATGCAG CATCTGAGGG GGATCCTGGG GACGTCCCCG AATTCC -3'

---

793	EMSA	5' - GGTTGGAATT CGGGGACGTC CCCAGGATCC
	Footprint	CCCTCAGATG CTGCATATAA GCAGCTGCTT
		TTTGCCCGTC CTCACTCTCT TCCGCATCGC -3'
T7down	Sequenzierung	5' - GCTAGTTATT GCTCAGCGG -3'
Nde-TOA1-upper	PCR	5' - GGGAATTCCA TATGTCGAAT GCAGAGG -3'
TOA1-BamHI-lower	PCR	5' - CGGGATCCTA TACCCACTCC GCTTC -3'
Pet11aprimer	PCR	5' - GTGAGCGGAT AACAATTC -3'
bS52R	Mutagenese	5' - AATCTCATTG GCTTCTCTAG ATATAAGGTG
		AATGAATTC -3'
bE45K	Mutagenese	5' - TATAAGGTGA ATGAATTTAG TGCAGCAGTT
		CACCACCAG -3'
bP14R	Mutagenese	5' - AATTGATAGCA GCTCTGCGGA TAGTGAGATC
		ATCATCGTTG -3'

---

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz
bK20P	Mutagenese	5' - AGTCTCTTTG ATCATTGGAT TGATAGCAGC TCTGGGGATA G -3'
bE37G	Mutagenese	5' - GCAGTTCACC ACCAGCCCTC GAGCATCGTT GGCCACCCG -3'
aA33E	Mutagenese	5' - GATGATGACA GGCACCTCCG CCGCCACCTT CCCAATCTC -3'
aDE24,25GN	Mutagenese	5' - CACCTTCCCA ATCTCGTTGC CCGTCTGCAT GATCTTCTTG ATC -3'
aFL45,46LT	Mutagenese	5' - CTTCAACAGC GACTCTGTCA AGAGCTCGAG CGCCCGGGAG ATG -3'
b97	Mutagenese	5' - GCGGATCCTC ATACTGTTTT ACACTCTTGC AAGAC -3'
b112	Mutagenese	5' - CGCGGATCCT CAGCCAAGGT TTTCCAAAC -3'
b129	Mutagenese	5' - GCGGATCCTC AAGCTTTTGC AAATAATTCT TGTTG -3'
a88	Mutagenese	5' - GCGGATCCTC ATGCCACCAG GTCCTTCAAG AAG -3'
a125	Mutagenese	5' - GCGGATCCTC ATCCCATCCC ACCGTTCTTC C -3'

## 3. Methoden

---

### 3.1. Kultivierung von Bakterien

#### 3.1.1. Anzucht von Bakterienkulturen

Alle Arbeiten mit Bakterien werden unter einer sterilen Werkbank oder direkt neben einer Bunsenbrennerflamme durchgeführt. Kunststoffgeräte wie Reaktionsgefäße und Pipetten-spitzen werden autoklaviert. Glaswaren werden bei 180°C für 3 h trocken autoklaviert. Platinösen werden in offener Flamme durch Ausglühen sterilisiert, andere hitzebeständige Geräte oder Gefäße durch kurzes Abflammen keimfrei gemacht. Die Anzucht der Bakterienkulturen erfolgt in sterilen Reagenzgläsern. *Escherichia coli* wird in Flüssigkultur unter guter Belüftung bei 37°C im Schüttler inkubiert; dies erfolgt entweder in LB-Medium oder in einem mit einem Antibiotikum versetzten LB-Medium.

Auf Festmedien wird *E. coli* mit einer sterilen Platinöse im Verdünnungsausstrich überimpft und bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Antibiotika:	Ampicillin 100 µg/ml	Stammlösung	100mg/ml in H <sub>2</sub> O
	Tetracyclin 12,5 µg/ml	Stammlösung	12,5 mg/ml in 70% EtOH
	Kanamycin 70 µg/ml	Stammlösung	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O
	Chloramphenicol 25 µg/ml	Stammlösung	34 mg/ml in 100% EtOH

Festmedien: 1,5% (w/v) Bacto-Agar in LB-Medium

#### 3.1.2. Anlegen von Dauerkulturen

Für Dauerkulturen von *E. coli* werden 1 ml einer stationär gewachsenen Bakterienkultur abzentrifugiert und das Zellpellet mit 500 µl sterilem, 20%igem Glycerin (v/v) in LB-Medium vermischt und in 2 ml Nunc-Reaktionsgefäßen mit Schraubdeckeln bei - 80°C eingefroren.

### 3.2. Kultivierung höherer eukaryontischen Zellen

#### 3.2.1. Zellenvermehrung in Suspension

Alle Arbeiten werden unter Laminarfluß mit autoklavierten oder sterilfiltrierten Lösungen, autoklavierten Glaswaren und mit vom Hersteller entkeimten Kunststoffmaterialien sowie Nährmedien durchgeführt. Die teilweise adhärenenten HeLa-Zellen werden in Joklik-Medium, bei

37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit gehalten. Das Medium wird mit 5% FCS (v/v), 2 mM L-Glutamin sowie 75 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin supplementiert. Vor Gebrauch wird das FCS 30 min bei 55°C hitzeinaktiviert. HeLa-Zelllinien werden bis zu einem Kulturvolumen von 200 ml in Medium hochgezogen, welches 200 g/ml Neomycin (G418) enthält. Bei größeren Volumina in Spinnergefäßen (10 Liter) wird auf diese Selektion verzichtet. Die 8wq16-Hybridomasuspensionszellen werden in RPMI 1640-Medium gehalten, das entweder mit 5% (v/v) FCS oder 2% (v/v) Ultrosor-Lösung supplementiert wird. Die Haltung erfolgt in horizontal gelagerten Zellkulturflaschen oder Spinnergefäßen auf Magnetrührern. Suspensionszellen werden jeden Tag 1:2 verdünnt und so bei einer konstanten Zelldichte von  $5,5 \times 10^5$  Zellen/ml gehalten. Bei logarithmischem Wachstum verdoppelt sich die Zelldichte bei 37°C in 24 h. In einer Neubauer-Zählkammer werden unter dem Lichtmikroskop die Zellen gezählt. Alle kontaminierten Einwegmaterialien werden autoklaviert und dann dem Abfall zugeführt. Mediumreste werden durch Hypochlorid-Lösung sterilisiert.

### **3.2.2. Anlegen von Dauerkulturen**

Für Dauerkulturen eukaryontischer Zellen wird eine logarithmisch wachsende Suspensionskultur abzentrifugiert (Heraeus, 1500 rpm, 5 min). Es werden je  $1 \times 10^7$  Zellen mit 1 ml eiskaltem Freeze-Medium aufgenommen, und in 2 ml Nunc-Reaktionsgefäßen mit Schraubdeckeln gut wärmeisoliert 48 h bei -80°C gelagert. Endgültig gelagert werden die Aliquots in flüssigem Stickstoff. Zum Auftauen werden die Zellen rasch auf 37°C erwärmt, mit 10 ml komplettem Medium vermischt, abzentrifugiert (Heraeus, 1500 rpm, 5 min), und in 10 ml neuem Medium resuspendiert.

Freeze-Medium:           80 % (v/v) RPMI- bzw. Joklik-Medium  
                              10% (v/v) FCS  
                              10% (v/v) DMSO

## **3.3. Hefekulturen**

### **3.3.1. Anzucht auf Agarplatten**

Aus Glycerin- oder Flüssigkulturen wurden mit einer sterilen Impföse die Hefen auf entsprechenden Agarplatten ausgestrichen. Flüssigkulturen konnten nach geeigneter Verdünnung auch direkt ausplattiert werden um vereinzelte Kolonien zu bekommen. Die Platten werden bei 30°C für 2-10 Tage inkubiert. Für die Bestimmung der Temperatursensitivität wurden die Platten bei 37°C oder 16°C inkubiert.

### 3.3.2. Vermehrung in Flüssigkultur

Zur Anzucht von Hefen wurden Einzelkolonien von Kulturplatten in 5-20 ml des entsprechenden Mediums angeimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Übernachtskultur wurde in frischem Medium auf eine  $D_{600} = 0,1$  verdünnt und unter Schütteln (200 rpm, aerobe Bedingungen) weiter bei 30°C inkubiert. Entsprechend der weiteren Verwendung der Hefen wurden sie bei unterschiedlichen OD-Werten geerntet. Für Transformationen sollten sich die Hefen in der frühen logarithmischen Wachstumsphase befinden, d.h. sie wurden bei einer  $OD_{600}$  zwischen 0,6 - 0,8 geerntet. Für Proteinextraktion konnten sie bis zu einer  $OD_{600}$  von 3 wachsen.

### 3.3.3. Stammhaltung

Übernachtskulturen der einzelnen Stämme wurden abzentrifugiert und das Zellpellet wurde mit 60% Glycerin in 1 x TE resuspendiert, bei - 80°C eingefroren. Um Glycerinkulturen von Plattenkultur anzulegen, mußten die Hefen dicht auf einer Platte ausgeschtrichen werden. Nach 2 - 3 tagige Inkubation bei 30°C wurde der Zellrasen mit einer Impföse abgekratzt und in 60% Glycerin in 1 x TE suspendiert. Glycerinkulturen sind bei - 80°C für mehrere Jahren haltbar.

## 3.4. DNA- und RNA-Arbeitstechniken

### 3.4.1. Bestimmung der Konzentration und Reinheit einer Nukleinsäure-Präparation

Die Konzentration der DNA-Lösung wird über ihre Absorption bei 260 nm ermittelt. Dabei entspricht 1  $OD_{260}$  einer Konzentration von 50  $\mu\text{g}$  ds-DNA/ml. Als Kriterium für die Reinheit einer DNA-Präparation wird das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  herangezogen. Für reine DNA schwankt dieser Wert je nach G/C-Gehalt der Probe zwischen 1,8 und 2,0. Niedrigere Quotienten zeigen Proteinverunreinigungen an, höhere lassen auf die Anwesenheit von RNA schließen. Bei RNA-Lösungen entspricht 1  $OD_{260}$  einer RNA-Konzentration von 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

### 3.4.2. Chloropane-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren

Die Chloropane-Extraktion ist eine Routinemethode zur Denaturierung und Entfernung von Proteinen aus Lösungen von Nukleinsäuren und Proteinen. Wenn nicht anders beschrieben, wird die Nukleinsäure-Lösung mit einem Volumenanteil Chloropane versetzt, auf dem Vortex vermischt, und

für 3 min bei RT zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, 14.000 rpm, RT). Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit einem Volumenanteil Chloroform/Isoamylalkohol [24:1(v/v)] gemischt und erneut für 3 min zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, 14.000 rpm, RT). Der wäßrige Überstand wird abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Restliches Chloropane wird durch anschließende Ethanol-fällung der DNA entfernt. Bei der Zugabe von Alkohol kommt es in Gegenwart relativ hoher Konzentrationen an monovalenten Kationen zur Aggregation der Nukleinsäure-Moleküle und zur nachfolgenden Präzipitation. Niedermolekulare Oligonukleotide, Nukleotide und Salze bleiben dabei in Lösung. Die Nukleinsäuren werden aus der Lösung durch Zugabe von 1/10 Volumenanteil 3 M Natriumacetat (pH 5,0) und 2,5 Volumenanteilen eiskaltem Ethanol (100%) gefällt. Der Ansatz wird vermischt und 10 - 20 min bei -20°C inkubiert. Nach einer zehnmütigen Zentrifugation (Heraeus Biofuge 28 RS, 20.000 rpm, 4°C) wird das Präzipitat mit 70%igem Ethanol gewaschen, nochmals für 10 min zentrifugiert und in der Lyophilie getrocknet. Schließlich wird die DNA in einem geeigneten Volumen TE gelöst.

Chloropane: Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol [25:24:1 (v/v)], gesättigt mit TE-Puffer

### 3.4.3. Reinigung von DNA über Gelfiltration

• **Reinigung über eine Sephadex G50:** Die DNA wird in einem Volumen bis 0,1 ml auf eine mit TE äquilibrierte 1 ml Sephadex G50-Säule ("Nick column", Pharmacia) aufgetragen. Die Säule wird mit TE eluiert und der Durchlauf fraktioniert gesammelt. Die erste Fraktion von 0,35 ml wird verworfen, in der zweiten Fraktion von 0,4 ml eluiert die DNA. Hierbei werden Salze, Nukleotide und grobe Verunreinigungen abgetrennt. Bevorzugt wird die Methode zur Abtrennung der DNA von <sup>32</sup>P-markierten Nukleotiden eingesetzt. Es können noch einzel-strängige Oligonukleotide einer Länge von 20 - 25 Basen von freien Nukleotiden abgetrennt werden.

• **Reinigung über eine "micro-spin column":** Diese Methode hat sich bei der Reinigung langer DNA-Fragmente (230 bp) bewährt, die in EMSAs eingesetzt wurden. Dazu wird das Volumen eines Markierungsansatzes mit TE auf 50 µl aufgefüllt. Die mit TE äquilibrierte Gelfiltrationssäule wird auf dem Vortex gut durchmischt und anschließend nach Abbrechen des unteren Verschlusses mit leicht geöffnetem Deckel auf ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gesetzt. Zur Entfernung von überschüssigem TE wird die Säule zentrifugiert (Tischzentrifuge, 3.500 rpm, 1 min) und anschließend auf ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß gesetzt. Die Säule wird mit dem Markierungsansatz beladen und erneut zentrifugiert (Tischzentrifuge, 2 min, 3.500 rpm). Das gereinigte DNA-Fragment befindet sich unverdünnt im Eluat. Zur Aktivitätsbestimmung wird 1 µl im Szintillationszähler gemessen.

#### 3.4.4. Reinigung von DNA über DE52-Säulen

DNA kann in beliebigen Volumina in 0,2 x STE-Puffer auf mit 0,2 x STE äquilibrierte Säulen aufgetragen, ebenfalls mit 0,2 x STE gewaschen und mit 0,5 x STE eluiert werden. Hierbei werden alle Salze, Nukleotide und viele Proteine abgetrennt. Dazu werden 0,5 ml Säulen-material in eine mit silikonisierter Glaswatte verschlossene 1 ml Plastikspritze gegeben. Die Säule wird mit 0,2 x STE äquilibriert, mit der DNA beladen, fünfmal mit je 0,5 ml 0,2 x STE gewaschen, und schließlich dreimal mit 0,15 ml 0,5 x STE eluiert.

Mit dieser Methode werden radioaktiv markierte DNA-Proben für das Durchmustern von Genbanken sowie für Northern Blot Analysen über DE52 gereinigt. Es hat sich bewährt, diese Proben vor der Hybridisierung steril zu filtrieren, um weniger Hintergrundsignale zu erhalten.

0,2x STE: 200 mM NaCl in TE  
0,5x STE: 500 mM NaCl in TE

#### 3.4.5. Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Del Sal *et al.*, 1988)

2 ml einer ÜN-Kultur werden abzentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge, 14.000 rpm, 30 s, RT). Der Überstand wird möglichst quantitativ abgenommen und verworfen. Das Sediment wird in 200 ml STET-Puffer mit 2 mg/ml Lysozym auf dem Vortex suspendiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT werden die Proben in einem Heizblock 45 s bis 60 s auf 95°C erhitzt und anschließend 10 min bei RT zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge, 14.000 rpm). Die Bakterienreste mit der chromosomalen DNA sind nach der Zentrifugation zu einem gallertartigen Klumpen verdichtet, der mit einem Zahnstocher restlos aus dem Reaktionsgefäß entfernt wird. Zum plasmidhaltigen Überstand werden dann 8 ml einer 5%igen CTAB-Lösung (w/v; in H<sub>2</sub>O) pipettiert. Das entstehende Präzipitat wird nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge, 14.000 rpm, 10 min, RT) und, nachdem der Überstand restlos entfernt worden ist, wieder in 300 ml 1,2 M NaCl gelöst. Die Nukleinsäuren werden anschließend durch Zugabe von 750 ml absolutem Ethanol gefällt, nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT abzentrifugiert (Heraeus Biofuge 28 RS, 20.000 rpm, 10 min, 4°C), in 750 ml 70% Ethanol gewaschen und dann erneut zentrifugiert. Das Präzipitat wird 5 min im Ölpumpenvakuum getrocknet und schließlich in 50 ml TE-Puffer aufgenommen. Zwischen 3 ml und 5 ml dieser Präparation reichen für eine analytische Restriktionshydrolyse aus.

STET-Puffer: 8% (w/v) Saccharose  
0,1% (v/v) Triton-X-100

50 mM EDTA  
50 mM Tris-HCl, pH 8,0

### 3.4.6. Amplifikation von DNA mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von NC2 $\alpha$ - und NC2 $\beta$ /Dr1-Derivaten aus Plasmid-DNA bzw. aus HeLa-cDNA über die Polymerase-Kettenreaktion (Saiki *et al.*, 1988) wird Taq- oder Vent-DNA-Polymerase verwendet. Die Vent-DNA-Polymerase besitzt eine 3'→5' "Proofreading"-Exonukleaseaktivität, die im Vergleich zur Taq-DNA-Polymerase zu einer zehnfach höheren Genauigkeit der DNA-Synthese führt. Ein weiterer Unterschied zur Taq-DNA-Polymerase besteht darin, daß die Reaktionsprodukte glatte Enden besitzen, was die nachfolgende Klonierung erleichtert.

Der Reaktionsansatz enthält jeweils 200 pmol Primer, 100 ng genomische (oder 20 ng Plasmid) DNA, 400  $\mu$ M jedes dNTPs, 10  $\mu$ l des vom Hersteller mitgelieferten 10 x PCR-Puffers und 0,5  $\mu$ l Enzym-Mix in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu$ l. Der Ansatz wird auf Eis zusammenpipettiert und die Reaktion durch Zugabe des Enzyms bei 94°C in der PCR-Maschine gestartet ("Hot start"). Dadurch werden unspezifische Paarungen der Primer in der ersten Amplifikationsrunde vermieden. Die Hybridisierungstemperatur wird mit Hilfe des Computer-Programms OLIGO 4.0-s bestimmt: für jedes G oder C im hybridisierenden Bereich der PCR-Primer ergibt sich eine Erhöhung der Temperatur (von 0°C ausgehend) um ca. 4°C, für jedes A oder T eine Erhöhung um ca. 2°C. Die Polymerisationsdauer wird durch die Länge der zu amplifizierenden Sequenz bestimmt, da die Synthesegeschwindigkeit der verwendeten hitzestabilen Polymerase bei 72°C bei ca. 1000 Nukleotiden pro min liegt. Im folgenden ist ein Beispiel für die Amplifikation von PCR-Fragmenten bis zu 1 kb in einer PCR-Maschine angegeben:

Zyklennummer	1		2-3		4-25		26	
Denaturierung	94°C	120 s	94°C	30 s	94°C	30 s		
Hybridisierung			56°C	30 s	62°C	30 s		
Elongation			72°C	60 s	72°C	60 s	72°C	5 min

Es wird dabei eine anfängliche Hybridisierungstemperatur der Primer von 56°C voraus-gesetzt. Durch zusätzliche DNA-Sequenzen mit Restriktionsschnittstellen am 5'-Ende des Primers wird nach den ersten Amplifikationsrunden die Hybridisierungstemperatur auf 62°C erhöht. In der letzten Runde werden in dem verlängerten Elongationsschritt evtl. nicht fertig synthetisierte Produkte aufgefüllt. Jeweils 5  $\mu$ l eines PCR-Ansatzes werden anschließend über eine Agarosegelelektrophorese analysiert.

Um eine amplifizierte cDNA gerichtet in den bakteriellen Expressionsvektor pET15b kloniert zu können, besitzen die Primer üblicherweise Schnittstellen für die Restriktions-enzyme *NdeI* und *BamHI*.

10 x Vent-PCR Puffer:     100 mM KCl  
                              200 mM Tris/HCl, pH 8,8 (25°C)  
                              100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
                              20 mM MgSO<sub>4</sub>  
                              1% (v/v) Triton X-100

### 3.4.7. Restriktionshydrolyse von DNA

Im allgemeinen werden 3-5 µl einer CTAB-Plasmidminipräparation (300-600 ng) in einem Volumen von 10 µl hydrolysiert. Die Ansätze enthalten neben dem für das jeweilige Enzym optimalen Restriktionspuffer noch 0,5-1 µg/ml RNase A und 0,5-1 µl des Restriktions-enzym (2-10 U). Die Reaktionen werden für 1 h bei der vom Hersteller angegebenen optimalen Temperatur inkubiert. Soll eine Spaltung mit zwei verschiedenen Enzymen durchgeführt werden, kann ein Doppelverdau in einem Spaltungsansatz durchgeführt werden, sofern beide Restriktionsenzyme unter gleichen Pufferbedingungen spalten. Ist dies nicht der Fall, wird die Nukleinsäure zunächst mit einem Enzym geschnitten, der Ansatz mit Chloroform extrahiert, die DNA mit Ethanol gefällt und anschließend mit dem zweiten Enzym hydrolysiert.

RNase A:           10mg/ml in  
                      10 mM Tris-HCl, pH 7,5  
                      15 mM NaCl  
                      15 min kochen

### 3.4.8. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird in horizontalen Gelapparaturen durchgeführt. Je nach der Größe der zu trennenden Nukleinsäure-Fragmente schwankt die Agarosekonzentration zwischen 0,7% und 2% (w/v). Als Laufpuffer dient 1x TBE; die aufzutrennenden Proben werden in 1 x Auftragspuffer aufgetragen. Um die Nukleinsäuren unter UV-Licht sichtbar zu machen, wird der Gellösung unmittelbar vor dem Gießen Ethidiumbromid (0,5 µg/ml Endkonzentration) zugesetzt oder das Gel 30 min in 1 x TBE mit Ethidiumbromid nachgefärbt. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Feldstärke von 5 V/cm.

5 x Auftragspuffer:        30% (v/v) Glycerin in H<sub>2</sub>O  
                                  0,25% (w/v) BPB  
                                  0,25% (w/v) XC

### 3.4.9. Elution von DNA aus Agarosegelen

• **Gelelution mittels des "Gel Elution Kit"** (Qiagen): Das ausgeschnittene Agarosegelstück mit dem gewünschten DNA-Fragment wird in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert, gewogen, und mit drei Volumenanteilen Puffer QX1 versetzt. Nach 10 min Erhitzen auf 50°C und zwei- bis dreimaligem Mischen ist die Gelmatrix gelöst. Man setzt 10 µl 3 M NaOAc (pH 5,0) zu und pipettiert die Lösung auf eine Säuleneinheit (QIAquick Spin Column), die in einem 2 ml Reaktionsgefäß plaziert ist. Nach 1 min Zentrifugation (Tischzentrifuge, 14.000 rpm) bei RT wird die gebundene DNA mit 0,75 ml PE-Puffer gewaschen, und nach 5 min Stehenlassen erneut zentrifugiert. Der Waschpuffer wird verworfen, und ein weiterer Zentrifugationsschritt befreit die Säulenmatrix von letzten Pufferresten. Man plaziert die Säuleneinheit in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß, pipettiert 40 µl TE auf die Matrix, beläßt sie für 5 min auf RT und zentrifugiert die eluierte DNA ab (Tischzentrifuge, 14.000 rpm).

Die Puffer QX1 und PE sind dem Kit beigelegt.

• **"Freeze-thaw"-Methode:** Die gewünschte DNA-Bande wird unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 365 nm detektiert und ausgeschnitten. Nach dem Transfer in eine Ultrafree-Filtereinheit wird die Probe auf Trockeneis eingefroren und bei RT aufgetaut. Viermaliges Wiederholen dieser Prozedur vervollständigt die Zerstörung der Gelmatrix. Das Gelstückchen wird in halbgefrorenem Zustand zentrifugiert (Sigma 2K15 Kühlzentrifuge, 2.000 rpm, 15 min, 4°C). Das Eluat wird mit Chloroform extrahiert, die DNA wird mit EtOH gefällt und in 10-50 µl TE aufgenommen.

• **Elektroelution:** Das Agarosegel wird in seiner Gießform in die Elektrophoreseapparatur gelegt, wobei darauf geachtet wird, daß der TBE-Puffer das Gel gerade nicht mehr bedeckt. Vor der gewünschten Bande wird mit dem Skalpell ein rechteckiger Trog ausgeschnitten, der mit einer vorbehandelten Dialysemembran (Spectropor, Ausschlußvolumen 9 kDa) ausgekleidet wird. Dieser Trog wird mit ca. 0,3 - 0,4 ml 1 x TBE-Puffer gefüllt. Die Elektrophorese wird fortgesetzt, bis die Bande in den Trog eingewandert ist, was unter UV-Licht einer Wellenlänge von 365 nm kontrolliert werden kann. Schließlich polt man die Elektroden für 30 s um, überführt die DNA-haltige Pufferlösung in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß, extrahiert und fällt sie wie oben beschrieben.

### 3.4.10. Reinigung synthetischer Oligodeoxyribonukleotide

Da die automatische Oligodeoxyribonukleotid-Synthese nicht mit 100%iger Ausbeute verläuft, sind in jeder Rohpräparation noch Oligodeoxyribonukleotide vorhanden, die kürzer als das erwünschte sind. Diese müssen erst über eine Gelelektrophorese abgetrennt werden. Dazu wird die lyophilisierte Oligodeoxyribonukleotidpräparation in 40 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und mit einem Volumenanteil Formamid-Auftragspuffer versetzt. Es schließt sich eine gelelektrophoretische Auftrennung in einem 1,5 mm dicken, 11 - 15%igem (je nach der Länge der Oligodeoxyribonukleotide) denaturierenden Polyacrylamidgel an. Nach der Gelelektrophorese kann die der DNA entsprechende Bande durch UV-Löschung bei 254 nm sichtbar gemacht und ausgeschnitten werden. Die zerkleinerte Gelmatrix wird mit 500 µl H<sub>2</sub>O über Nacht bei 37°C geschüttelt. Durch eine Zentrifugation in einer Millipore Ultrafree Filtereinheit (Eppendorf-Zentrifuge, 2.000 rpm, 10 min, RT) werden Polyacrylamid-bruchstücke von der wässrigen Lösung abgetrennt. Durch Zugabe von 1/100 Volumenanteil 1 M MgCl<sub>2</sub>, 1/10 Volumenanteil 3 M Natriumacetat (pH 5,0) und 2,5 Volumenanteilen eiskalten Ethanol (100%) werden die Oligodeoxyribonukleotide gefällt. Nach zehnminütiger Kühlung bei - 20°C wird die DNA abzentrifugiert (Heraeus Biofuge 28 RS, 20.000 rpm, 10 min, 4°C) und nach einem Waschschrift mit 70% Ethanol und Trocknung in der Lyophilie in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Zur Konzentrationsbestimmung wird ein Aliquot dieser Lösung 1:200 verdünnt und die optische Dichte bei 260 nm gemessen.

Formamid-Auftragslösung:      0,1% (w/v) BPB  
   0,1% (w/v) Xylencyanol  
   0,5 mM EDTA  
   98% (v/v) Formamid

### 3.4.11. Radioaktive Markierung von Oligodeoxyribonukleotiden am 5'-Ende

Oligodeoxyribonukleotide tragen synthesebedingt keinen Phosphatrest an ihrem 5'-Ende. Einzel- oder doppelsträngige DNA wird mit T4-Polynukleotidkinase am 5'-Ende der DNA markiert und zum Beispiel für die Ligation in dephosphorylierte Vektoren vorbereitet.

Für die Endmarkierung werden 10 pmol dephosphorylierter DNA mit 1 U T4-Polynukleotidkinase in Gegenwart von 50 mCi (16,5 pmol)  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]ATP in dem vom Hersteller mitgelieferten Kinase-Puffer 1 h bei 37°C inkubiert. Das Enzym wird sukzessive in zwei Aliquots à 0,5 µl zugegeben, da es bei 37°C eine geringe Halbwertszeit besitzt. Anschließend wird die DNA vom restlichen ATP wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben über Sephadex G-50 abgetrennt. Wird DNA mit unmarkiertem ATP phosphoryliert, liegt die ATP-Konzentration bei 10 µM und es werden 0,5 U Polynukleotidkinase pro pmol DNA-Fragment eingesetzt.

10 x Polynukleotidkinase-Puffer: 700 mM Tris/HCl, pH 7,6  
100 mM MgCl<sub>2</sub>  
50 mM DTT

### 3.4.12. Dephosphorylierung von DNA

Die alkalische Phosphatase aus Kälberdarm entfernt in einem linearen, doppelsträngigen DNA-Molekül endständige 5'-Phosphatgruppen. Eine Entfernung von Phosphatresten wird durchgeführt, wenn bei Klonierungen die interne Religation eines Vektors durch die anschließende DNA-Ligase-Reaktion verhindert werden soll.

Es werden in einem Reaktionsansatz 0,1 U Enzym pro pmol DNA mit kohäsiven 5'-überhängenden Enden eingesetzt. Die Reaktion wird für 1 h bei 37°C im Reaktionspuffer durchgeführt. Zur Inaktivierung der alkalischen Phosphatase wird dann EDTA (pH 8,0) zu einer Endkonzentration von 5 mM zugegeben und 10 min auf 75°C erhitzt. Die DNA wird anschließend mit Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt.

Phosphatasepuffer: 50 mM NaCl  
10 mM Tris-HCl, pH 7,9  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM DTT

### 3.4.13. Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden

Das Klenow-Fragment ist die große Untereinheit der DNA-Polymerase I aus *E. coli*, der die 5'→3' Exonukleaseaktivität fehlt. In Gegenwart von Deoxyribonukleotiden füllt das Klenow-Fragment 5'-überhängende DNA-Enden auf. Dazu werden in einem Volumen von 50 µl 0,1 bis 1 µg DNA, 5 µl 10 x Klenow-Polymerase Puffer, 100 µM dNTPs und 5 U Klenow-Polymerase für 20 min bei RT inkubiert. Das Enzym wird anschließend für 20 min bei 75°C inaktiviert.

Für die radioaktive Endmarkierung von Oligodeoxyribonukleotiden enthält die Reaktion: 10 pmol DNA, 2 µl 10 x Klenow-Polymerase Puffer, 5 U Klenow-Polymerase, 1 mM dGTP, 1 mM dCTP, 1 mM dTTP, und 5 µl α-[<sup>32</sup>P]dATP (3000 Ci/mmol) in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Die Reaktionen werden für 30 min bei RT inkubiert. Die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide erfolgt über eine Sephadex G50-Säule. Die radioaktiv markierten Oligodeoxyribonukleotide können bis zu 6 Wochen bei -20°C gelagert werden.

Der Einbau des terminalen Nukleotids verläuft sehr ineffektiv (5-10%). Bei radioaktiven Markierungen sollten Nukleotide daher an der innersten Position, zumindest aber an der zweitäußersten Position eingebaut werden.

---

10 x Klenow-Polymerase Puffer (New England Biolabs):	100 mM Tris/HCl (pH 7,5)
	50 mM MgCl <sub>2</sub>
	75 mM DTT

#### 3.4.14. Ligation von DNA

Zunächst werden Aliquots der zu ligierenden DNA-Fragmente nebeneinander auf einem Agarose-Gel aufgetrennt, um die Mengenverhältnisse abschätzen zu können. Für die Ligation wird ein molares Verhältnis Fragment:Vektor von 3:1 bis 5:1 gewählt, wobei die Gesamtmenge an DNA zwischen 50 ng und 100 ng liegt. Vektor-DNA, die lediglich mit einem Restriktionsenzym linearisiert wurde, wird im allgemeinen vor der Ligationsreaktion an ihren Enden dephosphoryliert, um eine Religation des Plasmides zu verhindern. Gilt es lediglich, einzelne DNA-Fragmente zu zirkularisieren, so wird in einem 50 µl Ansatz ligiert, während man bei dem Einsetzen von Fragmenten in Vektoren in einem Reaktionsvolumen von 20 µl arbeitet. In den Ansätzen sind außer den DNA-Lösungen und Wasser noch 1/10 Volumenanteil 10 x Ligasepuffer und T4-DNA-Ligase (200 - 400 U der Ligase von New England Biolabs, bzw. 0,5 - 1 U der Ligase von Boehringer Mannheim) enthalten. Die Reaktion erfolgt 3 - 16 h bei 16°C.

10 x Ligasepuffer (New England Biolabs):	500 mM Tris-HCl, pH 7,5
	100 mM MgCl <sub>2</sub>
	100 mM DTT
	10 mM ATP
	25 µg/ml BSA

#### 3.4.15. Herstellung transformationskompetenter *E. coli* (nach M. Scott, unveröffentlicht)

Der Bakterienstamm wird auf einer LB-Platte ausgestrichen, die gegebenenfalls mit einem geeigneten Antibiotikum versetzt ist, und ÜN bei 37°C bebrütet. Eine einzelne Kolonie wird in 20 ml TYM bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,2 - 0,8 vermehrt. Die Suspension wird auf 100 ml TYM verdünnt und in einem 1 Liter-Kolben bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 gezogen. Nun wird durch sanftes Schütteln des Kolbens in einem Eis/Kochsalzbad rasch auf 0°C heruntergekühlt, bei 4000 U/min und 0°C im GSA-Rotor 15 min zentrifugiert und das Sediment vorsichtig in 100 ml TfBI suspendiert. Danach wird wie oben, jedoch nur 8 min, abzentrifugiert, der Überstand abgossen und das Sediment durch vorsichtiges Schütteln auf Eis in 20 ml kaltem TfBII suspendiert. Schließlich werden 0,1 ml Aliquots in vorgekühlte Eppendorf-Gefäße pipettiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

TYM-Medium: 2% (w/v) Bactotrypton  
0,5% (w/v) Hefeextrakt  
100 mM NaCl  
10 mM MgSO<sub>4</sub>

TfBI: 30 mM KOAc  
50 mM MnCl<sub>2</sub>  
100 mM NaCl  
10 mM MgSO<sub>4</sub>

TfBII: 10 mM MOPS pH 7,0  
75 mM CaCl<sub>2</sub>  
10 mM KCl  
10% (v/v) Glycerin

### 3.4.16. Transformation kompetenter *E. coli* (nach M. Scott, unveröffentlicht)

100 µl einer kompetenten *E. coli* Suspension werden auf Eis aufgetaut und 20 - 50 µl eines mit TE 1:5 verdünnten Ligationsansatzes vorsichtig zugemischt. Der Ansatz wird 30 min auf Eis inkubiert, 5 min auf 37°C erwärmt, erneut 2 min auf Eis gestellt und schließlich mit 0,9 ml vorgewärmten LB-Medium vermischt 45 - 60 min bei 37°C geschüttelt. Je nach eingesetzter DNA-Menge werden 50 µl bis 1000 µl Aliquots auf LB-Agarplatten mit Zusatz von Antibiotikum ausgestrichen und ÜN bei 37°C inkubiert.

### 3.4.17. Klonierung von verschiedenen NC2-Derivaten

#### 3.4.17.1. Klonierung von NC2-Deletionsmutanten

NC2 $\alpha$ - und NC2 $\beta$ -Deletionsmutanten  $\alpha$ 8-80,  $\alpha$ 8-88,  $\alpha$ 8-125 und  $\beta$ 10-129 wurden mit den entsprechenden Primerpaaren a8to13/a80, a8to13/a88, a8to13/a125 und b10to16/b129 aus der in pET15b klonierten NC2 $\alpha$  (NC2 $\beta$ )-cDNA über PCR amplifiziert. Nach Hydrolyse mit *Nde* I und *Bam*H I wurden die PCR-Produkte in ein modifiziertes pET15b-Plasmid kloniert, das mit *Nde* I und *Bam*H I geschnitten worden war, bzw. in ein pET11a-Derivat umklont.

Um die NC2-Deletionsmutanten in die Hefeexpressionsvektor (pMAC102 oder pJX14) zu klonieren, werden sie zuerst als *Nde* I/*Bam*H I-Fragmente aus dem pET15b-Vektor ausgeschnitten. Die 5'-überhängenden DNA-Enden wurden mit dem Klenow-Polymerase (beschrieben in 3.4.11) aufgefüllt. Die Fragmenten mit glatten Enden wurden anschließend in Hefeexpressionsvektor ligiert, die mit *Sma* I geschnitten und dephosphoreliert waren. Dabei wurden die Mutanten der NC2 $\alpha$  ins pMAC102 und die der NC2 $\beta$  ins pJX14 kloniert.

### 3.4.17.2. Klonierung von NC2-Punktmutanten (Mutagenese nach Kunkel *et al.*, 1987)

Für die Mutagenese nach Kunkel wird uracilhaltige Einzelstrang DNA benötigt. Dieser wird gewonnen erstens durch Transformation von kompetenten *dut<sup>-</sup>, ung<sup>-</sup> E. coli* CJ236 Zellen (Lindahl, 1974; Konrad and Lehman, 1975; Duncan *et al.*, 1978; Hochhauser and Weiss, 1978) mit Plasmid-DNA (pRCCMV-hNC2 $\alpha$  oder pRCCMV-hNC2 $\beta$ ) und zweitens durch die Infektion dieser Transformanten über F-Pilis mit dem Helferphagen M13K07 (Dotto and Zinder, 1984, Phamacia) und anschließender Einzelstrangpräparation. Der Helferphage verpackt den uracilhaltigen, einzelsträngigen, plus Strang und knospt als Phage aus der infizierten Zellen. Aus den sich im Überstand befindlichen Phagenpartikeln wird der uracilhaltige ss-Strang gewonnen.

Das Fehlen der durch *dut* kodierten dUTPase läßt die Konzentration an dUTP in Bakterienzellen CJ236 ansteigen. Dieses konkurriert dann mit dTTP um den Einbau in die DNA. Da diese Zellen durch den *ung<sup>-</sup>* nicht über das Enzym Uracil-N-Glykosidase vergnügen, wird in die DNA eingebaute Uracil nicht wieder entfernt. Dieser gewonnene uracilhaltige Einzelstrang wird im Rahmen der *in vitro*-Mutagenese mit einem am 5'-phosphorelierten Primer, das die Mutation beinhaltet, hybridisiert, welcher mit Hilfe der T4-DNA-Polymeraseverlängert und über die T4-DNA-Ligase zirkuliert wird. Die so gebildete Heteroduplex-DNA wird in einen *dut<sup>+</sup>, ung<sup>+</sup> E. coli*-Stamm SURE transformiert. Die Uracil-N-Glykosidase schädigt nun durch Entfernung der Uracilreste den parental Strang und verschafft so der gewünschte Mutante einen Selektionsvorteil in der ersten Replikationsrunde. Die so erzielte Mutageneseausbeute liegt bei höher als 50%.

- **Synthese von Einzelstrang-Phagen-DNA:** Die Präparation der Phagen-Einzelstrang-DNA erfolgt nach der Protokoll von Sambrook *et al.*, 1989.

10 ng Plasmid-DNA (pRCCMV-hNC2 $\alpha$  oder pRCCMV-hNC2 $\beta$ ) werden in die Bakterien CJ236 transformiert und auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100  $\mu$ g/ml) und Chloramphenicol (25  $\mu$ g/ml) ÜN bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen werden 3 ml 2xYT-Medium (enthält 100  $\mu$ g/ml Ampicillin und 25  $\mu$ g/ml Chloramphenicol) mit einer Bakterienkolonie angeimpft und 6 h bei 37°C, 200 rpm geschüttelt. Nach Zugabe von Helferphagen M13K07 in einer Endkonzentration von  $2 \times 10^7$  pfu/ml Medium wird die Bakterienkultur 2 h bei 37°C, 200 rpm inkubiert. Kanamycin wird in einer Endkonzentration von 70  $\mu$ g/ml zugegeben und die Kultur wird ÜN bei 37°C, 200 rpm geschüttelt.

- **Präparation der ss-DNA:** Die Bakteriensuspension wird zur Präparation der Einzelstrang-DNA bei 4°C, 1000 rpm für 15 min abzentrifugiert. Der phagenhaltige Überstand wird in ein frisches Reaktinagefaß überführt und erneute unter gleicher Bedingungen abzentrifugiert. Der zweite Überstand mit Phagenpartikeln wird gefällt durch Zugabe von 1/5 vol. 5x PEG/NaCl und eine Inkubation von 15 min bei RT. Die Phagenpartikeln werden durch eine Zentrifugation bei 14000 rpm

für 10 min pelletiert und in 100 µl TE aufgenommen. Nach Zugabe von 50 µl Phenol werden die Phagensuspension kräftig gevortext für 15 Sec. Die resuspendierte Phagen werden erneute inkubiert bei RT für 15 min und gevortext. Nach eine zentrifugation mit voller Gchwindigkeit wird die ss-phagen-DNA mit 10 µl 8 mM LiCl und 250 µl 100% EtOH bei -80°C gefällt.

Die Konzentration der ss-DNA-Lösungen wird photometrisch bei der Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Konzentration ergibt sich für ss-DNA aus folgende Verhältnis: 1 OD<sub>260</sub>= 33 µg ss-DNA/ml.

• **Annealing des Primers:** Die 10 µl Annealingsreaktion enthält 200 ng ss-DNA und 3 pmol 5'-phosphorelierte Primer (beschrieben in 3.4.11) mit Mutation und 1 µl 10x Annealing-Puffer. Die Reaktion erfolgt über eine Aufkochen bei 95°C für 5 min und darauffolgende abkühlung auf RT. Die Reaktionsgemisch wird dann auf Eis gelegt.

• **Synthese des komplementären DNA-Stranges:** Zu der auf Eis befindlichen Reaktion werden auf Eis in folgende Reihenfolge folgendes hinzupipetiert:

1 µl 10x Synthesepuffer  
0,5 µl T4-DNA-Ligase (5 U/µl)  
0,5 µl Gen 32-Protein (5 mg/ml)  
1 µl T4-DNA-Polymerase (1 U/µl),

Dieser Ansatz wird 5 min auf Eis, 5 min bei RT und 90 min bei 37°C inkubiert. Danach werde 90 µl TE hinzugefügt und der Ansatz bei -20°C gelagert. Zur Transformation in *E. coli* SURE wird 10 µl dieser DNA eingesetzt und auf LB-Amp-Platten ausplattiert.

Alle Konstrukte wurden mit den Primern T7 und T7down sequenziert.

2 x YT-Medium: 16 g Bacto-Trypton  
10 g Bacto-Yeast-Extrakt  
5 g NaCl  
ad H<sub>2</sub>O zu 1000 ml, pH7,4

5 x PEG/NaCl: 20% (wt/vol) Polyethylenglycol 6000  
2,5 M NaCl

10 x Annealing-Puffer: 200 mM Tris-HCl, pH 7,4  
20 mM MgCl<sub>2</sub>  
500 mM NaCl

10 x Synthese-Puffer: 4 mM je dNTPs  
7,5 mM ATP  
175 mM Tris-HCl, pH 7,4

37,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
5 mM DTT

Zur Klonierung der NC2-Punktmutanten in die Hefeexpressionsvektor (pMAC102 oder pJX14), wurden sie zuerst als *Pst* I/*Not* I-Fragmente aus dem pRCCMV-Vektor ausgeschnitten. Die Fragmenten mit wurden anschließend in Hefeexpressionsvektor ligiert, die mit *Pst* I/*Not* I geschnitten und dephosphoreliert waren. Dabei wurden die Mutanten der NC2 $\alpha$  ins pMAC102 und die der NC2 $\beta$  ins pJX14 kloniert.

### 3.4.18. DNA-Sequenzierung

#### 3.4.18.1. DNA-Sequenzierung nach dem Dideoxy-Kettenabbruchverfahren

Die DNA-Sequenzierung wird mit einem Sequenzier-Kit der Firma Pharmacia durchgeführt, der auf dem von Sanger *et al.* (1977) entwickelten Kettenabbruchverfahren basiert. Diese Methode wurde für die Sequenzierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA modifiziert (Chen and Seeburg, 1985). Es werden die mitgelieferten "short range" Nukleotidpräparationen verwendet, die eine Sequenzierung von bis zu 500 nt pro Reaktionsansatz ermöglichen. Die Reaktionen werden leicht modifiziert nach Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

- **Denaturierung der DNA:** 2  $\mu$ g doppelsträngige Plasmid-DNA werden in 0,2 N NaOH in 10  $\mu$ l Gesamtvolumen für 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 2  $\mu$ l Primer (5 pmol/ $\mu$ l) wird die Lösung durch Zugabe von 3  $\mu$ l 3 M Natriumacetat und 5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O neutralisiert.
- **Fällen der DNA:** Nach Zugabe von 50  $\mu$ l absolutem Ethanol wird der Ansatz 10 min bei RT inkubiert, anschließend 15 min zentrifugiert (Sorvall-Kühlzentrifuge, 15.000 rpm, 4°C). Es folgt ein Waschschrift mit 70%igem Ethanol (Sorvall-Kühlzentrifuge, 5 min, 15.000 rpm, 4°C). Die gefällte DNA wird für 5 min in der Speed Vac getrocknet.
- **Annealing:** Die DNA wird in 10  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und nach Zugabe von 2  $\mu$ l Annealing-Puffer zunächst für 20 min bei 37°C inkubiert, anschließend 10 min bei RT belassen.
- **Kettenabbruch und Markierung:** Für jeden Reaktionsansatz werden je 2,5  $\mu$ l der ddNTP-Terminationsgemische in ein Reaktionsgefäß pipettiert und bei 37°C vorinkubiert. Die Markierungsreaktion der annealten DNA erfolgt durch Zugabe von 3  $\mu$ l des Markierungs-gemisches (dATP), 0,5  $\mu$ l  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dATP (10  $\mu$ Ci/  $\mu$ l) und 2  $\mu$ l T7-DNA-Polymerase (verdünnt mit Enzym-Verdünnungspuffer auf 1,6 U/  $\mu$ l). Nach fünfminütiger Inkubation bei RT werden je 4,5  $\mu$ l des

markierten Reaktionsansatzes zu den Terminationsgemischen gegeben und 5 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von je 5 µl Formamid-Auftragspuffer gestoppt. Die Proben werden kurz zentrifugiert und können bis zum Auftragen bei -20°C gelagert werden. Es werden jeweils 1,5 µl jeder Reaktion nach dreiminütigem Erhitzen auf 95°C auf ein Sequenzgel aufgetragen.

Der Annealing-Puffer, der Enzym-Verdünnungspuffer, die ddNTP-Terminationsgemische, und das Markierungsgemisch sind dem Kit beigelegt.

Formamid-Auftragspuffer:            97,5% (v/v) deionisiertes Formamid  
  10 mM EDTA pH 7,5  
  0,3% (w/v) Bromphenolblau  
  0,3% (w/v) Xylencyanol

### **3.4.18.2. (A+G)-Sequenzreaktion nach Maxam-Gilbert-Prozedure (Bencini *et al.*, 1984)**

Für die Sequenzreaktion des DNase I- bzw. [OP]<sub>2</sub>Cu<sup>+</sup>-Footprints wurden die (A+G)-Reaktion der Maxam-Gilbert-Prozedure durchgeführt. Dazu wurde mit dem "Oligonukleotide-Sequenzanalyse" Kit der Firma Merck gearbeitet. 20 µl (50 x 5 = 250 fmol) einseitig 5'-markierte Doppelsträngige DNA wird mit 2 µl Carrier (Salmon sperm-DNA, 2 µg/µl) vermischt und 50 µl Ameisensäure zugesetzt. Das Gemisch wird für 3-4 min bei RT inkubiert und gestoppt mit 200 µl "ACT-Stop"-Lösung. Nach Zugabe von 1 ml 100% kaltem EtOH wird die DNA gefällt by einer Inubation auf Trockeneis für 15 min. Nach Zentrifugation bei 4°C, 1000 rpm für 10 min, wird das DNA-Pellet in 100 µl 0,3 M NaOAc aufgenommen und erneut mit 100%igem EtOH gefällt. Nach dem Waschen mit 70%igem EtOH wird das DNA-Pellet getrocknet. Das trockene Pellet wird mit 100 µl verdünnter Piperidin (frisch verdünnt 1:10 mit ddH<sub>2</sub>O) resuspendiert. Der folgende Piperidin-Verdau der DNA-Fragmente erfolgt bei 90°C für 30 min. Die Reaktion wird durch Zugabe von 400 µl Transkriptionsstop-Puffer gestoppt und die geschnittene DNA wird erneut gefällt. Nach dem Trocknen wird sie in 30 µl Formamid-Auftragspuffer aufgenommen.

Die Ameisensäure, 3 M NaOAc-Lösung, der ACT-StopPuffer, und Piperidin sind dem Kit beigelegt.

Transkriptionsstop-Puffer:        10 mM TrisHCl, pH 7,8  
  0,1 M LiCl  
  0,5% SDS  
  7 M Harnstoff  
  10 mM EDTA, pH 8,0  
  0,3 M NaOAc, pH 5,3  
  0,2 mg/ml tRNA

### **3.4.18.3. Anfertigung eines Sequenzgels und Durchführung der Gelelektrophorese**

Für die Anfertigung eines Sequenzgels werden zwei Glasplatten gründlich mit Spülmittel gereinigt, mit destilliertem Wasser abgespült und mit Ethanol trocken gerieben. Die Ohrenplatte (20 cm x 50 cm) wird mit 15 ml 5%igem (v/v) Dichlordimethylsilan (in Chloroform gelöst) eingerieben und nach kurzem Trocknen mit Ethanol poliert. Beide Platten werden dann - durch Abstandshalter (0,5 mm) getrennt - waagrecht plaziert. Nach Einsetzen des Kammes werden 60 ml einer 6% Acrylamidlösung mit 300 µl 10%igem APS und 60 µl TEMED gemischt und die Lösung sofort zwischen die Platten gegossen. Dabei ist es von Vorteil, wenn die Glasplatten am oberen Ende leicht erhöht liegen. Das Gel polymerisiert über einen Zeitraum von mindestens 1,5 h aus.

Die Elektrophorese erfolgt in einer vertikalen Apparatur bei 1500 V (20 mA). Als Laufpuffer wird 1 x TBE verwendet. Vor dem Probenauftrag erfolgt ein Vorlauf über mindestens 30 min bei 1500 V. Anschließend werden die Geltaschen mehrere Male mit 1 x TBE gespült, um den aus dem Gel herausgetretenen Harnstoff zu entfernen. Die Proben werden mit abgeflachten Pipettenspitzen aufgetragen. Für eine gleichmäßige Erwärmung des Gels während des Laufs sorgt eine vor eine Glasplatte geklammerte Aluminiumplatte. Nach der Elektrophorese wird die Ohrenplatte vorsichtig abgenommen und die Haftplatte mit dem Gel für 30 min in 10%iger Essigsäure und 20%igem MeOH eingelegt, um die DNA-Fragmente in der Gelmatrix zu fixieren. Das Gel wird auf Whatman 3MM Papier überführt, und 1 h bei 80°C (oder 2 h bei 65°C) unter Wasserstrahlvakuum getrocknet. Das Gel wird bei Verwendung von  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dATP bei RT autoradiographiert.

Gellösung: 6-13% (w/v) Acrylamid (Acrylamid: Bisacrylamid = 19:1)  
8 M Harnstoff  
in 1 x TBE  
Die Acrylamidlösung wird filtriert und bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

### 3.5. Protein-Arbeitstechniken

#### 3.5.1. Konzentrationsbestimmung

Proteinkonzentrationen werden nach der Methode von Bradford bestimmt. Zunächst wird eine Eichkurve mit BSA erstellt. Der Nachweis beruht auf der Beobachtung von Bradford (1976), wonach das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung von Coomassie Brilliant Blue nach Ausbildung von Proteinkomplexen von 465 nm zu 595 nm verschoben wird. Für die Eichkurve werden 1-20 µg BSA mit 1 ml 1:5 mit Wasser verdünnter und filtrierter Farblösung (Coomassie Blue, Phosphorsäure, Methanol) gemischt. Nach fünfminütiger Inkubation wird die Extinktion bei 595 nm gegenüber dem Leerwert bestimmt. Mit den Proteinproben wird analog Verfahren und die Proteinkonzentration aus der Eichkurve abgelesen. Erfahrungsgemäß ergibt sich aus einer Proteinkonzentration von 5 µg/ml eine OD<sub>595</sub> von 0,2.

### 3.5.2. SDS-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgt unter denaturierenden Bedingungen [0,1% (w/v) SDS] über eine eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Zum Gießen der Gele und für den Gellauf werden Mini-Gelapparaturen, Abstandshalter und Kämme der Firma Hofer verwendet. Zwei Glasplatten mit den Ausmaßen von 8 cm x 10 cm werden zunächst gründlich mit Spülmittel und einfach destilliertem Wasser gesäubert und trocken mit zwei Abstandhaltern (0,75 mm) in einer Gießapparatur vertikal fixiert. Das Trenngel wird bis zu einer Höhe von 4,5 cm zwischen beide Glasplatten mit einer dünnen Glaspipette gegossen und anschließend mit 0,5 cm einfach destilliertem Wasser überschichtet, um eine glatte Gelfront zu erhalten. Die Polymerisation des Trenngels ist nach ca. 20 min beendet. Nach Abgießen des Wassers wird das Sammelgel 2 cm hoch über das Trenngel gegossen und sofort der Kamm eingesetzt. Nach ungefähr 10 min ist die Polymerisation des Sammelgels beendet, der Kamm wird vorsichtig entfernt und das Gel in eine vertikale Gelelektrophorese-Apparatur mit 1 x TGS als Laufpuffer eingesetzt. Die Proteinlösungen werden vor dem Auftragen auf das Gel mit einem Volumenanteil 2 x SDS-Auftragspuffer gemischt, 3 min bei 95°C erhitzt und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt (Eppendorf-Zentrifuge, 2 min 14.000 rpm, RT). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 30 mA unter Wasserkühlung, bis das Bromphenolblau des Auftragspuffers den unteren Glasplattenrand erreicht hat. Anschließend wird das Gel entweder angefärbt oder auf eine Nitrocellulosemembran geblottet.

Trenngellösung [15% (1:175) für 2 Gele]

H <sub>2</sub> O	1,94 ml
30% (w/v) Acrylamid	5 ml
2% (w/v) Bisacrylamid	0,43 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	2,5 ml
10% (w/v) SDS	0,1 ml
10% (w/v) APS	33 µl
TEMED	8,3 µl

Sammelgellösung (für 2 Gele)

H <sub>2</sub> O	1,84 ml
30% (w/v) Acrylamid	0,51 ml
2% (w/v) Bisacrylamid	0,21 ml
1 M Tris, pH 6,8	0,38 ml
10% (w/v) SDS	33 µl
10% (w/v) APS	15 µl
TEMED	7,5 µl

2 x Harnstoff-SDS-Auftragspuffer:

150 mM Tris-HCl (pH 6,8)  
8 M Harnstoff  
4% (w/v) SDS  
0,5% (w/v) Bromphenolblau  
frisch zugeben: 10 mM DTT

8 x SDS-Auftragspuffer:

400 mM Tris, pH 6,8  
0,8% (w/v) SDS  
40% (v/v) Glycerin  
0,5% (w/v) BPB

5 mM DTT frisch zusetzen

### 3.5.3. Färbemethoden für Proteine

#### 3.5.3.1. Coomassie-Färbung

Um Proteine nach erfolgter PAGE sichtbar zu machen, werden sie im Gel mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Das Gel wird zunächst 20 min in Färbelösung und anschließend in Entfärbelösung geschwenkt, bis die Proteine als blaue Banden vor dem klaren Hintergrund sichtbar sind. Zum Trocknen wird das Gel luftblasenfrei zwischen zwei in Wasser getränkte, durchsichtige Cellulosefolien in einen Rahmen gespannt ("Gel Drying Kit", Promega) und über Nacht vertikal aufgestellt. Die untere Nachweisgrenze dieser Färbung liegt bei ca. 100 - 200 ng Protein.

Entfärbelösung: 40% (v/v) Methanol  
10% (v/v) Essigsäure

Färbelösung: 0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue in Entfärbelösung

#### 3.5.3.2. Silberfärbung

Mit einer Silberfärbung ("Silver Stain Kit: plus" der Firma Pharmacia Biotech) lassen sich Proteine noch im Nanogrammbereich nachweisen. Alle Arbeiten werden in sehr sauberen Plastikgefäßen durchgeführt. Das SDS-Polyacrylamidgel (8 cm x 10 cm) wird für 30 min sanft in 125 ml Fixierlösung, dann 30 min in 125 ml Sensibilisierungslösung und dreimal für je 5 min mit 100 ml deionisiertem Wasser gewaschen. Danach erfolgt die Färbung für 20 min in 125 ml Silberreaktionslösung, zweimal einminütiges Waschen in je 100 ml deionisiertem Wasser und anschließendes Entwickeln in 125 ml Entwicklerlösung. Bei Erreichen der gewünschten Farbintensität wird die Reaktion mit 100 ml Stopplösung beendet. Das Gel wird zwischen zwei in Wasser getränkte Cellophanfolien luftblasenfrei in einen Rahmen eingespannt und über Nacht getrocknet.

Fixierlösung: 50 ml Ethanol  
12,5 ml Eisessig  
62,5 ml deionisiertes Wasser

Sensibilisierungslösung: 37,5 ml Ethanol  
0,62 ml Glutardialdehyd (25% w/v)  
5 ml Natriumthiosulfat (5% w/v)  
8,5 g Natriumacetat  
auffüllen auf 125 ml mit deionisiertem Wasser

Silberlösung:	12,5 ml Silbernitratlösung (2,5% w/v) 0,05 ml Formaldehyd (37% w/v) 100 ml deionisiertes Wasser
Entwicklerlösung:	3,15 g Natriumcarbonat 0,025 ml Formaldehyd (37% w/v) auffüllen auf 125 ml mit deionisiertem Wasser
Stopplösung:	1,83 g EDTA 125 ml deionisiertes Wasser

### 3.5.4. Herstellung von Zellkernextrakten aus HeLa-Zellen

Die Präparation und die Extraktion von HeLa-Zellkernen wird in Anlehnung an das Protokoll von Dignam *et al.* (1983) durchgeführt. Es werden HeLa-Zellen einer Dichte von  $5,5 \times 10^5$  Zellen/ml aufgearbeitet. Die Zellen werden abzentrifugiert (Beckman J-6B, 10 min, 3.000 rpm, 4°C). Die Sedimente werden in wenig 1 x PBS suspendiert, vereinigt, in 50 ml Falcon Polypropylenröhrchen überführt, und erneut zentrifugiert (Heraeus, 2.500 rpm, 4°C). Das Volumen des Sedimentes (PCV, "packed cell volume") wird bestimmt, sollte jedoch unter 5 ml pro Röhrchen liegen. Ist es größer, werden die Zellen auf mehrere Röhrchen verteilt.

Ab dem folgenden Schritt werden alle Arbeiten bei 4°C im Kühlraum durchgeführt. Nach Abdekantieren des überstehenden Puffers werden die Röhrchen mit HB-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert (Heraeus, 2.500 rpm, 5 min, 4°C). Der Puffer HB liefert hypotone Bedingungen, was zum Anschwellen der Zellen führt. Das Volumen des Sediments (SCV, "swollen cell volume") sollte bei Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase zweifach höher sein als das der gepackten Zellen (PCV). Niedrigere Werte lassen darauf schließen, daß die Zellen nicht optimal gewachsen sind. Der Überstand wird vorsichtig abdekantiert, und die Sedimente werden im insgesamt vierfachen SCV an HB-Puffer suspendiert. In diesem Puffer läßt man die Zellen noch 10 min auf Eis schwellen. Der Fortgang des Anschwellens wird im Lichtmikroskop überprüft, wobei ein davor entnommenes Aliquot als Referenz dient. Anschließend wird die Suspension in einen vorgekühlten Glashomogenisator (Typ B) mit dicht sitzendem Pistill überführt. Die Zellsuspension wird durch 15 harte Stöße mit dem Pistill homogenisiert. Bei diesem Vorgang platzt die äußere Zellmembran, die Zellkerne jedoch bleiben intakt, was im Phasenkontrastmikroskop kontrolliert wird. Eine erneute Zentrifugation (Heraeus, 3.900 rpm, 15 min, 4°C) trennt die cytosolische Fraktion von den Zellkernen, die getrennt weiterverarbeitet werden.

• **Aufarbeiten des Cytosols:** Man mischt den Überstand mit 11% Volumenanteilen an 10 x Puffer, überführt die Suspension in mehrere vorgekühlte 50.2 Ti-Polycarbonatröhrchen und zentrifugiert unlösliche Bestandteile wie Membranfragmente, Mitochondrien sowie Ribosomen in der

Ultrazentrifuge ab (Beckman, 30.000 rpm, 1 h, 4°C). Das schmierige Sediment wird mit einem Spatel in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der Überstand wird in vorbehandelte Dialyseschläuche (Spektra/Por, molekulare Ausschlußgrenze 6.000 - 8.000) überführt, und für 5 h gegen 2 liter BC-100 dialysiert. Nach erneuter Zentrifugation (Sorvall, SS34, 16.000 rpm, 30 min, 4°C) wird der Überstand (jedoch ohne die auf der Oberfläche flotierende Lipidphase) aliquotiert und in Stickstoff eingefroren. Die gewonnene cytosolische Proteinlösung wird als S-100 bezeichnet.

• **Aufarbeiten der Zellkerne:** Bei der Herstellung von transkriptionsaktiven Zellkernextrakten hat es sich bewährt, über den präparierten Zellkernen ca. 3 mm des Cytosols stehenzulassen. Das Volumen der Zellkerne (NPV) wird bestimmt. Zu den Zellkernen gibt man ein halbes NPV kalten Niedrigsalzpuffer, überführt sie in den Homogenisator (Typ B), durchmischt die Suspension sechsmal vorsichtig mit dem Pistill, und legt diese Suspension in einem Plastik-becher vor. Die eigentliche Extraktion der Kerne vollzieht sich durch langsames Zutropfen eines halben NPV Hochsalzpuffers über einen Zeitraum von 30 min unter ständigem Rühren. Nach weiteren 30 min Rühren wird der Extrakt abzentrifugiert (Sorvall, SS34, 14.000 rpm, 30 min, 4°C). Das Sediment besitzt durch den hohen Gehalt an chromosomaler DNA eine gummiartige Konsistenz. Es wird in den Homogenisator (Typ B) transferiert, mit 10 ml TGME-Puffer versetzt, durch 20 Stöße mit dem Pistill homogenisiert, und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hieraus kann später RNA-Polymerase II präpariert werden. Der klare Zellkernextrakt wird in Dialyseschläuche überführt und gegen BC0 dialysiert, bis die Leitfähigkeit von BC100 erreicht ist (ca. 50 min). Es schließt sich ein letzter Zentrifugationsschritt an (Sorvall, SS34, 18.000 rpm, 20 min, 4°C), bevor der Zellkernextrakt aliquotiert in flüssigem Stickstoff eingefroren wird.

In einem typischen Ansatz werden bis zu  $1 \times 10^{10}$  Zellen aufgearbeitet. Daraus werden ca. 80 ml Zellkernextrakt einer Konzentration von 9 mg/ml sowie ca. 100 ml der cytosolischen Fraktion einer Konzentration von 11 mg/ml gewonnen.

Die Puffer werden mit Tris pH 6,8 bei RT eingestellt (entspricht pH 7,3 bei 4°C). Den BC-Puffern wird vor Gebrauch 5 mM DTT, 1 mM PMSF (Stocklösung 200 mM in DMSO) zugesetzt.

HB - Puffer:	10 mM Tris, pH 6,8 (RT) 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM KCl	10 x Puffer:	30 mM MgCl <sub>2</sub> 300 mM Tris, pH 6,8 (RT) 1400 mM KCl
Niedrigsalzpuffer:	20 mM Tris, pH 6,8 (RT) 25% (v/v) Glycerin 20 mM KCl 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,2 mM EDTA	Hochsalzpuffer:	20 mM Tris, pH 6,8 (RT) 25% (v/v) Glycerin 1200 mM KCl 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,2 mM EDTA

TGME-Puffer:	25% (v/v) Glycerin 50 mM Tris, pH 7,3 (RT) 5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,1 mM EDTA	BC0:	20 mM Tris, pH 6,8 (RT) 20% (v/v) Glycerin 0,2 mM EDTA
BC100:	20 mM Tris, pH 6,8 (RT) 20% (v/v) Glycerin 0,2 mM EDTA 100 mM KCl		

### 3.5.5. Heterologe Expression von Proteinen in *E. coli*

Die Überexpression von Proteinen in *E. coli* basiert auf dem von Studier und Moffatt (1986) entwickelten System, bei der die cDNA des Proteins unter Kontrolle des T7-RNA-Polymerase-Promotors steht. Die T7-RNA-Polymerase selbst ist durch Zugabe von IPTG induzierbar. In dieser Arbeit wurden die Expressionsplasmide pET15b und pET11a sowie die *E. coli*-Stämme BL21(DE3) bzw. BL21(DE3) pLysS (Novagen) verwendet.

- **Expression:** 250 ml TBG-M9 Medium werden mit einer Kolonie rekombinanter *E. coli* BL21(DE3) bzw. BL21(DE3) pLysS angeimpft und über Nacht bei RT geschüttelt. Am nächsten Tag wird die Kultur bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 angezogen. Bei der Expression schwerlöslicher Proteine hat es sich bewährt, die gesamte Expression bei RT durchzuführen. Die Expression des Proteins wird durch Zugabe von 0,4 mM IPTG induziert. Nach weiteren 3 h Wachstum werden die Zellen im GSA-Rotor abzentrifugiert (15 min, 3500 rpm, 4 °C) und anschließend das Naßgewicht des Bakteriensediments bestimmt. Die Zellen können vor ihrer Weiterverarbeitung an dieser Stelle in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert werden.

Der Verlauf der Induktion wird durch stündliche Probenentnahme dokumentiert. Dazu werden jeweils 0,2 ml Zellsuspension entnommen, in der Tischzentrifuge sedimentiert (30 s, 11.000 rpm, RT), und in 0,1 ml 1 x Harnstoff-Auftragspuffer aufgenommen. Die entnommenen Proben erhitzt man 5 min bei 95°C und mischt kräftig auf dem Vortex. Diese Prozedur wird zweimal wiederholt, wobei die chromosomale DNA soweit fragmentiert wird, daß die Proben ihre hohe Viskosität verlieren. Auf einem SDS-Proteingel werden jeweils 10 µl Aliquots analysiert, die einer Zelldichte von OD<sub>600</sub> = 0,6 entsprechen.

- **Denaturierende Aufarbeitung:** Zur Aufreinigung yTFIIA-Untereinheiten wt-Toa1, mt-Toa1 und Toa2 wird denaturierende Aufarbeitung eingesetzt. Man nimmt die Zellen in 5 ml Puffer A pro g Bakteriensediment auf, mischt und inkubiert 30 min bei RT unter sanftem Schwenken, bis die vollständige Lyse der Zellen eingetreten ist. Unlösliche Membran- und Lipidanteile werden

abzentrifugiert (SS34, 18.000 rpm, 15 min), der Überstand wird bei 4°C gelagert. Für die denaturierende Aufarbeitung hat es sich bewährt, ein Protein bei 37°C so stark zu überexprimieren, daß es größtenteils in den Bakterien in Einschlusskörpern eingelagert wird. Diese lassen sich durch wiederholte Ultraschallbehandlung (siehe unten) aufreinigen, da hierbei nur zelluläre Proteine in Lösung gehen, nicht aber die Einschlusskörper. Meist wird nach dreimaliger Ultraschallbehandlung ein weißes Sediment erhalten, das in 20 ml Puffer A gelöst wird.

• **Native Aufarbeitung:** Für die native Reinigung des überexprimierten Proteins suspendiert man die Bakterien in 20 ml Lysispuffer, dem folgende Proteaseinhibitoren frisch zugesetzt worden sind: AEBSF (in H<sub>2</sub>O) ad 1 mM, β-Mercaptoethanol ad 20 mM, Leupeptin (in H<sub>2</sub>O) ad 20 µg/ml, Aprotinin (in H<sub>2</sub>O) ad 10 µg/ml, Benzamidin (in DMSO) ad 20 µg/ml, TPCK (in DMSO) ad 2 µg/ml, und EDTA ad 1 mM. Auf EDTA wird verzichtet, wenn das Protein nachfolgend über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt werden soll. Alternativ zu AEBSF wird PMSF (in DMSO) ad 1 mM zugesetzt. Dieser und alle folgenden Arbeitsschritte werden im Kühlraum auf Eis durchgeführt.

Die Zellen werden mit Hilfe von Ultraschall aufgeschlossen (Branson Sonifier W 250, spitze Form r = 0,25 cm). Die Bakteriensuspension wird in einem 50 ml Falcon Polypropylenröhrchen eiskühlt zweimal 10 min bei einer Pulsdauer von 30% und einer Pulsstärke von 3-4 Einheiten auf der Geräteskala beschallt, wobei zwei Pausen von jeweils 5 min eingelegt werden. Das leicht bewegliche Lysat wird 30 min in einem SS34-Rotor zentrifugiert (30 min, 18.000 rpm, 4°C). Je ein Aliquot vom Überstand und Sediment wird für eine SDS-PAGE abgezweigt.

Optional schließt sich hier eine Ammoniumsulfatfällung an, die sich bei der Aufreinigung rekombinanter Transkriptionsfaktoren bewährt hat (Hoffmann und Roeder, 1991). Zum Überstand wird langsam ein Volumenanteil (20 ml) eiskaltes H<sub>2</sub>O unter Rühren zugegeben. Man tropft über einen Zeitraum von 30 min einen Volumenanteil (20 ml) gesättigte Ammoniumsulfatlösung unter ständigem Rühren zu (Endkonzentration 33%). Danach wird die Lösung für 1 h weitergerührt. Das Präzipitat der Fällung wird in einem SS34-Rotor abzentrifugiert (30 min, 18.000 rpm, 4°C), der verbleibende Überstand wird bei 4°C aufgehoben. Je ein Aliquot vom Überstand und Sediment wird für eine SDS-PAGE entnommen, wobei der Überstand wegen seines hohen Salzgehalts vor der Analyse gegen BC100 dialysiert werden sollte.

Puffer A:           8 M Harnstoff  
                      20 mM Tris-HCl, pH 7,3  
                      0,2 mM EDTA, pH 8,0  
                      20% Glycerol  
                      100 mM KCl

Lysispuffer:       10% (v/v) Glycerin  
                      500 mM NaCl  
                      20 mM Tris-HCl, pH 7,3  
                      0,1% (v/v) NP-40  
                      20 mM β-Mercaptoethanol

### 3.5.6. Säulenchromatographie

Für die Chromatographie werden Säulen entweder mit Austauschermaterial beschickt oder es werden bereits fertig gepackte Säulen verwendet, die an das FPLC-System oder an das SMART-System (Pharmacia Biotech) angeschlossen werden. Mit Hilfe dieser Anlagen gelingt es, die Reinigung weitgehend zu automatisieren.

Die einzelnen Chromatographieschritte werden photometrisch parallel bei Wellenlängen von 215 nm, 260 nm, und 280 nm verfolgt und die Säulenuate fraktioniert gesammelt. Da die Dimension einer Säule von der spezifischen Bindungskapazität sowie der Proteinbeladung abhängt, werden die verwendeten Volumina an Puffer und die Flußraten auf das Säulenvolumen bezogen (CV, Säulenvolumen; CV/h, Säulenvolumen pro Stunde). Wird die Chromatographie auf dem SMART-System durchgeführt, so werden modifizierte BC-Puffer eingesetzt, die statt 20% (v/v) nur 10% (v/v) Glycerin enthalten, was die Viskosität des Laufmittels herabsetzt. Alle Puffer werden vor ihrer Verwendung durch Filtration im Wasserstrahlvakuum (Porendurchmesser des Filters: 0,45 µm) von makroskopischen Partikeln befreit. Die Elution von Ionentauschersäulen erfolgt, wenn nicht anders beschrieben, über einen linearen Salzgradienten von 100 mM bis zu 1000 mM KCl (bzw. NaCl) über 10 Säulenvolumen. Die Elutionsfraktionen werden in Aliquots von einem halben Säulenvolumen gesammelt. Gegebenenfalls werden die Elutionsfraktionen im Mikromaßstab dialysiert. Proben, die in SDS-PAGE oder Immunoblots analysiert werden sollen, werden ohne BSA in flüssigem Stickstoff eingefroren. Proben, die funktionell untersucht werden sollen, und deren Proteinkonzentration unter 0,5 mg/ml liegt, wird BSA bis zu einer Proteingesamt-konzentration von 0,5 mg/ml zugegeben, bevor sie in flüssigem Stickstoff eingefroren werden.

#### 3.5.6.1. Phosphocellulose-Chromatographie

Das Kationenaustauschermaterial Phosphocellulose wird in einem Fraktionierungsschema nach Roeder und Kollegen (Matsui *et al.*, 1980) als erstes eingesetzt, um die generellen Transkriptionsfaktoren und Cofaktoren in einem HeLa-Zellkernextrakt chromatographisch aufzutrennen. Phosphocellulose besitzt eine sehr hohe Proteinbindungskapazität (10-20 mg/ml) und eignet sich daher auch gut zum Konzentrieren von Lösungen mit niedrigem Proteingehalt.

- **Vorbereiten des Säulenmaterials:** Das Phosphocellulosematerial (P11, Whatman) wird mehrmals in Wasser gewaschen. Es werden 25 Volumenanteile (bezogen auf das Volumen des gequollenen Materials) 0,5 N Natronlauge zugegeben und nach 5 min über eine Fritte im

Wasserstrahlvakuum abgesaugt. Das Material wird mit Wasser gewaschen, bis der Durchlauf einen pH-Wert von 1 Liter erreicht hat. Die Phosphocellulose wird mit 25 Volumenanteilen 0,5 N Salzsäure 5 min inkubiert, die dann ebenfalls abgesaugt wird. Es schließt sich ein weiterer Waschschrift mit Wasser an, bis ein pH-Wert von 3 erreicht ist. Das Material wird über Nacht mit 1 M Tris pH 7,0 äquilibriert, bis der pH-Wert konstant bei 7,0 bleibt. Das Säulenmaterial kann so bei 4°C mehrere Wochen aufbewahrt werden.

- **Chromatographie:** Eine Leersäule ("Econo-column", BioRad) wird mit dem in BC100 äquilibrierten Phosphocellulosematerial unter Gravitationsfluß beschickt. Die Menge des eingefüllten Säulenmaterials richtet sich nach der zu ladenden Proteinmenge, wobei unter den gewählten Bedingungen ca. 50% des Gesamtproteins eines Zellkernextrakts an die Säule binden. Der Zellkernextrakt wird mit einer konstanten Flußrate von einem Säulenvolumen (1 CV/h) pro Stunde geladen (Pumpentyp P1, Pharmacia). Die Säule wird mit 10 CV BC100 bei einer Flußrate von 5 CV/h gewaschen. In drei weiteren aufeinanderfolgenden Elutionschritten werden die Phosphocellulose 0,3 M KCl-, die 0,5 M KCl- und die 0,85 M KCl-Fractionen abgetrennt. Zwischen zwei Elutionsschritten wird mit mindestens 10 CV bei einer Flußrate von 5 CV/h gewaschen. Bei der Elution einer Fraktion wird eine Flußrate von 3 CV/h eingehalten. Erfahrungsgemäß enthalten die Phosphocellulose 0,1 M KCl-Fraktion ca. 50%, die 0,3 M KCl-Fraktion ca. 35%, die 0,5 M KCl-Fraktion ca. 10% und die 0,85 M KCl-Fraktion ca. 4% des Gesamtproteins eines Zellkernextrakts.

### 3.5.6.2. DEAE-Cellulose (DE52)-Chromatographie

Das schwache Anionenaustauschermaterial DEAE-Cellulose DE52 wird meistens nach einer Phosphocellulose eingesetzt, um die Transkriptionsfaktoren weiter chromatographisch aufzutrennen. DE52 besteht aus an Cellulose gebundenen Diethylaminoethylgruppen und besitzt eine durchschnittliche Proteinbindungskapazität (4 - 10 mg/ml).

- **Vorbereiten des Säulenmaterials:** 100g DEAE-Cellulosematerial (DE52, Whatman) werden mehrmals in Wasser gewaschen und anschließend über Nacht in 500 ml Puffer (0,5 M Tris, pH 7,4; 0,5 M Ammoniumsulfat, pH 7,9) equilibriert und kann bei 4°C und 0,02% Azid mehrere Wochen gelagert werden. Nach Abziehen des Puffers über eine Fritte im Wasserstrahlvakuum wird das Material mehrfach mit BC-Puffer der gewünschten Ionenstärke gewaschen.

- **Chromatographie:** Eine Leersäule ("Econo-column", BioRad) wird mit dem in BC100 äquilibrierten DEAE-Cellulosematerial unter Gravitationsfluß beschickt. Die Menge des eingefüllten Säulenmaterials richtet sich nach der zu ladenden Proteinmenge. Die Proteinfraction wird mit einer konstanten Flußrate von einem Säulenvolumen (2 CV/h) pro Stunde geladen (Pumpentyp P1,

Pharmacia). Die Säule wird mit 10 CV BC100 bei einer Flußrate von 5 CV/h gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgt in einem Gradienten von 5-10 CV und einer Flußrate von 3-4 CV/h.

### 3.5.6.3. Sepharose-Ionenaustauscher

Die Mono Q- bzw. die Q-Sepharose-Säulen sind starke Anionenaustauscher, die quartäre Amine  $[-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3]$  als Austauschergruppen enthalten. Mono S- bzw. S-Sepharose-Säulen sind dagegen Kationenaustauscher mit Sulfonsäuregruppen  $[-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-]$  als Austauschergruppen. Diese Säulen haben sich ebenfalls als effiziente Werkzeuge zur Reinigung von Transkriptionsfaktoren erwiesen. Die hier beschriebenen Säulen sind vom Hersteller (Pharmacia-Biotech) bereits fertig gepackt. Mit dieser Methode lassen sich die rekombinanten NC2 $\beta$  und NC2 $\beta$ -Derivate aufreinigen.

### 3.5.6.4. Gelfiltration

Die Gelfiltration ist neben der Proteinreinigung auch dazu geeignet, native Größen von Proteinen (oder Proteinkomplexen) abzuschätzen. Die Superdex 75-Säule (SMART-System) wird zur Untersuchung der Dimerisierung von yTFIIA-Untereinheiten Toa1 (bzw. Toa1-Suppressormutante) und Toa2 verwendet. Sie trennt optimal im Molekulargewichtsbereich zwischen 3-70 kDa. Die Flußrate beträgt 20 - 40  $\mu\text{l}/\text{min}$  bei einem Druck von 1 - 2 MPa. Die Fraktionsvolumina betragen im allgemeinen 30 - 50  $\mu\text{l}$ . Es können bis zu 0,5 mg Gesamtprotein in einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$  aufgetragen werden. Die Gelfiltration wird mit Größenstandards bekannten Molekulargewichts geeicht. wt- und mt-Toa1 und Toa2 werden getrennt expremiert in *E. coli*. Die unlösliche Überexprierte Proteine werden gereinigt über Einschlußkörper. Gleiche Menge von Toa1- und Toa2-Untereinheit werden co-renaturiert (beschrieben in Kapitel 3.5.5). Das molekulare Gewicht der nativen Toa1 ist 32 kDa und das der Toa2 liegt bei 13,5 kDa.

### 3.5.6.5. Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie

Als Säulenmaterial wird mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen beladene immobilisierte Nitrilotriessigsäure (NTA) verwendet, die dann spezifisch an Cluster von Histidinresten bindet (Hochuli *et al.*, 1987). Dies wird bei der Reinigung rekombinanter Proteine ausgenutzt, die als Fusionsproteine mit einem Hexahistidinrest expremiert werden.

• **Denaturierende Aufreinigung:** Alle Schritte werden bei RT durchgeführt. Die Bakterienzellen bzw. die vorgereinigten Einschlußkörper liegen gelöst in Puffer A vor (siehe Kapitel 3.5.5). Das

Beladen der in Puffer A äquilibrierten Säulenmatrix erfolgt in einem 50 ml Falcon-Gefäß durch Zugabe des Lysats und Inkubation für 1 h auf einem Drehrad. Das Säulenmaterial wird dann zentrifugiert, und dreimal in 50 ml Puffer A gewaschen (jeweils 10 min Drehrad, 3 min Heraeus Zentrifuge, 2500 rpm). Anschließend wird das Säulenmaterial mit Puffer B äquilibriert und zweimal mit 50 ml des gleichen Puffers gewaschen. In acht aufeinanderfolgenden Schritten wird durch Zugabe von jeweils einem Volumenanteil BC400 die Harnstoffkonzentration in jeden Schritt halbiert. Sobald die Proteinlösung weniger als 2 M Harnstoff enthält, wird auf Eis weitergearbeitet. Die Säulenmatrix wird abschließend in BC400 äquilibriert. Die Elution des gebundenen Proteins folgt dem im nächsten Kapitel beschriebenen Protokoll.

hTFIIA ( $\alpha\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit) wird zum Beispiel wie oben beschrieben gereinigt (bereitgestellt von AG Meisterernst).  $\gamma$ TFIIA-Untereinheiten Toa1, mt-Toa1 und Toa2 werden denaturierend getrennt in *E. coli* exprimiert und Toa1- zusammen mit Toa2-Untereinheit werden über Dialyse mit schrittweise reduzierter Harnstoff-Konzentration renaturiert. Die vorgereinigten Einschlusskörper befinden sich gelöst in Puffer A. Gleiche Menge wt-Toa1 und Toa2 oder mt-Toa1 und Toa2 werden gemischt und auf Drehrad gegen Puffer A mit 4 M Harnstoff für 6 h bei RT dialysiert. Anschließend wird die Proteinlösung gegen Puffer A mit 2 M Harnstoff ÜN dialysiert. Die aktive Proteinlösungen werden erhalten bei einer Dialyse gegen Puffer A ohne Harnstoff bei 6°C für 12 h.

• **Native Aufreinigung:** Alle Arbeiten werden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Die Proteinlösung wird mit 2 mM Imidazol versetzt auf eine  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarosesäule geladen, die in dem gleichen Puffer äquilibriert worden ist. Die gebundene Proteinfraction wird mit BC400-Puffer gewaschen, der 15 mM Imidazol enthält, und mit BC400-Puffer eluiert, der 200 mM Imidazol enthält. Die eluierten Proteinfractionen werden über SDS-PAGE analysiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80°C gelagert.

Puffer B:            8 M Harnstoff  
                      0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
                      0,01 M Tris  
                      0,1 M NaCl  
                      pH mit NaOH auf 8,0 einstellen

### 3.5.6.6. Heparin-Sepharose-Chromatographie

Im Gegensatz zu vielen Transkriptionsfaktoren bindet nur ein geringer Bruchteil der *E. coli* Proteine unter den gewählten Bedingungen an die Heparin-Sepharosematrix. Deshalb schließt sich der Nickelsäule oft eine Heparinsäule an, wenn hohe Reinheitsgrade einer Proteinpräparation gefordert sind. Mit einer Proteinbindungskapazität von 10 mg/ml eignet sich dieser

Kationenaustauscher mit den Eigenschaften eines DNA-Analogons auch gut zum Konzentrieren einer Proteinlösung.

Das Protein wird in BC200 auf das nach Herstellerangaben vorbehandelte Säulenmaterial geladen, extensiv mit dem gleichen Puffer gewaschen, und mit BC600 eluiert. Mit dieser Methode lassen sich rekombinantes NC2 $\alpha$  und NC2 $\alpha$ -Derivate effizient reinigen und anreichern.

### **3.5.6.7. Immunopräzipitation**

Durch die Immunopräzipitation läßt sich nachweisen, daß verschiedene Proteine in Lösung miteinander assoziiert sind. Zum Nachweisen der Bindungsaffinität von NC2 (NC2-Mutante) zu TBP wird Antikörper gegen einer Untereinheit von NC2 (NC2 $\alpha$ ) an eine Protein G-Säule kovalent gekoppelt. 50 ml Antikörper-Überstand, der 20-50 ng/ $\mu$ l Protein enthält wird mit 150  $\mu$ l Protein G-Beads inkubiert, dadurch wird eine Ladung von 17  $\mu$ g Proteine/pro  $\mu$ l Beads erreicht. In einer Puffergemisch mit einem Gesamtvolumen von 1 ml, werden hTBP (480 ng) und NC2 (700 und 1750 ng) für 30 min bei RT vorinkubiert bevor 10  $\mu$ l 10% NP40 und 5  $\mu$ l (großer Überschuß zum Test-Proteine) der Sepharosematrix mit gekoppelter Antikörper zugegeben werden. Die Pufferbedingungen werden so gewählt, daß sie für die Protein-Protein-Assoziation optimal ist. Die werden vorher in Gel-shift Experiment (EMSA) ausgetestet. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei RT. Der Beads werden durch kurz Anzentrifugation (RT, 2000 rpm für 3-5 min) pellettiert. Nach 3x waschen mit Inkubationspuffer inklusive 0,1% NP40 werden die gebundene Proteine mit 20  $\mu$ l SDS-Auftragspuffer durch Aufkochen eluiert. Die Anwesenheit der Test-Proteine werden in Western-Blot nachgewiesen.

## **3.6. Immunochemische Arbeitstechniken**

### **3.6.1. Western-Blot Analyse**

Der Immunoblot dient der Identifizierung eines spezifischen Antigens mittels eines polyklonalen oder monoklonalen Antikörpers, der gegen das Antigen gerichtet ist. Ein zweiter Antikörper bindet nachfolgend an eine konservierte Domäne des ersten Antikörpers, der seinerseits das spezifische Antigen erkennt. An den zweiten Antikörper ist kovalent ein Enzym gekoppelt, das durch den Umsatz seiner Substrate die Detektion des Sandwichkomplexes erlaubt. Als Nachweisreaktionen werden entweder die Bildung eines schwerlöslichen Farbstoffes oder aber die Entstehung photolabiler Komplexe verwendet, die über ihre Chemolumineszenz detektiert werden.

Zunächst werden die Proteinfractionen über SDS-PAGE aufgetrennt. Als Marker wird ein vorgefärbter Längenstandard (Bio-Rad) aufgetragen, dessen Banden bereits während der Elektrophorese erkennbar sind. Nach der Elektrophorese wird das Gel unter Transferpuffer mit einer ebenso großen, angefeuchteten Nitrocellulosemembran (0,45 µm Porengröße) bedeckt. Zwischen zwei Doppellagen angefeuchtetem 3 MM Papier (Whatman) werden die Proteine in einer Naßblotapparatur (BioRad) auf die Nitrocellulosematrix für 2 h bei 70 V (oder 20 V, ÜN) im Kühlraum transferiert. Der erfolgreiche Transfer ist an der Übertragung des vorgefärbten Molekulargewichtsstandards erkennbar. Wird alternativ ein ungefärbter Längenstandard eingesetzt, der eine exaktere Zuordnung der Größen erlaubt, kann man den Blot reversibel mit Ponceau S-Lösung anfärben. Der Blot läßt sich durch fünfminütiges Waschen mit Wasser wieder völlig entfärben.

Die Membran mit den gebundenen Proteinen wird zunächst für 30 min in TBS mit 6% (w/v) Magermilchpulver bei RT geschüttelt, um unspezifische Bindungsstellen auf der Matrix abzusättigen. Für die sich anschließende Inkubation mit dem ersten Antikörper werden Verdünnungen von 1:10 bis 1:1000 in TBST verwendet. Die Membran wird zweimal je 5 min mit TBST gewaschen. Der entweder an alkalische Phosphatase oder Peroxidase gekoppelte zweite Antikörper wird 1:2.000 bis 1:10.000 in TBST verdünnt eingesetzt. Nach zwei weiteren je fünfminütigen Waschschritten in TBST wird der Blot kurz getrocknet und dann entwickelt.

Der Nachweis erfolgt bei phosphatasegekoppelten Antikörpern in 10 ml AP-Puffer, dem 66 µl NBT-Lösung und 33 µl BCIP-Lösung frisch zugesetzt werden. Bei Erreichen der gewünschten Farbintensität wird die Reaktion durch Waschen des Blots in Wasser gestoppt. Der Blot wird getrocknet und lichtgeschützt aufbewahrt. Peroxidasegekoppelte Antikörper werden über eine photochemische Reaktion nachgewiesen. Dabei wird die Membran noch zwei weitere Male intensiv in TBST gewaschen und feucht für 1 min unter Lichtausschluß mit den 1:1 gemischten Reagenzlösungen (ECL Western blotting detection reagents 1 und 2, Amersham Buchler) inkubiert. Der Nachweis erfolgt durch Exposition der in Frischhaltefolie eingewickelten Membran auf einem Film in einer Autoradiographiekassette (10 Sec bis 5 Min).

Transfer-Puffer:	192 mM Glycin 25 mM Tris 20% (v/v) Methanol	BCIP:	50 mg/ml (in DMF gelöst)
TBS:	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 150 mM NaCl	NBT:	50 mg/ml (in DMF gelöst)
TBST:	0,05% (v/v) Tween-20 in TBS	AP-Puffer:	100 mM Tris/HCl, pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub>
Ponceau S-Lösung:	0,5 g Ponceau S in 1 ml Eisessig lösen H <sub>2</sub> O ad 100 ml, Lösung filtrieren		

### 3.7. Funktionelle Analysen

#### 3.7.1. Gelretardationsanalyse (EMSA)

Mit der Gelretardationsanalyse lassen sich DNA-bindende Proteine über die im Vergleich zur freien DNA geringere Mobilität von Protein-DNA-Komplexen in nativen Gelsystemen nachweisen (Fried und Crothers, 1981). Die Proteinlösung wird mit 25-50 fmol eines  $^{32}\text{P}$ -endmarkierten DNA-Fragments 30 min in Puffer N oder alternativ unter Transkriptionsbedingungen (siehe Kapitel 3.8.3) bei 28°C inkubiert. In DNA-Bindungsexperimenten werden 5-50 ng hTBP oder  $\gamma$ TBP, 1-50 ng aktive  $\gamma$ TFIIA (bestimmt durch Titration von Proteinen bei einer Überschuß von TBP und DNA in EMSA-Experiment), bis zu 200 ng NC2-Derivate und 25-75 fmol klenow-markierte 60 bp-Oligonukleotide mit HIV Corepromoter oder 90 bp-Oligonukleotide mit ML-Promoter eingesetzt. Auf diese Konzentrationen der NC2-Derivate wird im Text als Standardkonzentrationen Bezug genommen. Bei der Analyse von TBP- $\gamma$ TFIIA-DNA-Komplexen werden dem Gel 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT und dem Laufpuffer 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$  zugesetzt. Lange DNA-Fragmente (230 bp) werden in 4,5%igen (19:1) Polyacrylamidgelen, kürzere (60 bp und 90 bp) Oligodeoxyribonukleotide in 5%igen (50:1) Polyacrylamidgelen analysiert.

- **Herstellung eines nativen Polyacrylamidgels:** 50 ml der Gellösung werden mit 0,4 ml 30% (w/v) APS-Lösung und 20  $\mu\text{l}$  TEMED vermischt und zwischen die Glasplatten (20 cm x 16 cm) gegossen. Nach Einsetzen des Geltaschenformers polymerisiert das Gel für mindestens 2 h aus.
- **Gellauf:** Bei EMSA-Gelen dient 1 x TGE (evtl. mit 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) als Laufpuffer elektrophoretisiert werden. Vor dem Probenauftrag wird 2 h eine Vorelektrophorese bei 120 V, RT oder 140 V bei 6°C durchgeführt; danach wird der Laufpuffer ausgewechselt. Die Elektrophorese erfolgt bei Spannungen von 120 V bei RT oder 140 V bei 6°C über einen Zeitraum von 3 h bis 15 h. Als Laufmarker dienen BPB und XC. Doppelsträngige Oligodeoxyribonukleotide einer Länge von 60 bp laufen in 5%igen Gelen etwa auf Höhe des BPB-Markers, ein 230 bp DNA-Fragment etwa halb so schnell wie der XC-Marker. Das Gel wird nach der Elektrophorese auf ein Whatman 3 MM-Papier übertragen, mit Frischhaltefolie bedeckt und zwischen zwei Lagen saugfähigem Papier 1 h bei 80°C auf dem Geltrockner getrocknet. Für die quantitative Analyse wird das getrocknete Gel auf einem Direct Imager ausgewertet. Die Autoradiographie der bei 80°C im Wasserstrahlvakuum getrockneten Gele erfolgt bei - 80°C mit Verstärkerfolie.

Puffer N:           5 mM  $\text{MgCl}_2$   
                      5 mM DTT  
                      1 mM PMSF  
                      0,2 mg/ml BSA  
                      25 mM Hepes-KOH, pH 8,2

2,5 µg/ml pdGdC

Gellösung: 5% (w/v) (50:1) Acrylamid/Bisacrylamid  
optional 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 x TGE

10 x TGE: 250 mM Tris  
1,24 M Glycin  
10 mM EDTA, pH 8,0

• **Zirkuläre Permutationsanalyse:** Aus dem Laufverhalten von Protein-DNA-Komplexen, deren Bindungsstelle auf einem DNA-Fragment verschoben wird (zirkulär permutiert wird), kann abgeleitet werden, ob das Protein die DNA verbiegt.

Die 224 bp DNA-Fragmente stammen aus dem Plasmide pBL2-MLP, das mit den Restriktionsenzymen *Mlu* I, *EcoR* V, *Sma* I und *BamH* I hydrolysiert wurde.

### 3.7.2. DNase I-Footprinting Analyse

DNase I-Footprinting (Galas und Schmitz, 1978) von spezifisch DNA-bindenden Proteinen wird nach einer modifizierten Methode von Jones *et al.* (1987) durchgeführt. Ein Bindungsansatz enthält drei- bis fünffach höhere Konzentrationen an hTBP und yTBP als in den Gelretardationsexperimenten (Kapitel 3.7.1) und 10-25 ng yTFIIA in einem Gesamt-volumen von 20 µl. Darüberhinaus enthalten die Reaktionsansätze 0,5 µg pdGdC und 50 fmol eines durch T4-Polynukleotidkinase endmarkierten 60 bp oder 90 bp HIV-Corepromotor-fragment. Um in jedem Ansatz die gleiche DNase I-Aktivität zu erhalten, empfiehlt es sich, die Proteinkonzentration jeweils durch Zugabe von BSA anzugleichen. Die Bindungsansätze werden 1:3 mit Verdünnungspuffer verdünnt, 2 min bei RT inkubiert, mit 0,15% (v/v) DNase I-Lösung (0,4 mg/ml) und 1 min bei RT inkubiert. Die Verdünnung ist zum einen notwendig, um den Prozentsatz des Glycerins (bis zu 20% (v/v) Endkonzentration) aus den Proteinlösungen zu senken, und zum anderen, um die Proteinkonzentration (bis zu 1,5 µg/ml) zu erniedrigen. Die Bedingungen werden so gewählt, daß etwa 50% der DNA einmal durch DNase I genickt werden. Nach dem DNase I-Verdau werden die Proben wie in den Transkriptionsreaktionen prozessiert (siehe Kapitel 3.7.4.) und über denaturierende Sequenzgel analysiert.

Verdünnungspuffer: 10 mM HEPES-KOH, pH 8,2  
0,5 mg/ml BSA  
5 mM CaCl<sub>2</sub>  
50 mM KCl  
50 µg/ml pdGdC

### 3.7.3. Im Gel Footprinting Analyse mit 1, 10-Phenanthrolin-Kupfer Ion kombiniert mit Gel-Retardationsanalyse (Papavassiliou, A.G. 1994)

Alternative zu DNase I-footprinting Analyse, wird Kupfer-*o*-Phenanthrolin (OP-Cu), eine effiziente chemische Nuklease eingesetzt. Der 1,10-ortho-Phenanthrolin-Kupfer (I)-Komplex ( $[\text{OP}]_2\text{Cu}^+$ ) lagert sich an die kleine Furche der DNA-Doppelhelix und führt zur DNA-Spaltung nach einem komplexen Mechanismus, bei dem überwiegend das C1'-Atom der Desoxyribose angegriffen wird. Es kommt zu Eliminierung des Nukleotids zwischen zwei Phosphaten und führt dadurch zur Lückenbildungen im DNA-Rückgrat. Da Footprinting mit OP-Cu außerdem stark abhängig von der Konformation der DNA ist, kann deshalb OP-Cu auch zur Analyse der lokalen Veränderungen der DNA-Struktur eingesetzt werden.

Das Footpringmuster mit OP-Cu ist in Prinzip ähnlich wie dasjenige mit DNaseI, weil beide in der kleinen Furche der DNA sich lagern und somit die Protein-DNA-Wechselwirkung in der kleinen Furche ermitteln. Gegenüber DNase I hat OP-Cu den Vorteil, daß es eine kleinere Molekül ist, und somit auch die Grenzbereiche von DNA und gebundenen Proteine, die sonst wegen gegenseitiger sterischer Behinderung zwischen Proteine und DNase I maskiert bleiben, auflösen kann.

Eine Kombination der Footprinting-Technik mit Gelretardationsanalyse führt zur Reduktion der starken Hintergrund, der durch unvollständigen Bindung der Proteine zustande kommt. Und die Durchführung der Nukleasenbehandlung im Gel statt in Lösung bietet ein zusätzliche Vorteil mit sich, da der Gelmatrix ein Kompartiment für die Protein-DNA-Komplex dient und eine Dissoziation der Proteine von DNA verhindert.

Dazu werden zunächst die Bindungsreaktionen mit Proteine und DNA unter standard Shift-Bedingungen durchgeführt. Die Protein-DNA-Komplexen und die freie DNA-Fragmente werden in nativen Polyacrylamidgele aufgetrennt. Nach dem Lauf, wird das Gel von den Glasplatten abgetrennt und in 200 ml 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) äquilibriert. Folgende Lösungen werden frisch eingesetzt: 58 mM 3-Mercaptopropionsäure (MPA), 40 mM 1,10-Phenanthrolin (OP) und 9 mM  $\text{CuSO}_4$ . Davon werden 1 ml OP-Lösung und 1 ml  $\text{CuSO}_4$  zusammengepipettiert, und 18 ml  $\text{H}_2\text{O}$  zugesetzt. Diese 20 ml OP/ $\text{Cu}^{2+}$ -Lösung wird zu 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 zugegeben und durch Schwenken zugemischt. Die chemische Nukleasenreaktion wird gestartet durch Zugabe von 20 ml MPA-Lösung. Nach einer Inkubation für 10 min. bei 37°C wird Reaktion gestoppt durch Zufügen von 20 ml frisch eingesetzte  $(\text{OP})_2\text{Cu}^+$ -Stopplösung (28 mM 2,9,-Dimethyl-1,10-Phenanthrolin). Das Gel mit geschnittenen DNA-Fragmente wird vorsichtig 3 mal mit Bidestriliertem  $\text{H}_2\text{O}$  ausgespült, in frischhalte Folien eingepackt. Die Autoradiographie der DNA-Banden erfolgt bei in Kühlraum (6°C) für 30-60 min.

Nach den Signale auf Röntgenfilm werden die entsprechende Banden für Protein-DNA-Komplexen und für freie DNA mit einem sauberen Scapel aus dem Gel ausgeschnitten, die Gelstückchen werden in Gel-Elutionspuffer (0,5 M Ammoniumacetat) gelegt. Die Elution der DNA

aus den Gelblöckchen erfolgt in 37°C Heizblock, geschüttelt für ÜN. Am nächste Morgen werden die Überstände mit DNA mit 100% EtOH gefällt. nach dem Waschen und Trocken in 6-8 µl Formamid-Auftragspuffer aufgenommen. Die Probe werden analysiert in 10% Polyacryamidgel unter denaturierenden Bedingungen.

#### **3.7.4. *In vitro*-Transkription in einem rekonstituierten RNA-Polymerase II-System**

Wenn nicht anders beschrieben, enthält eine *in vitro*-Transkriptionsreaktion die generellen Transkriptionsfaktoren [10 ng rekombinantes TFIIE $\alpha$  und 10 ng rekombinantes TFIIE $\beta$ ; 0,8 µl natives TFIIH; 0,1 µl RNA-Polymerase II aus Kalbsthymus; 1 µl in Baculoviren exprimiertes TFIIF (je 10 ng der Untereinheiten Rap30 und Rap74); 20 ng rekombinantes TFIIB; 40 ng rekombinantes TFIIA ( $\alpha\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten); 4 ng rekombinantes TBP, natives TFIID, oder 1 µl affinitätsgereinigtes Holo-TFIID], gegebenenfalls Transkriptions-aktivatoren und Cofaktoren, acetyliertes BSA und 20 U RNase-Inhibitor in einem Endvolumen von 20 µl.

Alternativ zu diesem hochgereinigten Transkriptionssystem wird in einem grob gereinigten System gearbeitet, das aus der Phosphocellulose 0,3 - 0,5 M KCl-Fraktion (4 µg Protein) und der 0,5 - 0,85 M KCl-Fraktion (2,5 µg Protein) rekonstituiert wird. Darüberhinaus enthält eine Reaktion 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM Hepes-KOH (pH 8,2), 5 mM DTT, 1 mM PMSF sowie 20-100 ng Matrizen-DNA, die zusammen als "DNA-Mix" in den einzelnen Reaktionsgefäßen vorgelegt werden.

Die Matrize pMRG5 (Kretzschmar *et al.*, 1994), welche in den Abbildungen mit HIV bezeichnet wird, enthält stromaufwärts von den bis Position - 8 liegenden HIV-1 Promotor-sequenzen 5x GAL4-Bindungsstellen. Von -7 bis +9 folgt das Adenovirus Major Late Initiatorelement und eine 379 bp lange G-freie Kassette. pML $\Delta$ 53 (in den Abbildungen ML genannt) enthält den Major Late Corepromotor von Position -53 bis +9, gefolgt von einer verkürzten ungefähr 280 bp langen G-freien Kassette.

Die generellen Transkriptionsfaktoren werden kurz vor der Reaktion zu einem "Faktormix" vermischt. Üblicherweise werden als erstes Transkriptionsaktivatoren und Cofaktoren mit dem DNA-Mix gemischt, dann erfolgt die Zugabe des System-Mixes. Nach 30 min Inkubation bei 28°C wird die Reaktion durch Zugabe von 1 µl des Ribonukleotid-Mixes gestartet.

Die Transkriptionsreaktion wird für weitere 60 min bei 28°C inkubiert. Danach stoppt man durch Zugabe von 0,4 ml Stopp-Puffer, extrahiert einmal mit Chloroform, und fällt mit 0,4 ml eiskaltem Isopropanol für mindestens 1 h bei -20°C. Einer 30 minütigen Zentrifugation (4°C, 11.000 rpm) schließt sich das Waschen des Präzipitats mit 0,8 ml eiskaltem 70% Ethanol an. Der getrocknete Niederschlag wird in 10 µl Formamid-Auftragspuffer aufgenommen und durch 15 minütige Inkubation bei 50°C gelöst.

DNA-Mix: 50 - 100 ng Matrizen-DNA

	BC-Puffer mit variablem KCl-Gehalt H <sub>2</sub> O
Cofaktor	variabel

Die Komponenten des Faktor-Mixes werden in der hier angegebenen Reihenfolge zusammenpipettiert:

Ribonukleotid-Mix:	0, 2 µl OmG-Mix 0,8 µl α-[ <sup>32</sup> P]-CTP (3000 Ci/mmol)
OmG-Mix:	10 mM ATP 10 mM UTP 0,5 mM CTP 2 mM 3'-O-Methylguanosin-5'-triphosphat
Stopp-Puffer:	7M Harnstoff 10 mM Tris/HCl, pH 7,8 10 mM EDTA/NaOH, pH 8,0 0,5% (w/v) SDS 100 mM LiCl 0,1 mg/ml tRNA 300 mM NaAc
Formamid-Auftragspuffer:	97% Formamid (deionisiert auf Dowex) 20 mM Tris/HCl pH 7,0 10 mM EDTA/NaOH pH 8,0 0,1% (w/v) BPB; 0,1% (w/v) XC

Komponente	Volumen	Salzgehalt [mM KCl]
RNase Block	0,5 µl	50
BSA (20 mg/ml)	0,5 µl	
TFIIEα (Ni <sup>2+</sup> -NTA-Fraktion)	0,2 µl	400
TFIIEβ (Ni <sup>2+</sup> -NTA-Fraktion)	0,2 µl	400
TFIIH (DE52-Fraktion)	0,8 µl	120
TFIIF (coexprimiertes RAP30, RAP74, Superose 12-Fraktion)	0,2 µl	100
RNA-Polymerase II (DE52-Fraktion)	0,1 µl	100
TFIIB (Heparin/Sepharose-Fraktion)	0,2 µl	400
TFIID (DE52-Fraktion)	0,8 µl	400
bzw. Holo-TFIID (affinitätsgereinigt)	0,5 µl	400
bzw. TBP (Heparin-Sepharose-Fraktion)	0,1 µl	400
TFIIA (corenaturierte αβ und γ-Untereinheiten, Ni <sup>2+</sup> -NTA-Fraktion)	0,5 µl	100

• **Elektrophorese der Proben auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel:** Die Proben werden auf einem 5%igen denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgel (20 cm x 16 cm Glasplatten, 1,5 mm Abstandshalter) aufgetrennt. Zu 50 ml der Gellösung werden 0,4 ml einer 30%igen (w/v) APS-Lösung gegeben. 5 ml dieser Mischung werden mit 20 µl TEMED versetzt und daraus ein Sockel gegossen. Nach Auspolymerisieren des Sockels mischt man die restliche Gellösung mit 20 µl TEMED, gießt die Gellösung zwischen die Glasplatten, setzt den Geltaschenformer ein, und läßt das Gel für 2 h auspolymerisieren. Nach 30 min Vorlauf bei 50 mA werden die Proben aufgetragen und für ca. 90 min bei 50 mA elektrophoretisiert. Das Gel wird abgenommen, 15 min in 10%iger (v/v) Essigsäure fixiert, 5 min mit destilliertem Wasser gespült, auf 3MM Whatmanpapier übertragen und 1 h bei 70°C auf dem Geltrockner getrocknet. Die Autoradiographie erfolgt über Nacht mit einer Verstärkerfolie.

Gellösung:                   5% (w/v) (19:1) Acrylamid/Bisacrylamid  
                                  1 x TBE  
                                  8 M Harnstoff

### **3.8. DNA-Arbeitstechniken in Hefe *Saccharomyces cerevisiae***

#### **3.8.1. Transformation von Plasmid-DNA in die Hefen**

##### **3.8.1.1. Transformation mit Lithiumacetat**

Nach einer von Ito *et al.*, (1983) beschriebenen Methode lassen sich Hefenzellen durch die Behandlung mit Lithium-Ionen besonders gut transformationskompetent machen. Es wurde ein modifiziertes Protokoll von Schiestl and Gietz (1989) angewendet.

Die Hefen werden in ihrem Selektionsmedium angeimpft und ÜN bei 30°C inkubiert. Diese Vorkultur wird am nächsten Tag in 50 ml YPD-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 - 0,2 verdünnt und für 4-5 h bei 30°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 vermehrt. Die Zellen werden abzentrifugiert (2000 rpm, 5 min, RT) und in 10 ml H<sub>2</sub>O gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wird das Pellet mit 5 ml Lithiumacetat-Puffer (LiOAc) gewaschen und nochmals zentrifugiert. Nun wird das Pellet in 1 Vol. LiOAc-Puffer resuspendiert, für 30 min bei 30°C inkubiert, wobei die Zellsuspension mehrmals durchgemischt wird. In der Zwischenzeit wird die zu transformierte Plasmid-DNA (2-10 µg) in einem Eppendorfgefäß vorgelegt. Um eine höhere Transformationseffizienz zu erreichen, kann bis zu 50 µg Carrier-DNA (gescherte und denaturierte Salmon Sperm DNA) zugegeben werden. Pro Transformationsansatz wird 100 µl Hefesuspension mit der DNA gemischt und dann 700 µl PEG-Lösung vorsichtig mit der Pipette untergemischt. Der homogene Transformationsansatz wird 30 min bei 30°C unter leicht Schütteln inkubiert. Nach einem 15-minütigem Hitzeschock bei 42°C werden die Zellen abzentrifugiert, das Zellpellet in 1 ml Sorbitol vorsichtig resuspendiert. Auf

Selektionsplatten werden Aliquots von 100-500 µl ausplattiert und die Platten bei 30°C für 2 - 5 Tage inkubiert.

LiOAc-Puffer:           100 mM LiOAc, pH 8,0  
                          10 mM Tris-HCl, pH 7,5  
                          1 mM EDTA, pH 8,0

PEG-Lösung:           100 mM LiOAc, pH 8,0  
                          10 mM Tris-HCl, pH 7,5  
                          1 mM EDTA, pH 8,0  
                          40% PEG 4000

Der LiOAc-Puffer sowie die PEG-Lösung wurden jeweils frisch aus den 10x konzentrierten Stammlösungen hergestellt.

### 3.8.1.2. Hoch-effiziente Transformationsmethode

Es wurde in 1996 von *Gietz und Schiestl* auf ihrer Homepage im Internet ([www.umanitoba.ca/faculties/medicine/units/human\\_genetics/gietz/method.html](http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine/units/human_genetics/gietz/method.html)) eine modifizierte Methode der Lithiumacetat-Transformation (*Gietz et al.*, 1995) präsentiert, die eine sehr hohe Effizienz ermöglicht.

Die Hefen werden ÜN im Selektionsmedium bei 30°C angeimpft und am nächsten Morgen in 50 ml YPD auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 eingestellt. Nach ca. 4 h bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 werden die Hefen geerntet, einmal in H<sub>2</sub>O gewaschen und einmal mit 1 ml 100 mM LiOAc, pH 8,0. Die Zellen werden in 400 µl 100 mM LiOAc resuspendiert damit ein Endvolumen bei 500 µl (entspricht eine Zelldichte von 2x 10<sup>9</sup> Zellen/ml) liegt. Die Hefesuspension wird zu 50 - 100 µl Aliquotiert und erneut abzentrifugiert. Auf das Pellet werden in folgender Reihenfolge 240 µl PEG, 36 µl 1,0 M LiOAc, und 25 µl Carrier-DNA (2 mg/ml, denaturiert) zupipettiert, und anschließend mit H<sub>2</sub>O auf einem Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt. Das Gemisch wird für mehr als 1 min auf dem Vortexer gemischt. Dann werden die Ansätze für 30 min bei 30°C inkubiert, wobei sie alle 10 min einmal durch Schwenken gemischt werden. Diese folgt ein Hitzeschock bei 42°C für 20-25 min. Anschließend werden die Hefen pelletiert, in 1 ml 1 M Sorbitol aufgenommen und mit Aliquots von 50 - 200 µl auf den Selektionsplatten ausplattiert. Nach 2 - 3 Tagen Inkubation bei 30°C können Einzelkolonien von den Platten umgestrichen und verwendet werden.

### 3.8.1.3. Carrier-DNA

Zur Präparierung der Carrier-DNA wurden 20 mg Salmon-Sperm-DNA in 10 ml 1x TE unter starkem Rühren im Kühlraum über Nacht gelöst. Die gelöste und gescherte DNA wird à 500 µl aliquotiert und bei - 20°C eingefroren. Vor jeder Transformation wird ein Aliquot auf Eis aufgetaucht, für 5 min aufgekocht und dann sofort auf Eis abgeschreckt.

### 3.8.2. DNA-Isolierung aus Hefen

#### 3.8.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen (Hoffman and Winston, 1987)

Aus 2 ml Übernachtskulturen von Hefen konnte genügende Plasmide-DNA isoliert werden, um sie dann in Bakterien zu retransformieren.

Die Hefezellen in stationärer Wachstumsphase werden abzentrifugiert bei 4000 rpm, RT für 5 min. Nach dem Waschen mit H<sub>2</sub>O wird der Überstand verworfen und die Zellen werden in der restlichen Flüssigkeit durch Vortexen resuspendiert. Dazu werden 0,2 ml Hefe-Lysispuffer und 200 µl Glassperlen zugegeben. Das Gemisch wird für 2 min lang stark gevortext, und es folgt eine Zentrifugation bei 4000 rpm, RT für 5 min. Der Überstand mit Plasmid-DNA wird in neues Eppendorfgefäß überführt.

Für weitere Elektroporation in *E. coli* KC8 Stamm (zur spezifische Selektion von Trp-Plasmid) oder SURE, wird der Überstand vorher 1:2 mit H<sub>2</sub>O verdünnt wegen der zu hoher Salzgehalt, die eine Elektroporation stören kann. 2 µl der verdünnten Überstand wird in 80-100 µl elektrokompetente *E. coli*-Zellen durch Elektroporation transformiert, auf Minimal-Agarplatten für KC8 oder auf LB-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Nach eine Inkubation bei 37°C für ÜN werden Einzel-Kolonien ausgebildet. 2 ml LB-Medium mit Ampicillin wird durch einer Einzel-Kolonie angeimpft, und eine Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wird angeschlossen (beschrieben in Kapitel 3.4.5.)

Hefe-Lysispuffer:	2% Triton X-100
	1% SDS
	100 mM NaCl
	10 mM Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM EDTA, pH 8,0
	0,2 ml Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25:24:1)

Minimal-Agarplatte für KC8:	15 g Difco Minimalagar
	4,5 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 3H <sub>2</sub> O
	10,5 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,0 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	0,5 g Na <sub>3</sub> Citrat x 2 H <sub>2</sub> O wurden in 970 ml H <sub>2</sub> O autoklaviert und auf 55°C abgekühlt
	24 mg Uracil
	24 mg Histidin
	24 mg Leucin in 15 ml H <sub>2</sub> O (gelöst durch Wärmen und steril filtriert)

1,0 ml 1 M  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$   
5 ml 40% Glukose-Lösung (extra autoklaviert)  
1,0 ml 1% Thiamin (Vitamin B1)-Stammlösung (frisch eingesetzt)  
100 µg/ml Ampicillin

### 3.8.2.2. Isolierung genomischer DNA aus Hefen

Für eine schnelle Isolierung genomischer DNA aus Hefen wurde ein von Amersham (Life Science) verwendet.

5 ml einer ÜN-Kultur von Hefen werden abzentrifugiert, einmal mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und in 540 µl Lösung A resuspendiert. Nach Zugabe von 60 µl Lösung B wird der Ansatz für 30 sec gevortext und dann 10 min bei 70°C inkubiert. 300 µl Lösung C wird zugegeben, gemischt und der Ansatz wird für 5 min auf Eis abgekühlt. Nach 5 min Zentrifugation mit maximaler Geschwindigkeit (14 000 rpm) bei RT wird die DNA aus dem klaren Überstand mit 600 µl Isopropanol gefällt und durch analoge Zentrifugation pelletiert. Das pellet wird mit 70 % eiskaltem EtOH gewaschen und anschließend in 50 µl Lösung D resuspendiert.

Lösung A, B, C und D sind dem Kit mitgeliefert.

## 3.9. Genetische Methoden zur Charakterisierung von Hefezellen

### 3.9.1. Kreuzung haploider Hefezellen

Haploide Hefen unterscheiden sich in ihrem Paarungstyp, der in *Mata* oder *Mat $\alpha$*  bezeichnet wird. Nur Zellen mit entgegengesetzten Paarungstypen können zu einer Zygote fusionieren, aus der eine diploide Hefezelle hervorgeht. Wie Haploiden können sich die diploiden Zellen mitotisch teilen und vermehren. Unter stickstoffmangelnden Bedingungen können sich Diploiden auch meiotisch teilen und bringen dann vier haploide Ascussporen hervor, die wiederum zu vegetativen Haploiden auskeimen können. Die Diploidisierung leitet damit die sexuelle Fortpflanzung ein und ist bei einer gezielten Kreuzung zweier Haploiden das Mittel zur Generierung einer Nachkommen mit neuer Kombination der Gene aus beiden Elternstämmen.

Zur Kreuzung werden Zellsuspension aus logarithmischen Kulturen auf Selektionsmedium, auf dem die beiden haploide Ausgangsstämme nicht wachsen können, aufeinander getropft. Dies setzt voraus, daß sich die beiden Stämme in jeweils einem Selektionsmarker unterscheiden, der durch die Diploidbildung vom jeweiligen Allel des Partners komplementiert wird. Zur Kontrolle werden die

haploide Stämme ebenfalls auf das Selektionsmedium ausgestrichen. Diploidisierung wird durch das Wachstum kleiner Kolonie im Bereich der eingetrockneten Zellsuspensionstropfen angezeigt.

Bei fehlender Positivselektion auf das Diploidisierungsereignis lassen sich die Kreuzung auch auf YPD-Platte durchzuführen. Dies folgt eine Überstempel der ausgewachsenen Ausstriche auf Selektionsmedium um die wirklichen Diploden zu selektionieren.

### **3.9.2. Sporulation diploider Hefezellen**

Die Sporulation diploider Hefestämme wurde in Flüssig- oder Festmedium durchgeführt. Eine diploide Hefekultur wurde ÜN in flüssigem Medium bei 30°C angezogen. Nach dem Wachsen mit H<sub>2</sub>O werden die Zellen in 200 µl Minimal-Sporulationsmedium aufgenommen und entweder direkt auf eine Minimal-Sporulationsplatte getropft oder in 20 ml flüssigem Medium bei 30°C für 5 Tage geschüttelt. Dann konnte die Bildung von Asci unter dem Mikroskop überprüft werden.

Bei Hefestämme, die schwer sporulierten wurden die Hefen zunächst für 1 - 2 Tage in Präsporulationsmedium inkubiert und dann entweder auf Sporulationsmedium oder auf Minimal-Sporulationsplatten transferiert.

Minimal-Sporulationsmedium:	1% KOAC, pH 7,6
Präsporulationsmedium:	0,8% Hefeextrakt 0,3% Bacto-Pepton 10% Dextrose
Sporulationsmedium:	1% KOAC, pH 7,6 0,1% Hefeextrakt 0,05% Glukose oder Galaktose

### **3.9.3. Sporenfreisetzung und Tetraden-Analyse**

Nach der Sporulation von diploiden Hefenzellen liegen die Sporen nicht frei vor, sondern als Viererverbände (Tetraden), die von einer Ascuswand umgeschlossen sind. Die Ascuswand wird zur Freisetzung der Sporen enzymatisch mit Glusulase oder Zymolyase behandelt. Zur gezielten Analyse der Sporen werden Tetraden mit Hilfe des Mikroskops auf YPD-Platten gelegt, diese wiederum auf unterschiedlichen Selektionsplatten überstempelt werden können.

Für die Tetraden-Analyse werden die Sporen von einer Platte abgekratzt, in 10 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und 5 min mit 5 - 10 µl Glusulase bei RT inkubiert. Nach der enzymatischen Reaktion werden die Sporen zweimal gewaschen mit H<sub>2</sub>O und auf einer YPD-Platte an einer Seite

ausgestrichen. Am Mikromanipulator wird eine einzelne Tetrade mit der Nadel aufgenommen und auf eine bestimmte Position (Registrieren mit Hilfe der Monitor) der Platte hingelegt. Dort wird der Ascusverband durch Klopfen der Nadel aufgebrochen und jede der vier Sporen auf eine andere spezifische Stelle der Platte gelegt. Alle vier Sporen einer Tetrad werden gewöhnlich auf einer Reihe untergebracht, um mit den anderen Tetraden zu unterscheiden. Die YPD-Platten werden bei 30°C inkubiert. Nach einem oder mehreren Tagen konnte das Keimen der Sporen und die Ausbildung von Zellverbänden beobachtet werden.

Die unterschiedlichen Genotypen (Phänotypen) der einzelnen Spore einer Tetrade können durch replikative Überstempel der ausgewachsenen Hefeklone auf verschiedenen Selektionsplatten ermittelt werden.

### 3.9.4. Paarungstypsbestimmung

Jeder haploide Hefeklon, der durch Kreuzung erzeugt wurde, muß neben seinen phänotypisch erfaßbaren genetischen Markern auch hinsichtlich seines Paarungstyps charakterisiert werden.

Für diese Analyse stehen Testerstamm zur Verfügung, die Detektion des Paarungstyps auf Platten ohne Zusatz jeglicher Aminosäuren oder Nukleosiden ermöglichen. Üblicherweise werden die Stämme KL14-4 (*Mata*) und IL993-5C (*Mat $\alpha$* ) als Testerstämme verwendet.

Zur Paarungstypsbestimmung wurden logarithmisch wachsende Kulturen der Testerstämme auf OM-Medium ausplattiert. Frische Einzelkolonie-Ausstriche der zu definierten Stämme wurden mittels Replikaplattierung auf beide Testerstämme übergestempelt und die Platten für 3 - 5 Tagen bei 30°C inkubiert. Die Diploidbildung sollte nur mit einem der beiden Testerstämme erfolgt sein, d.h. der zu definierende Stamm hat dann den entgegengesetzten Paarungstyp.

OM-medium:    0,67 % Yeast Nitrogen base w/o Aminoacids  
                  2 % Glukose (extra autoklaviert)  
                  2 % Bacto-Agar

### 3.9.5. Suppressor-"Screen" zum Suchen von funktionell relevanten Faktoren in Hefe

Die funktionelle relevanter Genen können durch ein Suppressor-"Screen" *in vivo* z.B. in Hefe identifiziert werden. Vorausgesetzt ist eine oder mehrere ausgeprägte Phänotypen, die durch Mutationen in dem Zielgen hervorgerufen wurden. Typische für solche Phänotypen sind Temperatur-Sensitivität, Wachstumsdefekt und Nährstoff-Auxotrophie.

Aus den langsam wachsenden Hefe-Klone mit NC2 $\beta$ -Defizienz wurde eine Suppressor-Screen durchgeführt. 8 x 10 ml YPD-Flüssigmedium wird mit je einer der langsam wachsenden Kolonien

angeimpft, geschüttelt bei 30°C für 2-3 Tagen bis zur exponentiellen oder stationellen Wachstumsphase. Von diesen Flüssigkulturen, werden jeweils  $\approx 10^7$  Zellen auf einer YPD-Platte ausplattiert und inkubiert bei 30°C. Nach 2 - 3 Tagen sind die Kolonien von Ausgangsstämme noch nicht sichtbar. Zu sehen sind die Kolonien von spontanen Suppressoren, die das normale Wachstumsrate der Hefen wiederherstellen. Jedes Suppressor-Klon könnte eine andere Mutation tragen. Insgesamt wurden 53 Suppressor-Klone aus diesem "Screen" isoliert.

### **3.9.6. Temperatursensitivitätsbestimmung**

Die Wildtyp-Hefen zeigen ein breites Temperatur-Spektrum fürs vegetativen Wachstum (14-37°C). Temperatursensitivität ist einer der typischen Phänotypen, die durch Mutationen in Hefezellen verursacht werden. Um die Phänotyp verschiedener Hefezellen gegenüber Temperatur zu bestimmen, wurden sie parallel zum Vergleichstamm (Wildtyp-Hefe) auf drei YPD-Platten ausgestrichen, und je eine Platte wird bei einer anderen Temperatur inkubiert: 16°C, 30°C oder 37°C. Nach 2-7 Tagen konnte das Wachstumsverhalten der Hefen gegenüber Temperatur festgestellt werden.

### **3.9.7. Tropftitertest**

Eine Einzelkolonie von einer frisch berühten Kulturplatte (nach ca. 2 Tagen) wird mit einer Impföse abgekratzt und in 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert. Um die Zellklumpen-Bildung zu vermeiden, wird die Hefesuspension durch kurzes Vortexen gemischt. Von dieser Suspension wird eine Verdünnungsreihe bis zu  $10^{-5}$  angelegt; dazu werden je 10  $\mu\text{l}$  der Suspension entnommen und zu 90  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  vermischt. Jede Verdünnungsstufe wird gut gemischt bevor sie für die nächste Verdünnungsstufe Zellen entnommen wird. Je 5  $\mu\text{l}$  der Verdünnungen werden auf markierte Stellen einer Testplatte aufgetropft. Nachdem die Zellsuspensionen getrocknet sind, werden die Platten bei 30°C für 2 - 5 Tagen inkubiert.

Beim Auftragen verschiedener Hefestämme zum Vergleich, werden die erste Zellsuspension aus Einzelkolonie durch  $\text{OD}_{600}$ -Messungen genau ausgeglichen, um eine identische Menge der Zellen zu gewährleisten.

### **3.10. Proteinextraktion aus *Saccharomyces cerevisiae***

Zur Proteinextraktion aus Hefen, können die Zellen enzymatisch mit Zymolyase oder mechanisch mit Glasperlen aufgeschlossen werden.

### 3.10.1. Aufschluß mit Zymolyase

100 ml einer logarithmisch wachsenden Kultur wurde bei einem OD<sub>600</sub>-Wert von 0,8 - 1,0 abzentrifugiert, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und in 10 x Vol. Aufschlußpuffer I aufgenommen. Der hohe Gehalt an DTT diente dazu die Zymolyase zu aktivieren. Diese Zellsuspension wird bei RT für 30 min inkubiert. Die Zellen werden dann abzentrifugiert und erneut in 2 x Vol. Aufschlußpuffer mit 1 mM DTT aufgenommen. Nach Zusatz von 50 µl Zymolyase-Lösung (10 mg/ml) wird die Zellsuspension für 30 - 60 min. bei 37°C inkubiert. Eine Bildung von Sphäroblasten werden unter dem Mikroskop kontrolliert. Bei leichter Viskosität, spricht für ausreichende Aufschlußeffizienz wird zur Lyse der Zellen und Zellkerne 1/5 Vol. 2,5 M NaCl zugesetzt. Die hohe viskose Lösung wird bei 20.000 rpm, 4°C für 20 min. abzentrifugiert und der Überstand als Proteinrohextrakt bei - 80°C eingefroren.

Aufschlußpuffer I:        100 mM NaCl  
                              25 mM Hepes-NaOH, pH 7,5  
                              5 mM EDTA, pH 8,0  
                              10 % Glycerin  
                              30 mM DTT

### 3.10.2. Mechanischer Aufschluß mit der Schwingmühle

Um die Protein-Expression im Western blot nachzuweisen, wurden aus einer ebenfalls logarithmisch wachsenden Hefekultur durch mechanischen Aufschluß mit Glasperlen mit Durchmesser von 0,5 - 0,7 mm Rohextrakt hergestellt.

Die Kultur wird abzentrifugiert, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und in 1 Vol eiskaltem Aufschlußpuffer II aufgenommen. In einem 2 ml Eppendorfgefäß werden 1,5 ml kalte Glasperlen vorgelegt, 200 µl Zellsuspension und 200 µl Aufschlußpuffer II zugegeben und gemischt. Das Gefäß wird in die Schwingmühle eingespannt und 20 min. bei voller Leistung geschüttelt. Danach wird das Eppendorfgefäß im Boden mit einer Kanüle angestochen, in ein 15 ml Rundboden-Röhrchen eingesetzt und durch Zentrifugation (1.500 rpm, 4°C, 1 min) die flüssigkeit eluiert. Die Glasperlen werden nochmal mit 200 µl Aufschlußpuffer II gewaschen und abzentrifugiert. Die Eluate werden vereinigt und bei 20.000 rpm, 4°C für 20 min abzentrifugiert. der klare Überstand wird als Proteinrohextrakt in neues Gefäß überführt und bei - 80°C weggefroren.

Aufschlußpuffer II:        500 mM NaCl

50 mM HEPES-NaOH, pH 7,9  
1 mM EDTA, pH 8,0  
10% Glycerin  
5 mM DTT

### **3.11. Computeranalysen**

Für Computer- und Homologie-Analysen wurde der BLAST-Algorithmus des NCBI verwendet (Altschul *et al.*, 1990). Zur Herstellung der Kristallstrukturen von Histonen und  $\gamma$ TFIIA-TBP-DNA-Komplex wurde der Programm Rasmol 2.7.1 und Swiss-Pro eingesetzt.

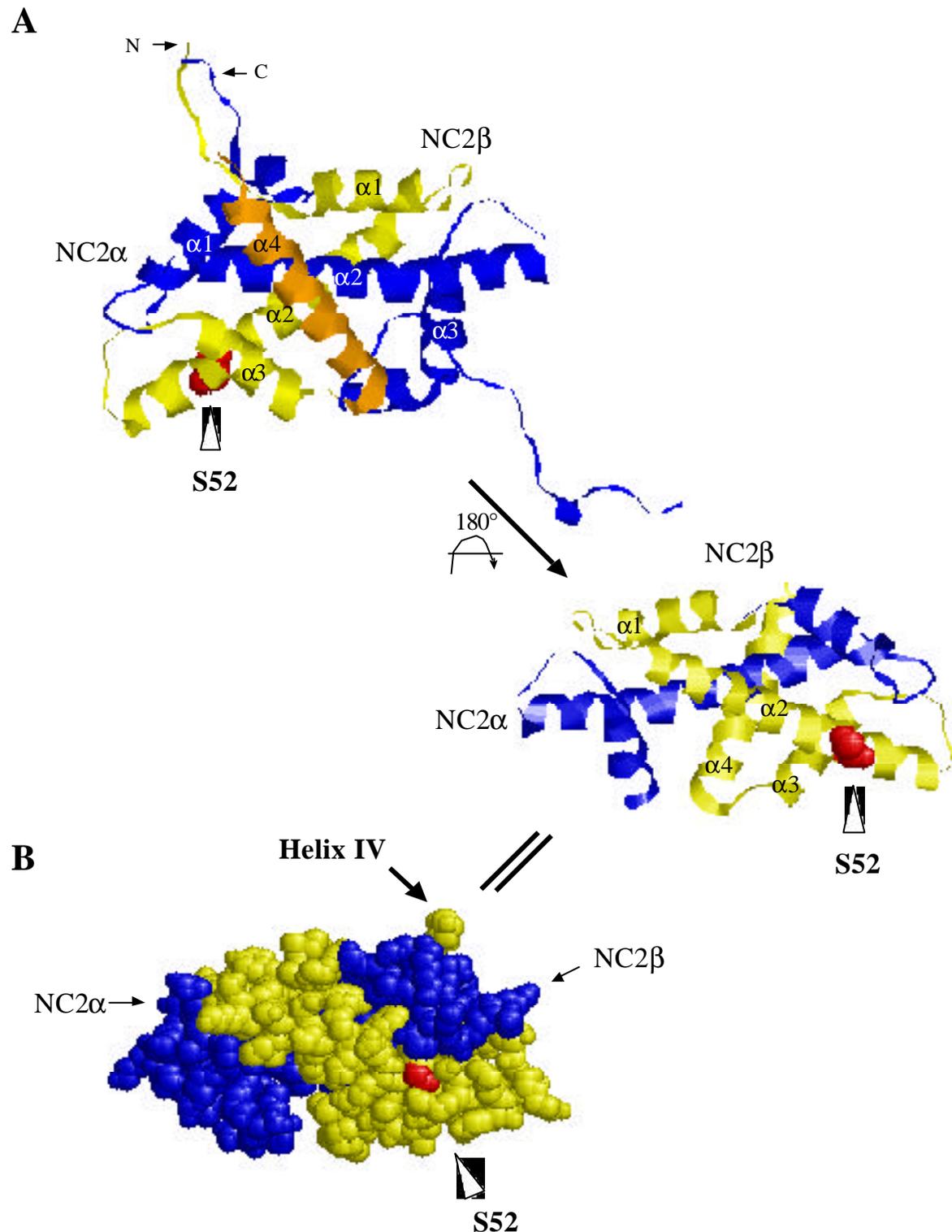
## 4. Ergebnisse

---

### 4.1. Vergleich von NC2 aus Mensch und Hefe

Auf der primären Struktur-Ebene sind NC2 aus Mensch und Hefe hochkonserviert. Die Homologie vom höchsten Grad befindet sich in der Histone-Fold-Domäne beider NC2-Untereinheiten. Sie beträgt mehr als 40% Identität und bis zu 67% Ähnlichkeit. Wie die Histone-Fold-Domäne der Histonproteine besteht der Histone-Fold des NC2 aus einer langen zentralen  $\alpha$ -Helix, die von zwei kurzen  $\alpha$ -Helices flankiert und über  $\beta$ -Schleifen verbunden wird (Goppelt *et al.*, 1996). Außerhalb der Histone-Fold-Domäne ist nur ein kurzer Bereich C-terminal des Histone-Fold-Motivs in NC2 $\beta$  konserviert. Er liegt zwischen der Aminosäure-Positionen 115-126, die fast ausschließlich aus Glutamin- und Glutaminsäure-Resten (QE) bestehen (Abb. 4A). Humane NC2 besitzt zusätzlich eine Prolin-reiche Region in NC2 $\alpha$  und eine Glutamin/Alanin-reiche Region in NC2 $\beta$ , die Hefe-NC2 fehlen (Abb. 4B).

Es wurde angenommen, daß NC2 durch die Histone-Folds dimerisiert und eine ähnliche Struktur wie die Histonen in Nukleosomen ausbildet (Goppelt *et al.*, 1996). Es wurde auch gezeigt, daß die Histone-Fold-Domänen von NC2 für die Repression der Transkription und für Interaktionen mit TBP und DNA erforderlich sind (Inostroza *et al.*, 1992; Yeung *et al.*, 1994, 1997; Goppelt *et al.*, 1996; S.J.Kim *et al.*, 1997). Alle diesen Funktionen von NC2 werden außerdem durch die carboxylterminale Region von NC2 $\beta$  verstärkt (Goppelt *et al.*, 1996). Eine weitere essentielle Domäne für die Transkriptionsrepression ist die C-terminale Region von Aminosäuren 84-113 in hNC2 $\beta$ . Diese Region beinhaltet den Bereich von Aminosäuren 81-99, die die vierte Helix (Helix IV) des H2B-Moleküls außerhalb des "Histone-Folds" entspricht (Abb. 4).



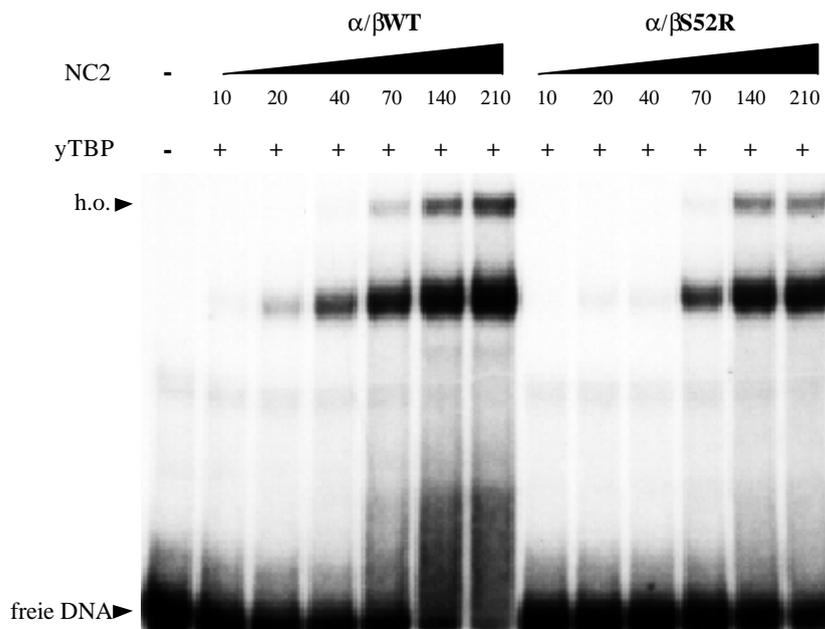
**Abb. 27:** Mögliche Lage des Serin52 von NC2 $\beta$  in Anlehnung an die H2A-H2B-Struktur. **(A)** Die Histone-Fold-Domänen von NC2 $\alpha$  (blau) und NC2 $\beta$  (gelb) interagieren sich über Kreuzung der zentralen  $\alpha$ -Helix ( $\alpha$ 2) welche jeweils von zwei kurzen Helices ( $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 3) flankiert ist. Das C-terminale Ende von NC2 $\beta$  und das N-terminale Ende von NC2 $\alpha$  sind angezeichnet. Serin52 (S52) (rot) liegt innerhalb der zentralen Helix ( $\alpha$ 2) von NC2 $\beta$  und kurz vor dem Übergang zu Helix III ( $\alpha$ 3). Die Seitenkette von S52 liegt an der Oberfläche des Proteins und befindet sich auf der Gegenseite der vierten Helix ( $\alpha$ 4) von NC2 $\beta$ . **(B)** Die große Dimerisierungsfläche zwischen NC2 $\alpha$  und NC2 $\beta$  ist in der "space fill"-Version der Struktur deutlich zu erkennen. Die Position des S52 ist in rot dargestellt.

#### 4.8.4.2. Analyse der Mutante $\beta$ S52R in der Komplexbildung auf DNA

Mutante S52R zeigte signifikante Defekte in der Komplexbildung mit TBP auf DNA (diskutiert in Kapitel 4.8.3.2). Defekte in der Komplexbildung mit TBP-DNA hatte auch die Suppressormutante V251F in Toa1 (mt-yTFIIA) aufgewiesen (Kapitel 4.7.2). Aber im Fall des mt-yTFIIA, bindete das mt-yTFIIA nicht an Hefe-TBP ( $\gamma$ TBP) und die reduzierte Konzentration an ternärem Komplex mit hTBP und DNA ließ sich nicht durch Konzentrationserhöhung der Reaktionspartner TFIIA und TBP kompensieren (Abb. 17, 21).

Um weitere Vergleiche anzustellen wurden wt- und mt-NC2 (S52R) zusammen mit rekombinantem  $\gamma$ TBP im Gelshift-Experiment untersucht. Bei konstanter Menge an  $\gamma$ TBP und DNA wurden wt- und mt-NC2 über große Konzentrationsbereiche titriert (10-210 ng). Im Unterschied zu mt-yTFIIA, bindet  $\beta$ S52R an  $\gamma$ TBP. Unterschiede zwischen wt- und  $\beta$ S52R-Mutante sind konzentrationsabhängig (Abb. 28). Eine signifikante Schwächung der ternären Komplexbildung mit mt-NC2 wurde ausschließlich bei niedrigen Proteinkonzentrationen beobachtet (Abb. 28, vergleiche Spur 8-11 mit Spur 2-5).

Dieses Resultat ließ den Schluß zu, daß die NC2-Mutante  $\beta$ S52R und die Suppressormutante V251F in Toa1 unterschiedliche Defekte in der ternären Komplexbildung mit TBP und DNA aufweisen. Der Defekt in NC2 $\beta$ S52R basiert hauptsächlich auf eine Schwächung in der TBP-Bindung eines einfachen Gleichgewichts aus NC2, TBP und DNA, während der Defekt in mt-yTFIIA auf einen komplizierteren Prozeß zurückzuführen ist.



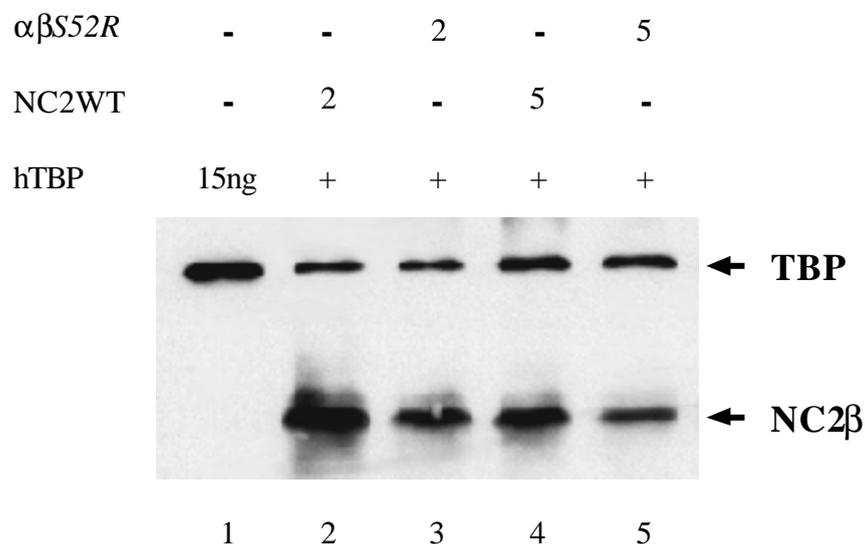
**Abb. 28:** Effekte der NC2 $\beta$ -Mutation S52R auf die Komplexbildung von NC2 mit TBP auf DNA. Im Gelshift-Experiment wurde rekombinantes gereinigtes  $\gamma$ TBP, wt-NC2 ( $\alpha/\beta$ WT) und mt-NC2 ( $\alpha/\beta$ S52R) verwendet. In Anwesenheit einer konstanten Menge an  $\gamma$ TBP (5 ng) wurden wt- und mt-NC2 von 10, 20, 40, 70, 140 bis zu 210 ng titriert. Die Positionen der ternären Komplexe (TBP-NC2), der freien DNA und der Komplexe höherer Ordnung (h.o.), die durch Bindung eines zweiten TBP-NC2 an die DNA zustande kamen, sind gekennzeichnet.

#### 4.8.4.3. Analyse der NC2 $\beta$ -Mutante S52R in Immunopräzipitation

Nachdem die NC2 $\beta$ -Mutante S52R verminderte Komplexbildung mit TBP und DNA zeigte, stellte sich die Frage, ob die direkte Interaktion zwischen TBP und NC2 betroffen war.

Um diese Frage zu beantworten, wurden Immunopräzipitationen mit monoklonalen Antikörper (hergestellt mit Fusionsprotein GST-NC2 $\alpha$  aus Ratte in der Arbeitsgruppe E. Krämmer, GSF) gegen das hNC2 $\alpha$  durchgeführt (Details siehe Material und Methoden). Es wurden gereinigtes, rekombinantes hTBP und Wildtyp-NC2 (wt) sowie die Mutante  $\beta$ S52R (mt) unter Bedingungen verglichen, in denen unterschiedliche Bindungsaktivitäten von wt- und mt-NC2 in Gelshift-Experimenten beobachtet worden waren. Die mit SDS-Puffer eluierte Proteine wurden durch SDS-PAGE analysiert und das hTBP und NC2 $\beta$  durch Antikörpern im Western-Blot nachgewiesen.

Die NC2-Mutante S52R konnte genauso wie das wt-NC2 effizient an TBP binden, sowohl bei niedriger als auch bei hoher NC2-Konzentration (Abb. 29, vergleiche Spur 2 mit Spur 3 bzw. Spur 4 mit Spur 5). Gleichzeitig wurde gezeigt, daß die NC2 $\beta$ -Mutante S52R in der Dimerisierung mit hNC2 $\alpha$  kompetent war (unterer Band, Spur 3 versus Spur 2 und Spur 5 versus Spur 4).

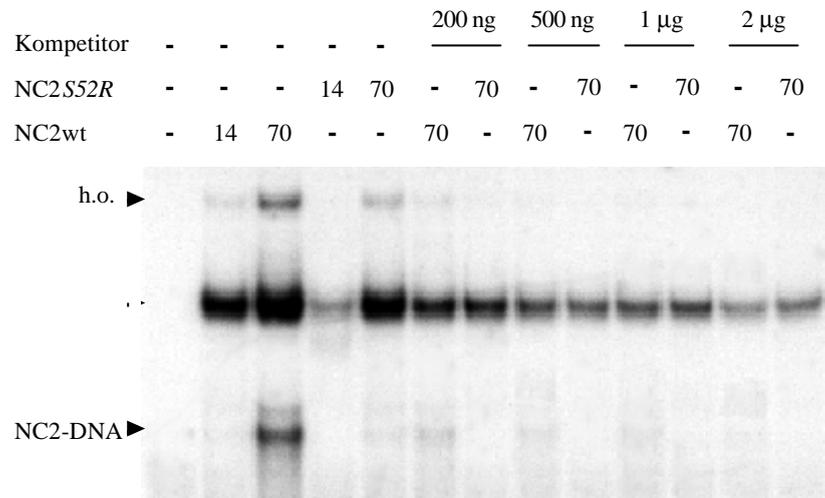


**Abb. 29:** Analyse der NC2 $\beta$  S52R-Mutante in der Immunopräzipitation. An der mit Antikörper gegen hNC2 $\alpha$  gekoppelten Protein G-Sepharose wurden rekombinantes hTBP (480 ng) und wt- ( $\alpha/\beta$ WT) bzw. mt-NC2 ( $\alpha/\beta$ S52R) (700 ng und 2,8  $\mu$ g) im 1 ml-Puffer geladen. Die gebundenen Proteine wurden mit SDS-Auftragspuffer eluiert. Nach Auftrennung in SDS-PAGE wurden hTBP und hNC2 $\beta$  im Western-Blot nachgewiesen. Die NC2  $\beta$ S52R-Mutante zeigt vergleichbare Aktivität in der Interaktion mit TBP und mit der hNC2 $\alpha$ -Untereinheit (Spur 3 versus Spur 2 und Spur 5 versus Spur 4). Spur 1 enthält 15 ng rekombinantes hTBP.

#### 4.8.4.4. Einfluß der DNA-Bindung auf die Komplexbildung von NC2-Mutante $\beta$ S52R mit TBP

NC2-TBP-DNA-Komplexe sind relativ resistent gegenüber großen Mengen an unspezifischer Kompetitor-DNA pdGdC, die eine GC-reiche Sequenz hat. Dagegen ist die direkte Interaktion zwischen NC2 und DNA durch pdGdC kompetitierbar (Goppelt *et al.*, 1996). Die mangelnde Aktivität von Mutante  $\beta$ S52R in der Bindung an TBP und DNA konnte teilweise aufgehoben werden, in dem man die NC2-Konzentration erhöhte (Abb. 28). Diese Experimenten wurden ohne Kompetitor-DNA durchgeführt. Ein erstes Anzeichen für einen möglichen Einfluß von DNA auf die Komplexbildung lieferte ein Gelshift-Experiment mit 500 ng pdGdC (Abb. 26A).

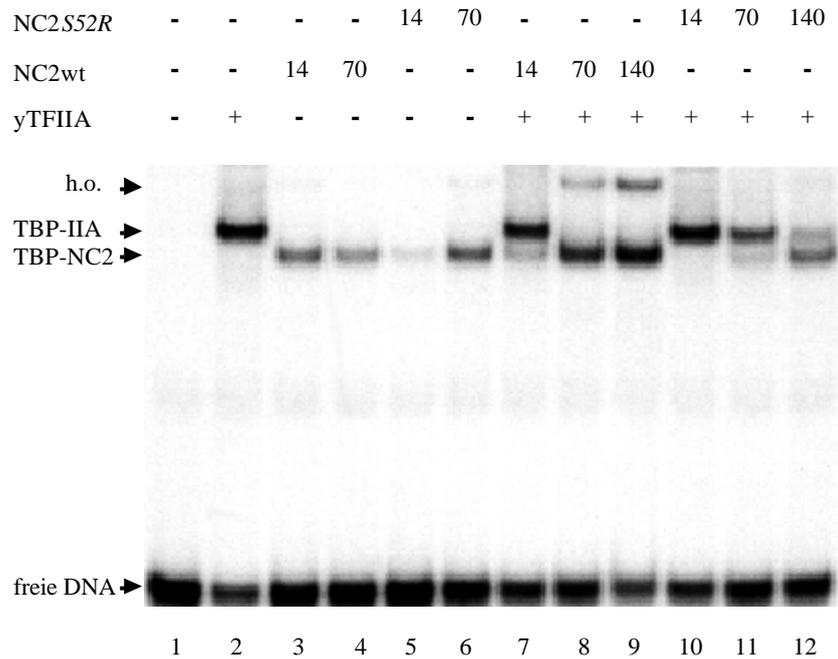
Um den Einfluß der DNA-Bindung von  $\beta$ S52R-Mutante genauer zu untersuchen, wurde der Kompetitor pdGdC im Gelshift-Experiment titriert. NC2-Konzentrationen wurden dafür innerhalb der Bereiche gewählt, in denen deutliche Unterschiede zwischen wt- und mt-NC2 in der Komplexbildung nachgewiesen worden waren (Abb. 28). Unterschiede zwischen S52R und wt-NC2 nahmen mit steigender Konzentration an pdGdC ab (Abb. 30, Spur 4, 5 versus Spur 2, 3). Bei 1  $\mu$ g Kompetitor-DNA (350-fachem Überschuß zu markierten Promotor-Fragmenten) waren keine Unterschied zu sehen (Abb. 30, Spur 10, 11). Überraschenderweise bindete mt-NC2 ( $\beta$ S52R) eher besser an TBP-DNA als wt-NC2 bei 700-fachem Überschuß von pdGdC (2  $\mu$ g). Ein möglicher Grund dafür ist die unterschiedliche Affinität von wt- und mt-NC2 zu DNA. Wildtyp-NC2, nicht aber die mt-NC2 (S52R) ist kompetent in der DNA-Bindung (Abb. 26B). In Anwesenheit großen Mengen an Kompetitor-DNA bindet sie das NC2, und diese ist weniger mit dem mt- als dem wt-NC2.



**Abb. 30:** Effekte der unspezifischen Kompetitor-DNA auf die Komplexbildung von NC2-Mutante S52R mit TBP-DNA. Die Reaktionen enthielten ein 60 bp lang markiertes HIV-Promotor-Oligonukleotid (75 fmol) und gereinigtes, rekombinantes hTBP (10 ng). Die Konzentrationen von NC2 (wenn anwesend) sind in ng angegeben. Kompetitor-DNA pdGdC wurde von 200 ng bis 2 µg titriert, was einem 70- bis 700-fachen Überschuß zum Promotor-Fragment entspricht. Die Positionen der monomeren Komplexe auf DNA (TBP-NC2) und Komplexe höherer Ordnung (h.o.) sowie Komplexe aus NC2 und DNA (NC2-DNA) sind markiert.

#### 4.8.4.5. Einfluß der bS52R-Mutation auf die Konkurrenz zwischen NC2 und TFIIA auf Promotor

NC2 reprimiert die RNA-Polymerase II Transkription durch Verhinderung der Assoziation von TFIIA und TFIIIB zur basalen Transkriptionsmaschinerie (Goppelt *et al.*, 1996; Mermelstein *et al.*, 1996). Die Mutante S52R wurde auf Konkurrenz mit TFIIA überprüft. Rekombinantes  $\gamma$ TFIIA und eine vergleichbare Menge an wt- und mt-NC2 wurden eingesetzt. Die Reaktionen enthielten limitierende Mengen an TBP und DNA um möglichen Wechsel von TBP zwischen den Bindungspartner, TFIIA und NC2 zu beobachten. Wildtyp-NC2 kompetitierte effektiv mit TFIIA um die TBP-DNA-Bindung. Bei hoher Konzentration von wt-NC2 wurden die Komplexe aus TFIIA und TBP auf der DNA (TBP-IIA) komplett durch NC2-TBP-DNA (TBP-NC2) ersetzt (Abb. 31, Spur 7, 8, 9). Wie erwartet war die NC2-Mutante S52R schwächer in der Konkurrenz mit TFIIA. Auch bei hoher Konzentration von NC2 (Spur 12) konnte der TFIIA nicht vollständig von TBP entfernt werden (Abb. 31, Spur 10-12 versus Spur 7-9).



**Abb. 31:** Konkurrenz von NC2 und  $\beta$ S52R-Mutante mit TFIIA. Bindungsreaktionen enthielten HIV-Promotor-Oligonukleotid (25 fmol), rekombinanten hTBP (7,5 ng) und yTFIIA (50 ng). Verschiedene Konzentrationen an wt-(NC2wt) und mt-NC2 (NC2S52R) (Zahlen in ng) wurden eingesetzt. Die Positionen der monomeren und multimeren TBP-NC2-DNA Komplexe (TBP-NC2 und h.o.), der Komplexe von TFIIA-TBP-DNA (TBP-IIA) sowie der freien DNA sind angegeben.

Zusammengefaßt, weist die NC2-Mutante S52R Defekte in der Komplexbildung mit TBP auf DNA, insbesondere im direkten Sequenz-unspezifischen DNA-Kontakt auf. In Korrelation mit ihrer verlorenen Funktion in der Transkriptionsrepression, zeigt die Mutante  $\beta$ S52R ihre Inkompetenz in der Konkurrenz mit dem generellen Transkriptionsfaktor TFIIA.

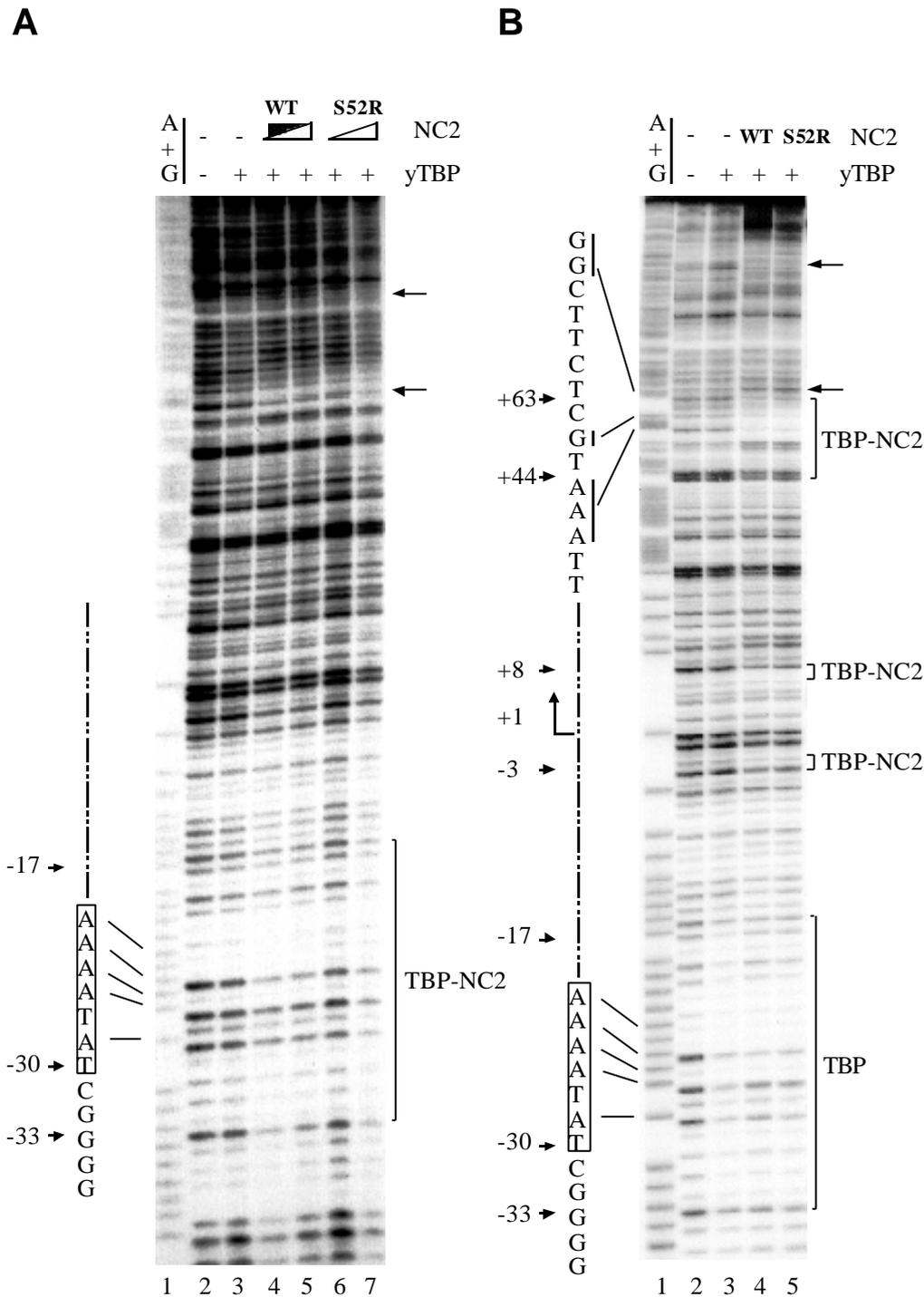
#### 4.8.4.6. DNase I Footprinting-Analyse der NC2-Mutante S52R

Frühe Arbeiten haben gezeigt, daß NC2 zusätzliche DNA-Kontakte außerhalb der TATA-Box auf Promotor induziert (Goppelt *et al.*, 1996). In DNA-Footprinting-Experimenten, schützen NC2 und TBP die TATA-Box des HIV-Promotors vor DNase I-Verdau. Gleichzeitig werden DNase I-hypersensitiven Stellen in der Umgebung der TATA-Box ausgebildet. Ein zusätzliches "Fenster" in einer Thymidin-reichen Region wurde stromabwärts der TATA-Box beobachtet (Goppelt *et al.*,

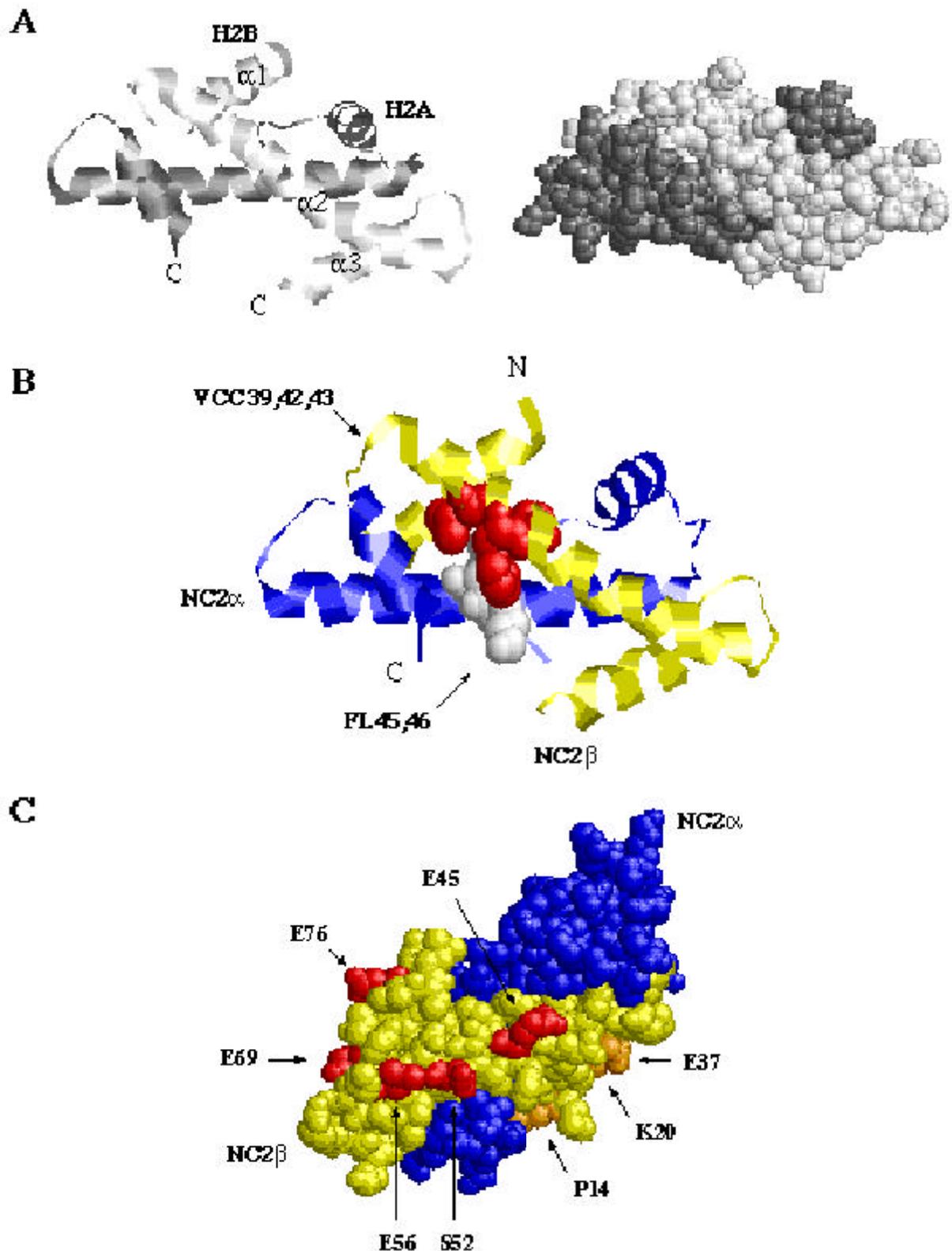
1996). Ähnliche Effekte werden ebenfalls für AdML-Promotor (AdML) beschrieben (J.Kim *et al.*, 1996).

Mutante  $\beta$ S52R wurde am Adenovirus Major Late-Promotor auf die Komplexbildung mit  $\gamma$ TBP untersucht.  $\gamma$ TBP allein ruft keinen unspezifischen leichten Schutz vor DNase I hervor (Abb. 32A, Spur 2 versus Spur 1). Durch Titration von wt-NC2 wurde allmählich die TATA-Box zwischen den Positionen -33 und -17 geschützt (Abb. 32A, Spur 4, 5 versus Spur 2). In Anwesenheit der  $\beta$ S52R-Mutante ist das Fenster auch zu sehen, allerdings erst bei höherer Konzentration (Abb. 32A, Spur 6, 7 versus Spur 4, 5). Außerdem wurde geringe Unterschiede im 3'-Bereich der TATA-Box beobachtet, ohne daß diese bisher exakt zugeordnet wurden.

Dieses Experiment wurde mit einer höheren Konzentration an wt- und mt-NC2 wiederholt. Das Resultat ist in Abb. 32B dargestellt. Hier sieht man die Bindung von TBP an die TATA-Box und somit die Generation eines einen Schutzbereiches von Position -33 bis -17 auf dem Promotor. Der Zusatz von wt-NC2 bzw. S52R-Mutante deckte zusätzliche Fenster (um -3, um +8 und von +44 bis +63) sowie eine Reihe hypersensitiver Stellen auf. Allerdings war kein Unterschied zwischen wt- und mt-NC2 festzustellen (Abb. 32B, Spur 4, 5 versus Spur 3).

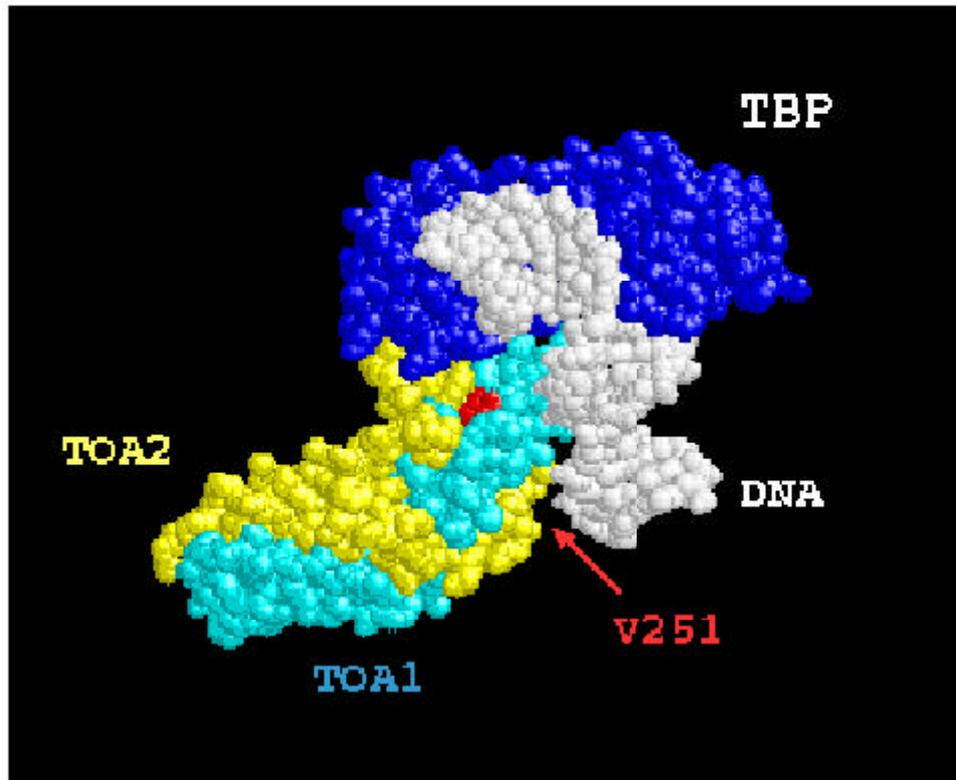


**Abb. 32:** DNase I Footprinting-Analyse von TBP-NC2-Promotor Komplexen. Die mit "A+G" bezeichneten Spuren geben die Sequenzen der Promotor-Fragmente (des AdML-Promotors, auf den nicht-codierenden Strang) wieder. yTBP (30 ng) und Wildtyp- (WT) bzw. Mutante-NC2 (S52R) wurden mit Promotor-DNA inkubiert. Die eingesetzten NC2-Konzentrationen waren 400 und 550 ng. Die geschützten Regionen (eckige Klammern) im Bereich um TATA-Box (eingerahmt) sind markiert. (A) Zusammen mit TBP schützte NC2-Mutante S52R die TATA-Box-Region erst bei höherer Konzentration, während wt-NC2 auch bei niedrigerer Konzentration effektiv mit TBP an TATA-Box binden konnte. Auf dem nicht-codierenden Strang schützte NC2 zusammen mit TBP die Positionen -33 bis -17. (B) Vergleich der durch TBP und TBP-NC2 geschützten Bereiche auf AdMLP-Fragmenten. Die Bindung von TBP allein bietet einen kompletten Schutz um die TATA-Box (Spur 3 versus Spur 2). Der Zusatz von wt- bzw. mt-(S52R) NC2 induzierte einen zusätzlichen Schutz außerhalb der TATA-Box. Die TATA-Box und die spezifisch durch TBP-NC2 geschützten Positionen sind mit Klammern markiert. Die durch TBP-NC2 hervorgerufenen DNase I-hypersensitiven Stellen sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

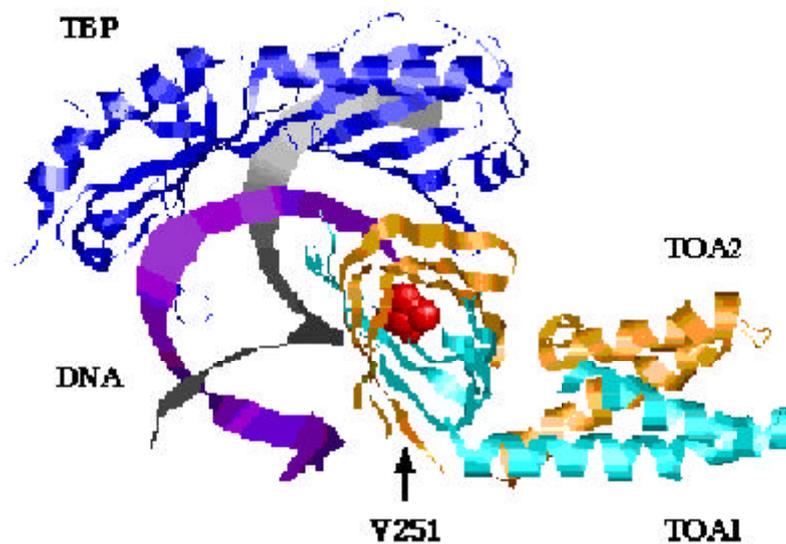


**Abb. 24:** Projektion der NC2-Punktmutationen in Strukturmodell von NC2. Die NC2 $\alpha$  wird in blau und NC2 $\beta$  in gelb dargestellt. (A) Darstellung der Histone-Fold-Domänen von H2A (dunkel) und H2B (hell). Die Helices in H2B sind numeriert. Der C-Terminus vom H2A bzw. H2B ist markiert. (B) Die Aminosäuren VCC39,42,43 (in rot) befinden sich genau auf der inneren Oberfläche vom hNC2 $\beta$  gegenüber der FL45,46 (in weiß) in hNC2 $\alpha$ . Der N-Terminus vom NC2 $\beta$  und der C-Terminus vom NC2 $\alpha$  sind angegeben. (C) Darstellung der NC2-Punktmutationen (in rot oder orange) auf der Oberfläche vom Dimer-Komplex aus NC2 $\alpha$  und NC2 $\beta$ .

A



B



**Abb. 15:** Position der Suppressormutation in Toa1 im yTFIIA-TBP-DNA-Komplex. In der Kristallstruktur sind die konservierte Regionen der großen Untereinheit von yTFIIA, Toa1 (grün) und die kleine Untereinheit Toa2 (gelb) im Komplex mit yTBP (blau) und Promotor-DNA (weiß in A und weiß/lila in B) dargestellt. Die mutierte Stelle im Suppressor, Valin in der Position 251 (V251, rote Kugel) ist auf der Dimerisierungsoberfläche von Toa1 und Toa2 lokalisiert (B), und in der Nähe der TBP- und DNA-Kontaktsfläche (A).

## 4.7. Biochemische Charakterisierung der Toa1-Suppressormutante

### 4.7.1. Die Toa1-Suppressormutante dimerisiert mit Toa2

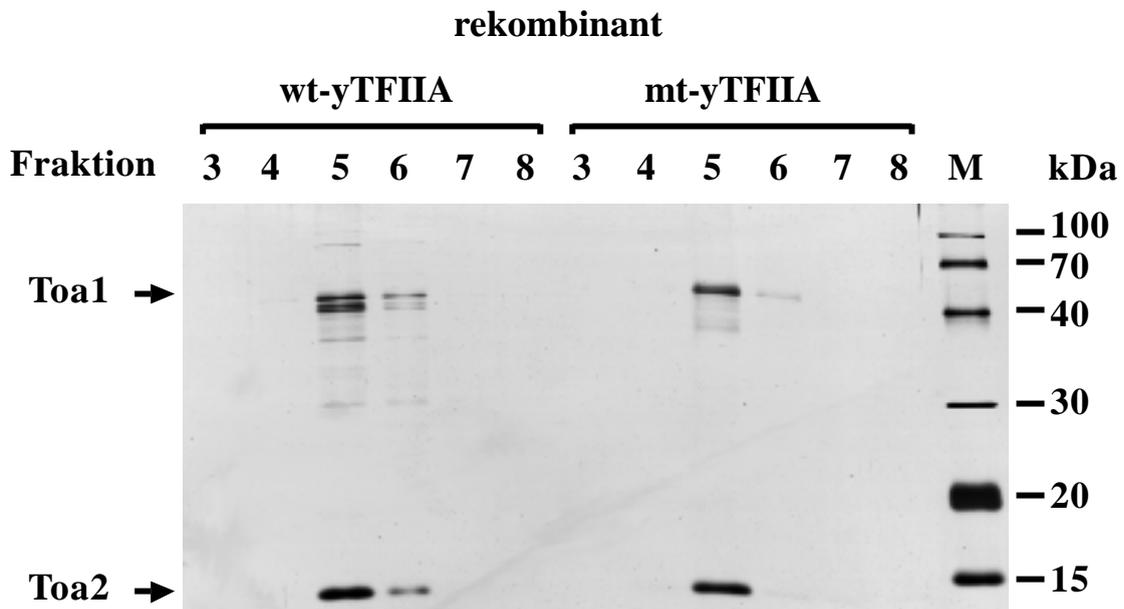
Die Lage der Suppressormutation im yTFIIA-TBP-DNA-Komplex legt nahe, daß sie die Dimerisierung von yTFIIA beeinträchtigt. Um diese Theorie zu überprüfen, wurden rekombinante Proteine des Wildtyp-Toa1 (wt-Toa1), der Toa1-Suppressormutante (mt-Toa1) und des Toa2 in *E. coli* exprimiert. Die überexprimierten Proteine wurden aus unlöslichen Fraktionen gereinigt und co-renaturiert. Das Wildtyp (wt)- und Mutante (mt)-yTFIIA wurden unabhängig voneinander über eine Superdex 75-Säule fraktioniert. Zweck dieses Versuchs war der Vergleich der Komplex-Größe. Ist mt-Toa1 nicht komplexiert mit Toa2, sollte Toa2 mit kleinerem Molekulargewicht eluieren.

Die Toa1-Untereinheit hat eine native Größe von 32 kDa, Toa2 von 13,5 kDa. Ein Dimer aus Toa1 und Toa2 wird in der Größordnung von 45 kDa erwartet. Es wurde auch berichtet, daß sich yTFIIA in der Gelfiltration als ein 90 kDa-Tetramer eluieren läßt (Kang *et al.*, 1995), alle Größe, die auf Superdex 75 auftrennbar sind. Die Fraktionen aus der Gelfiltration mit wt- und mt-yTFIIA wurden nebeneinander auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die nachfolgende Silberfärbung zeigte, daß sowohl wt- als auch mt-Toa1 präzise in den gleichen Fraktionen (Fraktion 5 und 6) eluieren. Toa2 kam quantitativ zusammen mit Toa1 in der Gelfiltration. Freie Toa2 oder Toa1 waren nicht detektierbar (Abb. 16A). Möglicherweise sind die freie Komponenten unlöslich.

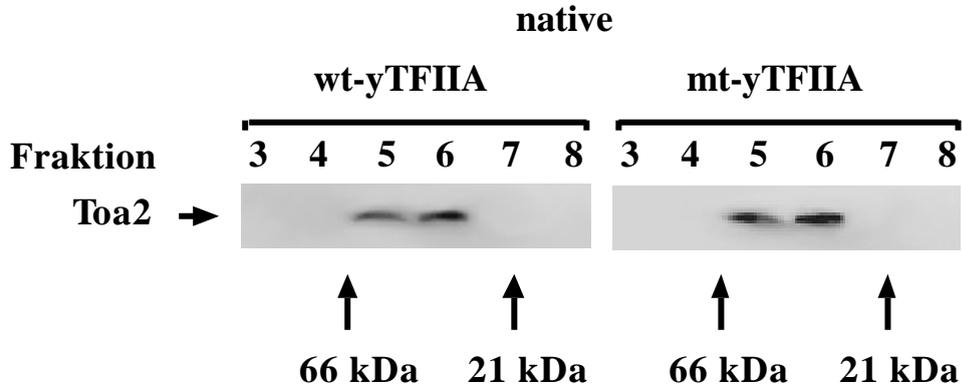
Um zu untersuchen, ob sich die Toa-Komplexe *in vivo* identisch wie die rekombinanten Proteine verhalten, wurden Gesamtproteinextrakte aus dem Wildtyp- (MY1) und dem Suppressorstamm (MY1870) präpariert und über Superdex 75 fraktioniert (siehe Material und Methoden). Nach der Auftrennung der Fraktionen durch SDS-PAGE wurden die Toa-Proteine in Western-Blot mit anti-Toa2-Antikörper detektiert. Als Größenmarker dienten BSA (66 kDa) und Trypsin-Inhibitor (21 kDa). Auch hier co-eluierten die beiden Toa-Untereinheiten, im wt- sowie im Suppressor-Kontext (Abb. 16B, Fraktion 5, 6). Western-Blot-Analyse mit Anti-Toa1-Antikörper lieferte identische Ergebnisse.

Daraus läßt sich schließen, daß trotz der Lokalisation der Suppressor-Mutation auf der Dimerisierungsoberfläche von Toa1, ist das mt-Toa1 in der Lage, stabile TFIIA-Komplex zusammen mit Toa2 auszubilden. Dies gilt sowohl für die rekombinanten Proteine aus *E. coli* als auch für die nativen Proteine aus Heferohextrakten. Eine mögliche Erklärung könnte sein, daß die große Dimerisierungsoberfläche zwischen Toa1 und Toa2 im yTFIIA-Komplex die V251F-Punktmutation toleriert (Tan *et al.*, 1996 und siehe Abb. 15A).

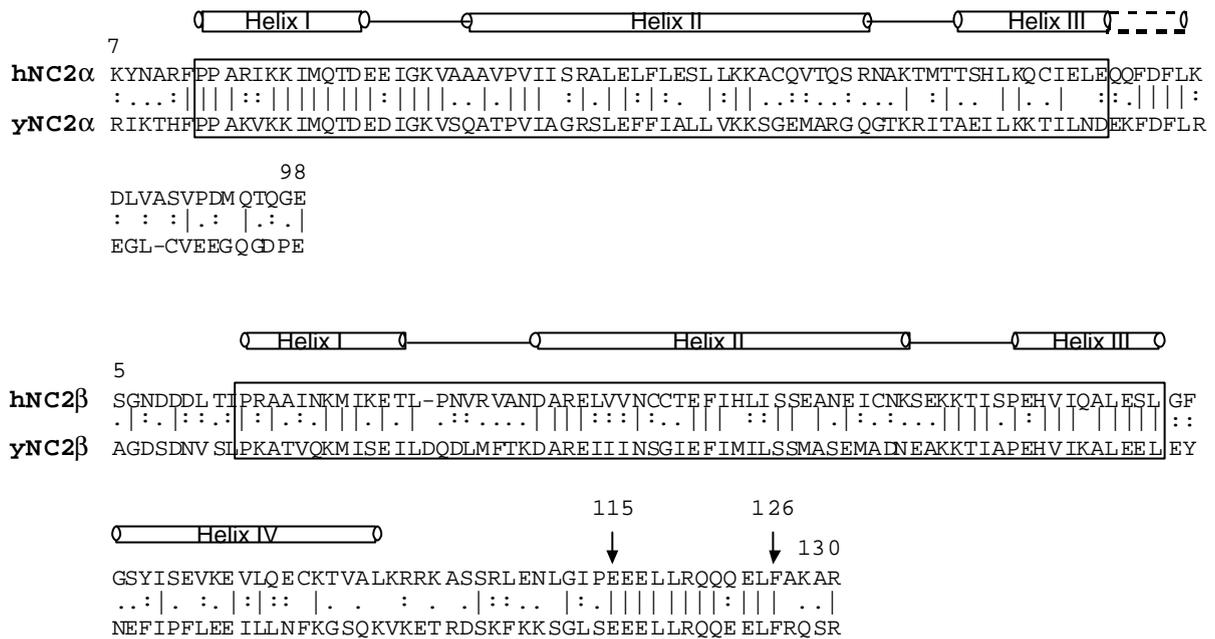
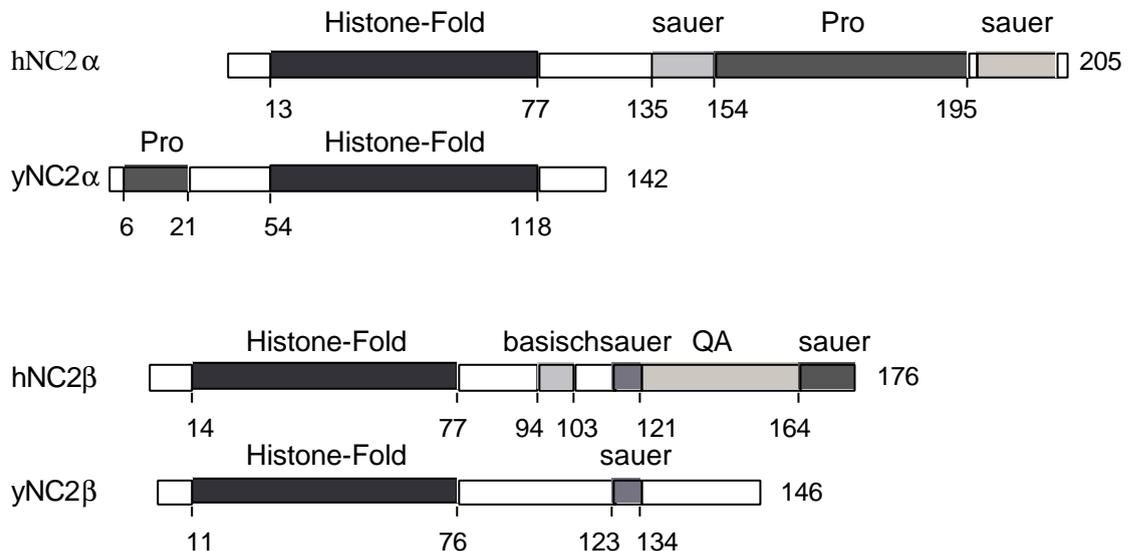
A



B



**Abb.16:** Die Suppressormutation hat keinen Einfluß auf die Dimerisierung von Toa1 und Toa2. (A) Silbergefärbtes SDS-Polyacrylamidgel zeigt Co-elution von rekombinatem Wildtyp- (wt) und mutiertem (mt) Toa1 mit Toa2 auf einer Superdex 75-Säule. Die Fraktionen wurden in SDS-PAGE analysiert. Die Spur M enthält einen Proteinmarker mit angegebenen Größen. (B) Western-Blot-Analyse der auf Superdex 75 fraktionierten Hefeextrakte mit Anti-Toa2-Antikörper. Proteinmarker mit Größen von 66 kDa und 21 kDa wurden verwendet. Toa2 vom Hefestamm mit wt- und mt-yTFIIA eluiert beide mit einer Molekulargewicht von etwa 45 kDa.

**A****"Histone-Fold"-Domäne****B**

**Abb. 4:** Analyse der Aminosäuresequenz von NC2 $\alpha$  und NC2 $\beta$ . **(A)** Sequenzvergleich der homologen Bereiche von NC2 aus Mensch und Hefe. Die Histone-Fold-Domänen innerhalb der beiden NC2-Untereinheiten sind eingerahmt. Die Positionen der drei Helices in den Histone-Fold-Domänen sind durch Zylinder dargestellt. Die Helices sind durch  $\beta$ -Schleifen (durchgezogene Linien) verbunden. Helix III der NC2 $\alpha$ -Untereinheit, die die Helix III von Histon H2A fortsetzt ist durch einen Zylinder mit gestrichelter Linie gekennzeichnet. Die zusätzliche Helix in NC2 $\beta$ , die die vierte Helix des H2B entspricht (Arents *et al.*, 1991) ist als Helix IV bezeichnet. **(B)** Schematische Darstellung von NC2-Untereinheiten aus Mensch und Hefe. Die Positionen der Histone-Fold-Domäne, der sauren, basischen, Prolin-reichen (Pro) und Glutamin/Alanin-reichen (QA) Regionen sind angegeben.

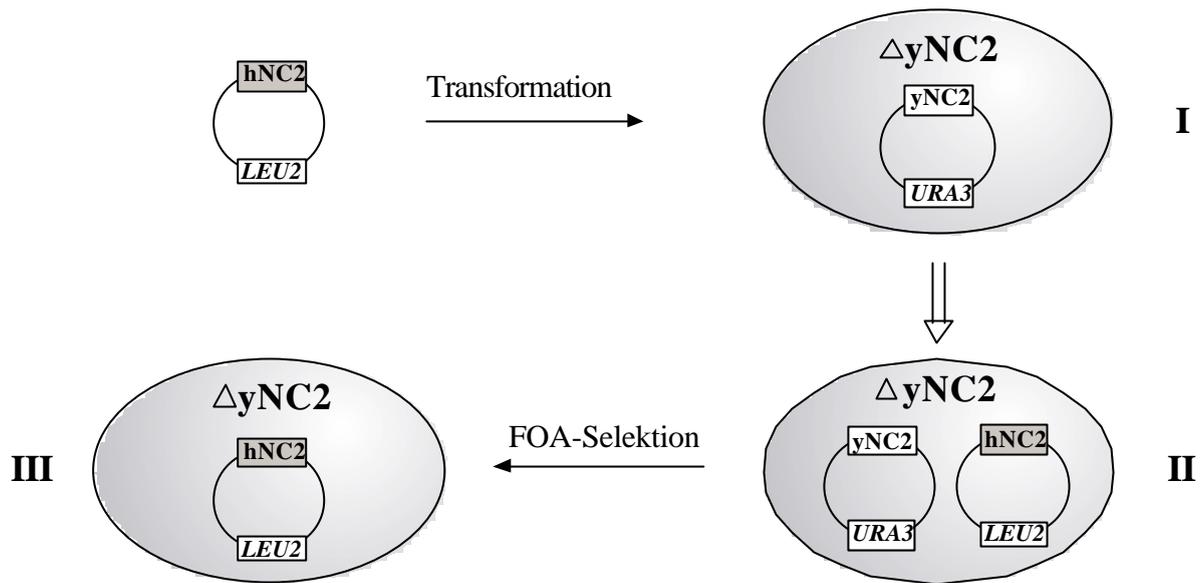
## 4.2. Funktionelle Analyse der humanen NC2-Untereinheiten in Hefe

Die starke Homologie zwischen NC2 aus Mensch und Hefe spricht dafür, daß *S. cerevisiae* als Modellorganismus für die *in vivo*-Untersuchungen des hNC2 optimal geeignet ist. Die Charakterisierung der hNC2-Untereinheiten in Hefe sollte Aufschluß über die Struktur- und Funktionsdomäne des Repressors geben, die *in vivo* essentiell sind. Außerdem sollte dies einen Einblick in den Mechanismus der Transkriptionsrepression, der von der Hefe bis zum Mensch konserviert ist, ermöglichen.

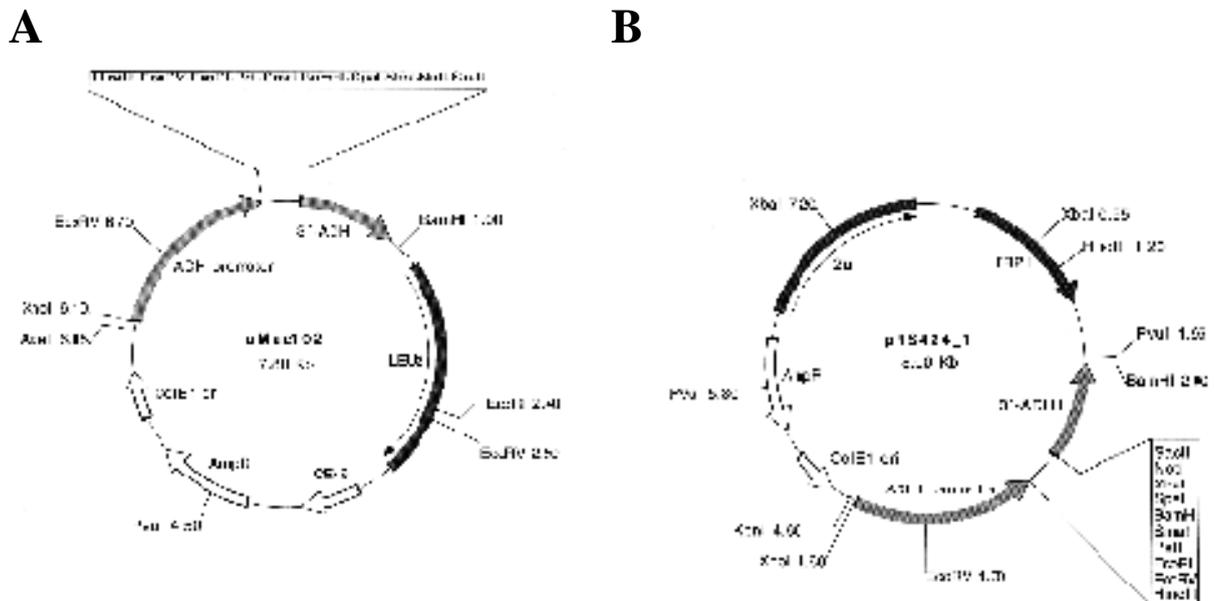
### 4.2.1. Einführung des humanen NC2 in Hefe durch Plasmid-Austausch

Mit Hilfe der "Plasmid-Austausch"-Technik ist es möglich, fremde Plasmide in die Zelle einzuführen gegen die interne auszutauschen. Das Funktionsprinzip des Plasmid-Austausches ist in Abb. 5 schematisch dargestellt. Als erstes wird ein haploider Stamm benötigt, in dem die genomische Kopie des NC2-Gens (NC2 $\alpha$  oder NC2 $\beta$  oder beiden) inaktiviert ist. Die Inaktivierung von Hefe-NC2 (yNC2) erfolgte durch eine vollständige Deletion des codierenden Bereiches vom NC2-Gen. Dieser Stamm enthält gleichzeitig eine Wildtyp-Kopie des yNC2-Gens auf einem episomalen *URA3*-Plasmid. In die haploide Zellen mit chromosomalem Nullallel von yNC2 wird ein zweites Plasmid (mit *LEU2* oder *TRP1* als Selektionsmarker), das eine Kopie von humanen NC2-Gen (hNC2) enthält, transformiert. Daraufhin wurden die Transformanten auf ein 5-FOA-haltiges Wachstumsmedium transferiert. In Anwesenheit von 5-FOA sind die Zellen gezwungen auf das *URA3*-Plasmid zu verzichten, da das Genprodukt intaktes *URA3*-Gens, dem Substrat-Analogon 5-FOA in Uracil-Stoffwechsel einbaut und in ein toxisches Zwischenprodukt umwandelt. Auf 5-FOA-Medien erhält man Zellen, die die *URA3*-Plasmide nicht mehr besitzen. Dadurch wird das ursprüngliche Wildtyp-yNC2-Gen gegen das hNC2 ausgetauscht. Die hNC2 $\alpha$ - und hNC2 $\beta$ -Gene wurden in Hefe-Expressionsvektoren kloniert und auf diese Weise in die Hefezellen eingeführt.

Für die funktionelle Analyse der humanen NC2 in Hefe wurden die hNC2 $\alpha$ - und hNC2 $\beta$ -Gene in den Polylinker zwischen dem *ADHI*-Promotor und -Terminator der Hefe-Expressionsvektoren kloniert und in die Zellen co-transformiert. Dabei wurden hNC2 $\alpha$  und hNC2 $\alpha$ -Mutanten von *CEN*-Vektoren (Abb. 6A) und die hNC2 $\beta$  und hNC2 $\beta$ -Mutanten von 2 $\mu$ -Plasmiden (Abb. 6B) exprimiert.



**Abb. 5:** Schematische Darstellung des Experiments zum Plasmid-Austausch. Die Hefezellen sind durch Kreise dargestellt. Der Plasmid-Austausch-Stamm (I), hat die genomische Kopie des NC2-Gens deletiert ( $\Delta yNC2$ ) und enthält eine Wildtypkopie des NC2-Gens ( $yNC2$ ) auf episomalem  $URA3$ -Plamid. In diesen Stamm wird ein zweites Plamid, das eine Kopie des humanen NC2-Gens ( $hNC2$ ) trägt, transformiert. Auf 5-FOA-Medium verlieren die Transformanten (II) das  $URA3$ -Plamid mit dem Wildtyp- $yNC2$ , erhält man Zellen, die  $hNC2$  enthalten (III).



**Abb. 6:** Das  $CEN$ -Plasmid pMAC102 (A) und  $\lambda$ -Plasmid pRS424-1 (B) (Xie *et al.*, 2000) mit multiplen Klonierungsstellen (eingerahmt) zwischen dem  $ADHI$ -Promotor und -Terminator ( $3'-ADHI$ ).

#### 4.2.2. Komplementation der essentiellen $\gamma$ NC2-Gene durch ihre humane Homologen

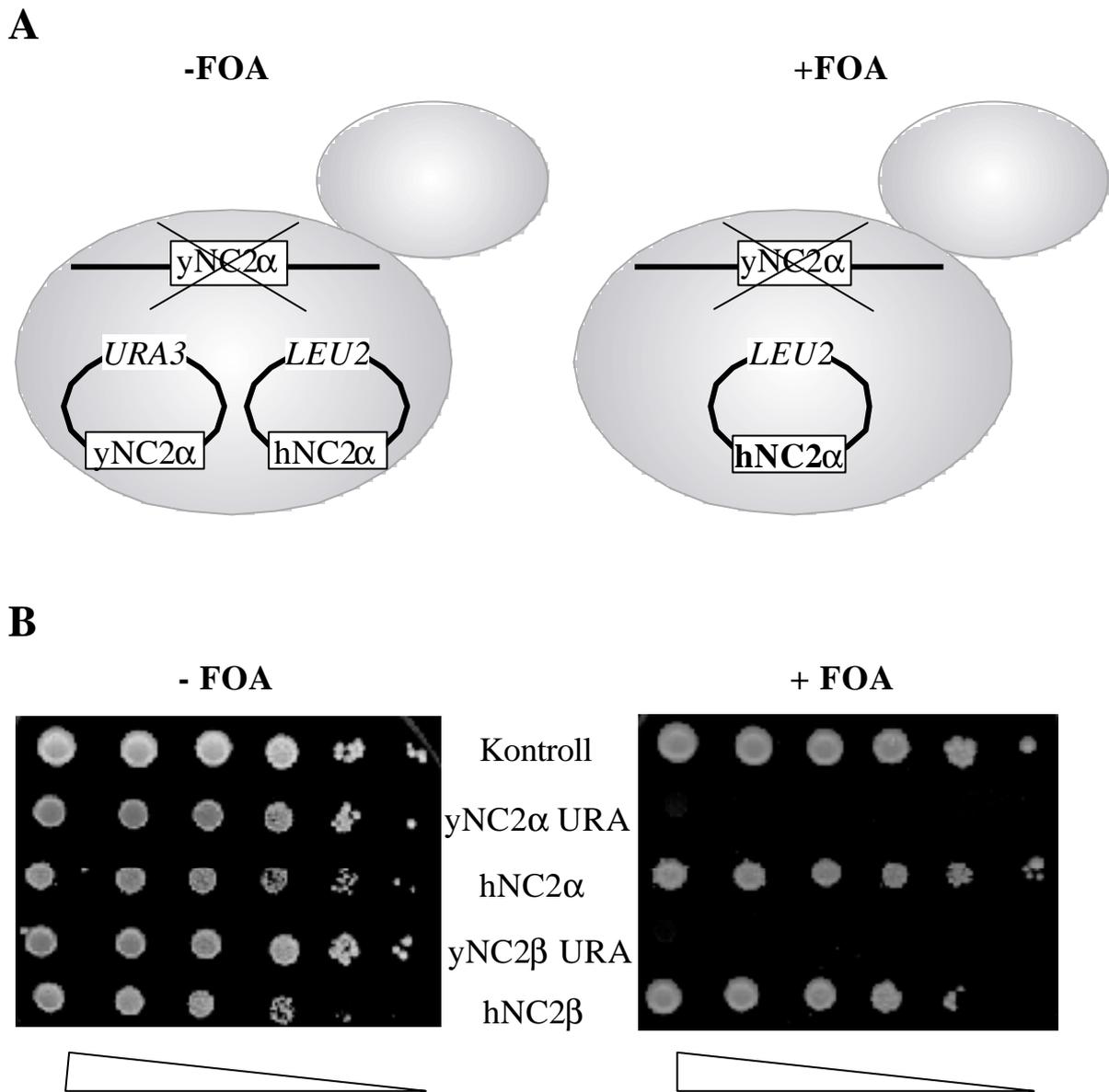
Um den molekularen Mechanismus der Transkriptionsrepression durch NC2 *in vivo* zu untersuchen, wurden zwei Plasmid-Austausch-Stämme von *S. cerevisiae* verwendet (konstruiert in der Arbeitsgruppe Martine Collart). Der Plasmid-Austausch-Stamm für NC2 $\alpha$  (MY1784) oder NC2 $\beta$  (MY1780) besitzt eine chromosomale Deletion im kompletten codierenden Bereich von  $\gamma$ NC2 $\alpha$  oder  $\gamma$ NC2 $\beta$  und die Wildtyp- $\gamma$ NC2 $\alpha$  oder - $\gamma$ NC2 $\beta$ -Gene wird von einem *CEN*-Plasmid mit *URA3*-Marker exprimiert (Lemaire *et al.*, 2000).

Vorangegangene Experimente haben gezeigt, daß beide NC2-Untereinheiten essentiell für das vegetative Wachstum von *S. cerevisiae* sind (S.J.Kim *et al.*, 1997; Prelich, 1997). Die Expression des hNC2 $\beta$  in Hefe komplementierte das  $\gamma$ NC2 $\beta$ -Gens; die Komplementierung war aber nicht vollständig. Zellen mit hNC2 $\beta$  wuchsen langsamer als die Wildtyp-Zellen. Dagegen konnte hNC2 $\alpha$  nicht das  $\gamma$ NC2 $\alpha$  ersetzen (S.J.Kim *et al.*, 1997).

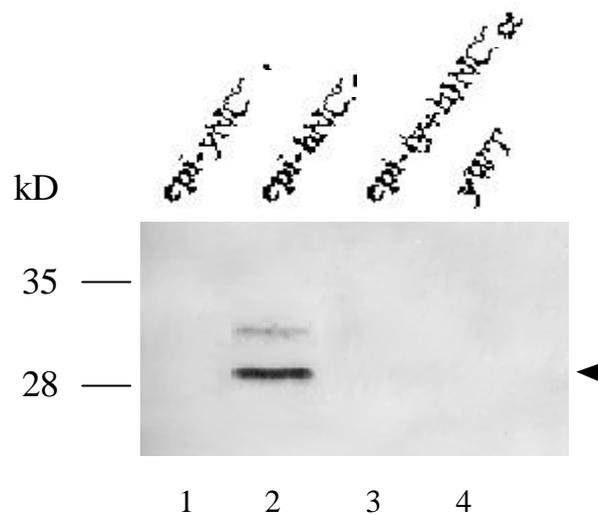
Um diesen Aspekt zu überprüfen, wurden hNC2 $\alpha$ - oder hNC2 $\beta$ -Gene in Hefe-Expressionsvektoren kloniert und in die Hefe eingeführt. Hefezellen mit normalem Wachstum konnten erhalten werden, wenn das deletierte Allel des  $\gamma$ NC2 $\beta$  durch das hNC2 $\beta$ -Gen auf einem 2 $\mu$ -Plasmid oder das deletierte Allel des  $\gamma$ NC2 $\alpha$  durch das hNC2 $\alpha$  auf einem *CEN*-Plasmid ersetzt wurde (Abb. 7B).

Zusammenfassend korreliert das Ergebnis mit den publizierten Resultaten von Prelich (1997). Beide NC2-Gene sind essentiell für Hefewachstum. Im Widerspruch zu einem frühen Bericht von S.J.Kim *et al.*, 1997, zeigen die Ergebnisse hier, daß hNC2 $\alpha$  kombiniert mit  $\gamma$ NC2 $\beta$  auch die *in vivo* Funktion von NC2 übernehmen kann.

Um die Expression der humanen NC2-Proteine in Hefe zu kontrollieren, wurde der Protein-Rohextrakt aus dem hNC2 $\alpha$ -Stamm präpariert und in einem Western-Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen hNC2 $\alpha$  getestet. Das hNC2 $\alpha$ -Protein bei 30 kDa war detektierbar in Zellen, die hNC2 $\alpha$  auf episomalem Plasmid als einzige NC2-Genkopie enthielten (Abb. 8, Spur 2). D.h. eine Überexpression von humanem NC2 $\alpha$  war nur nach der FOA-Selektion möglich (Abb. 8, vgl. Spur 3 und Spur 2).



**Abb. 7:** Komplementation der Hefe-NC2-Gene mit ihren humanen Homologen. **(A)** Schematische Darstellung des Plasmid-Austausch-Experiments am Beispiel NC2 $\alpha$ . Die Genotypen der Hefestämme auf Minimalmedium mit oder ohne FOA (+FOA, -FOA) sind dargestellt, wobei das Hefe-Chromosom durch eine Linie und Plasmide mit Kreisen symbolisiert sind. **(B)** Sowohl hNC2 $\beta$  als auch hNC2 $\alpha$  erlauben Wachstum von Hefe in Gegenwart der zweiten NC2-Untereinheit aus Hefe. Zellen aus Verdünnungsreihen (von links nach rechts) von Hefe, die yNC2 $\alpha$  bzw. yNC2 $\beta$  von einem *URA3*-Plasmid (yNC2 $\alpha$  URA bzw. yNC2 $\beta$  URA), die hNC2 $\alpha$  von einem *CEN*-Vektor (hNC2 $\alpha$ ) bzw. hNC2 $\beta$  von einem 2 $\mu$ -Plasmid (hNC2 $\beta$ ) exprimiert, sind aufgetragen.



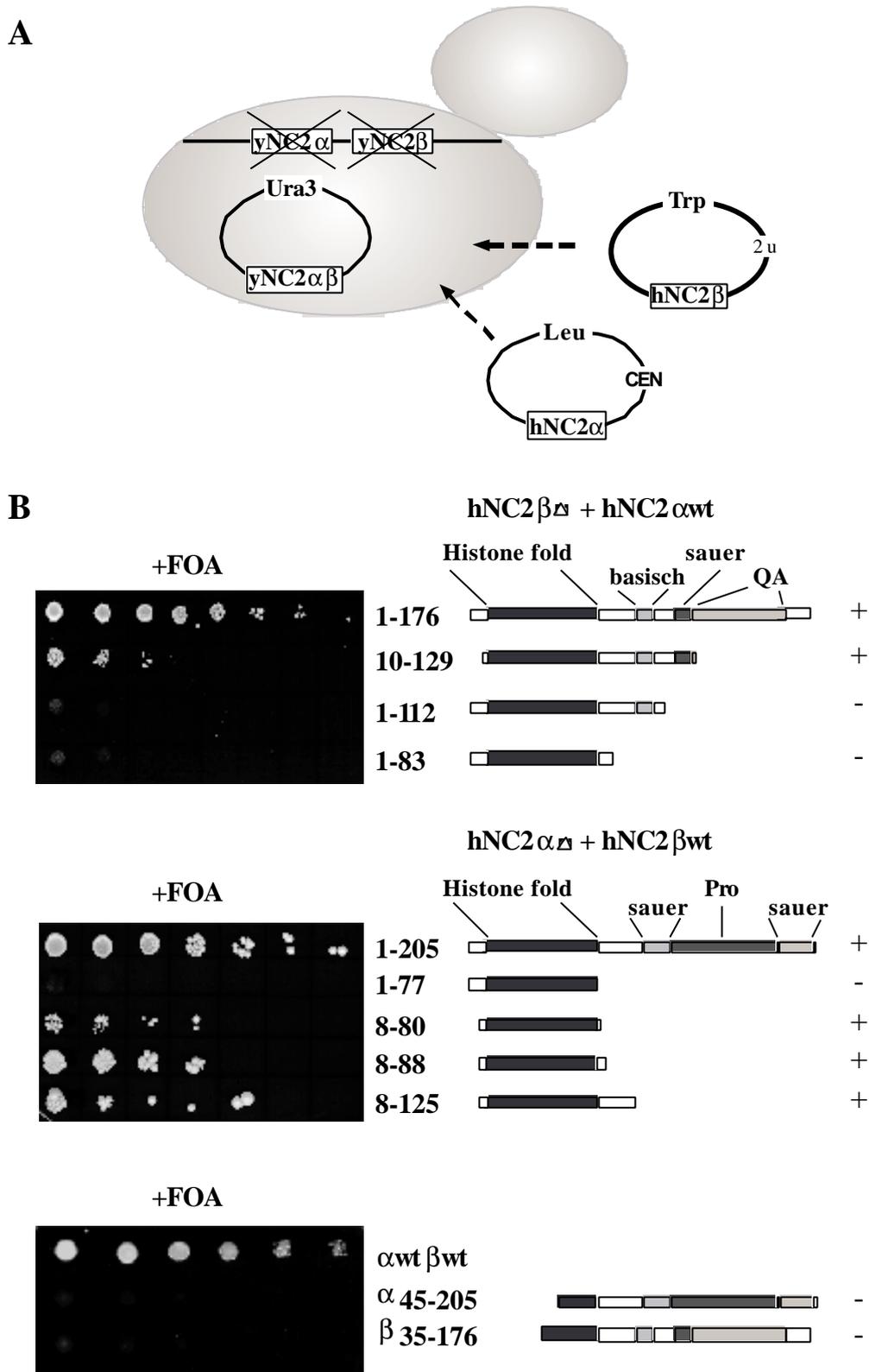
**Abb. 8:** Nachweis der hNC2 $\alpha$ -Expression in Hefen durch Western-Blot-Analyse mit einem Anti-hNC2 $\alpha$ -Antikörper. 40  $\mu$ g Gesamtprotein-Rohextrakte wurden auf 15% SDS-Gele geladen und aufgetrennt. Die Genotypen für die Hefestämme sind folgende: Wildtyp-Hefe (yWT) mit chromosomalem yNC2 $\alpha$ -Gen; Stamm epi-yNC2 $\alpha$  mit einer chromosomalen NC2 $\alpha$ -Deletion und einer episomalen Kopie von yNC2 $\alpha$ ; Stamm epi-(y+h)NC2 $\alpha$  hat neben der chromosomalen NC2 $\alpha$ -Deletion jeweils eine episomale Kopie von yNC2 $\alpha$  und hNC2 $\alpha$ ; Stamm epi-hNC2 $\alpha$  hat eine chromosomale NC2 $\alpha$ -Deletion und eine episomale Kopie von hNC2 $\alpha$ . Überexpression von hNC2 $\alpha$  nach der FOA-Selektion ist deutlich zu erkennen (Spur 2).

#### 4.2.3. Eingrenzung der funktionellen Domänen der humanen NC2-Proteine in Hefe

Um die Domänen der humanen NC2-Proteine zu definieren, welche für die konservierte *in vivo*-Funktionen von NC2 erforderlich sind, wurde ein Hefestamm konstruiert. Er besaß eine Deletion an beiden genomischen yNC2-Genen (yNC2 $\alpha$  und yNC2 $\beta$ ) auf Chromosom und exprimiert die yNC2-Gene von einem einzigen URA3-Plasmid (MY1791, Tabelle in Kapitel 2.9). Plasmid-Austausch-Experimente mit diesem NC2-Nullstamm zeigten, daß die Expression der beiden hNC2-Untereinheiten die Disruption der yNC2-Gene effektiv komplementieren kann (Abb. 9). Dieser Stamm wurde für die Struktur-Funktionsanalyse von hNC2 in Hefe eingesetzt.

Verschiedene Deletionsmutanten in hNC2 $\alpha$  und hNC2 $\beta$  wurden konstruiert (siehe Kapitel 3.4.17) und in Hefe-Expressionsvektoren kloniert. Durch Plasmid-Austausch wurden sie in MY1791 exprimiert. Folgende Resultaten sind erhalten worden (Abb. 9B): für die NC2-Funktionen in Hefe,

- i) die Histone-Fold-Domänen beider humanen NC2-Untereinheiten sind essentiell;
- ii) in Kombination mit Wildtyp-hNC2 $\beta$ , ist das Histone-Fold-Motiv in hNC2 $\alpha$  ausreichend; die ganze C-terminale Regionen werden nicht gebraucht;
- iii) in Kombination mit Wildtyp-hNC2 $\alpha$ , ist neben des Histone-Folds in hNC2 $\beta$  die C-terminale saure Region (von Aminosäuren 115-124) ebenfalls erforderlich (vgl. mit Abb. 4).

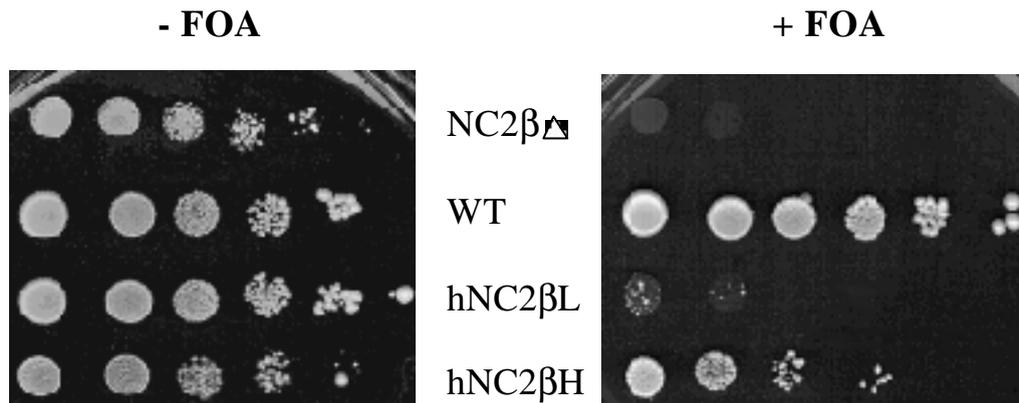


**Abb. 9:** Analyse der Funktion von humanem NC2 im NC2-Nullstamm von Hefe. **(A)** Schematische Darstellung des Verfahrens zum Austausch von Hefe-NC2- gegen humane NC2-Gene. **(B)** Deletionsanalyse der NC2 $\alpha$ - und NC2 $\beta$ -Derivate in Hefe. Zellen aus den Verdünnungsreihen (von links nach rechts) von Hefe, die verschiedene Deletionsmutante von NC2 exprimiert, sind aufgetragen. Deletionskonstrukte sind schematisch dargestellt. Histone-Fold-Domäne, basische, saure, Prolin-reiche (Pro) und Glutamin/Alanin-reiche (QA) Regionen sind gekennzeichnet. Die Konsequenzen der Deletionsmutanten auf das Hefewachstum werden mit "+" oder "-" angegeben.

### 4.3. Die Funktion der hNC2 in Hefe ist konzentrationsabhängig

In Kapitel 4.2. wurde gezeigt, daß die  $\gamma$ NC2-Funktion *in vivo* durch die Expression ihrer humanen Partner in der Zelle ersetzt werden konnte. Dabei wurde hNC2 $\alpha$  von einem *CEN*-Vektor und hNC2 $\beta$  von einem 2 $\mu$ -Plasmid (10-30 Kopien pro haploide Zelle) exprimiert. In Experimenten mit hNC2 $\beta$  von einem *CEN*-Vektor, zeigte Hefe einen langsam wachsenden Phänotyp (hNC2 $\beta$ <sub>L</sub> in Abb. 10), während Hefe mit höherer hNC2 $\beta$ -Konzentration normal wachsen konnten (hNC2 $\beta$ <sub>H</sub> in Abb. 10). Eine Korrelation zwischen der Protein-Konzentration und dem Expressionsvektor wurde durch Western-Blot-Analyse von Gesamt-Proteinextrakten mit einem Anti-hNC2 $\beta$ -Antikörper bestätigt (persönliche Mitteilung von M. Lemaire). Höhere hNC2 $\alpha$ -Konzentrationen erreicht durch Expression von einem 2 $\mu$ -Plasmid waren toxisch für Hefe (Daten nicht gezeigt).

Daraus läßt sich schließen, daß die Funktionen der hNC2-Untereinheiten in Hefe konzentrationsabhängig sind. Die Konzentration beider NC2-Untereinheiten wird in der Zelle streng kontrolliert. Die NC2-Funktion zeigt von Mensch zu Hefe eine Spezies-Spezifität: die *in vivo*-Funktion von  $\gamma$ NC2 $\beta$  kann nur durch eine Überexpression des hNC2 $\beta$  vom 2 $\mu$ -Vektor ersetzt werden, während die  $\gamma$ NC2 $\alpha$ -Funktion durch sein humanes Homolog auf gleichem Niveau komplementiert werden kann. Der Grund für diese Spezies-Spezifität könnte sein, daß das hNC2 $\beta$ -Protein in Hefe weniger stabil als das  $\gamma$ NC2 $\beta$  ist. Es muß deshalb in ausreichender Menge exprimiert werden, um den Mangel in der Proteinstabilität zu kompensieren. NC2 ist ein starker Repressor, der die Klasse II-Transkription vieler Genen beeinflussen kann (Meisterernst and Roeder, 1991; Inostroza *et al.*, 1992). Überschüssiges NC2 (hNC2 $\alpha$ ) ruft überwiegend die Repression verschiedener Gene hervor und bringt dadurch die positiven und negativen Kontrollen der Genexpression aus dem Gleichgewicht, welches letztendlich toxisch auf die Zellen wirken kann.



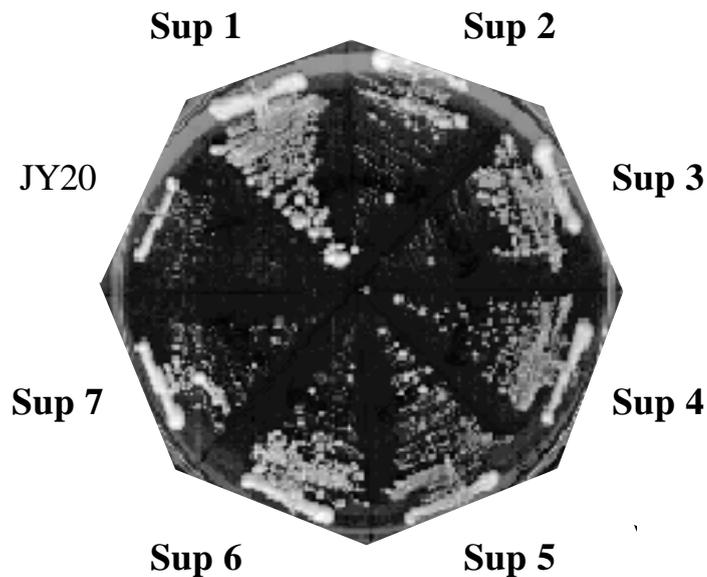
**Abb. 10:** Konzentrationsabhängige Funktion von hNC2 $\beta$  in Hefe. Zellen aus den Verdünnungsreihen (von links nach rechts) von Hefe, die kein NC2 $\beta$  (NC2 $\beta\Delta$ ), Hefe-NC2 $\beta$  (WT), hNC2 $\beta$  von einem *CEN*-Vektor (hNC2 $\beta_L$ ) bzw. hNC2 $\beta$  von einem 2 $\mu$ -Plasmid (hNC2 $\beta_H$ ) exprimiert, sind aufgetragen. Die Zellen zeigen ein normales Wachstum mit hNC2 $\beta_H$  und langsames wachsenden mit hNC2 $\beta_L$ .

#### 4.4. Isolierung eines Suppressors von niedriger NC2b-Konzentration

##### 4.4.1. Suppressor-Selektion von NC2b-Defizienz

Um die *in vivo*-Funktion von NC2 zu untersuchen und spezifisch funktionelle Partner für NC2 zu finden, es wurde eine Suppressor-Selektion vorgenommen. Hierfür wurde die Hefe-Zellen eingesetzt, die hNC2 $\beta$  unterexprimiert haben (JY20, Zellen mit hNC2 $\beta_L$ ).

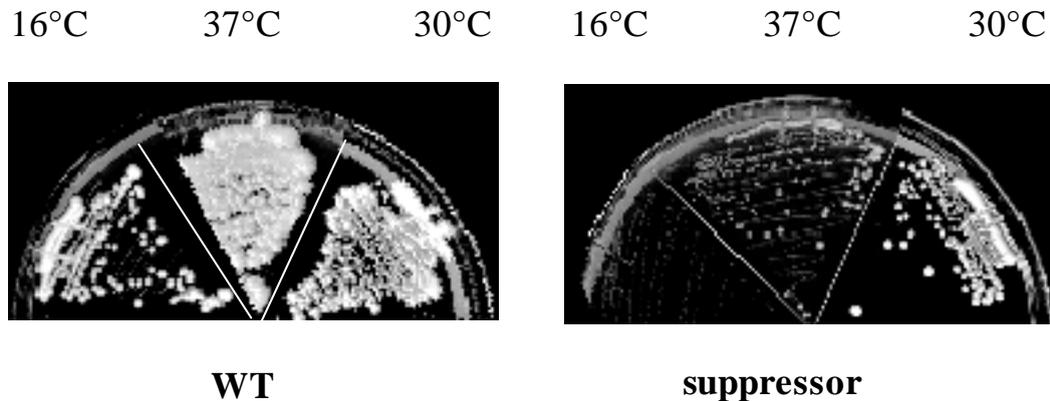
8 verschiedene Kolonien wurden in flüssigem Vollmedium (YPD) angeimpft, bei 30°C bis zur exponentiellen oder stationären Phase wachsen gelassen. Von diesen Flüssigkulturen wurden 10<sup>7</sup> Zellen auf einer YPD-Platte ausplattiert. Nach 2-3 Tagen wurden Suppressoren isoliert. Zu diesem Zeitpunkt sind die Kolonien des Ausgangsstamms (JY20) noch unsichtbar. Diese Suppressoren entstanden spontan aufgrund der niedrigen NC2 $\beta$ -Konzentration. Jeder Klon könnte also eine andere Mutation im Genom tragen. Aus dieser Selektion wurden insgesamt 53 unabhängige Suppressor-Klone isoliert. Abb. 11 zeigt die Unterschiede in der Wachstumsrate zwischen dem NC2 $\beta$ -defizienten Stamm (JY20) und den Suppressoren (Sup1 - Sup7).



**Abb. 11:** Vergleich des Wachstums von dem Hefestamm mit NC2 $\beta$ -Defizienz (JY20) und Suppressor-Mutanten (Sup1-Sup7). Die Zellen wurden auf YPD-Platten ausgestrichen und für 3 Tage bei 30°C inkubiert.

#### 4.4.2. Isolierung einer Temperatur-sensitiven Mutante

Mutationen in Hefezellen sind oft mit einem auffälligen Phänotyp verbunden, wie z.B. Temperatursensitivität, Nährstoff-Auxotrophie, Klumpenbildung und Sensitivität gegen chemische Substanzen. Die optimale Temperatur für Hefewachstum liegt bei 30°C, sie wächst aber in einem Bereich von 10°C bis 37°C. Temperatur-sensitive (ts) Mutante sind besonders gut für genetische Studien geeignet. Hier wurde deshalb auf die Temperatur-Sensitivität untersucht. Dazu werden einzelne Suppressoren parallel auf drei Vollmedium-Platten ausgestrichen bei 30°C, 16°C bzw. 37°C inkubiert. Als positive Kontrolle diente der Wildtyp-Hefestamm (MY1, Xie *et al.*, 2000). Ein Suppressor (MY1802, Xie *et al.*, 2000) erwies sich als Kälte-sensitiv (bei 16°C). Er zeigte auch leichte Wärme-Sensitivität bei 37°C (Abb. 12).



**Abb. 12:** Eine Kälte-sensitive Suppressor-Mutante. Verglichen werden Wachstum von Wildtyp-Hefe (WT) und dem Suppressor (MY1802) bei 16°C, 30°C und 37°C.

#### 4.5. Genetische Charakterisierung des Temperatur-sensitiven Suppressor von NC2b

##### 4.5.1 Der NC2b-Suppressor hat eine Punktmutation in Genom

Um die Mutationen in den Suppressoren zu identifizieren, mußte zuerst die Anzahl der Mutationen innerhalb des Genoms bestimmt werden. Dazu wurde der Suppressor-Stamm (MY1802, *Mata*) mit dem Plasmid-Austausch-Stamm für NC2 $\beta$  vom entgegengesetzten Paarungstyp (MY1781, *Mat $\alpha$* , Xie *et al.*, 2000) gekreuzt. Zur Induktion der Sporulation wurden die diploiden Hefezellen unter Stickstoffmangel-Bedingungen inkubiert. Die freigesetzten Auscussporen, die als Viererverbände (Tetraden) vorliegen, wurden weiter analysiert. Mit Hilfe eines Mikromanipulators wurden die Sporen einzelner Tetraden auf bestimmte Stellen einer Wachstumsplatte gelegt, wobei alle vier Sporen (S1 - S4) einer Tetrade (T1, T2 ... oder T7) in einer Reihe von oben bis unten zu finden waren. Da die Zellen zweier Elternstämme bei der Kreuzung zunächst zu einer Zygote verschmelzen, kann es in der nachfolgenden meiotischen Teilung zur Generierung von Nachkommen mit neuer genomischer Zusammensetzung kommen. Aufgrund der unterschiedlichen genomischen Zusammensetzungen, unterscheiden sich die vier Sporen einer Tetrade in ihrer Wachstumsrate (Abb. 13A). Die Genotypen des väterlichen und mütterlichen Stamms sind in Tab. II zusammengestellt.

**Tabel II:** Genotyp des Suppressorstamms MY1802 und seines Elternstamms mit entgegengesetztem Paarungstyp.

Stämme	Paarungstyp	Genomische Zusammensetzung	Referenz
--------	-------------	----------------------------	----------

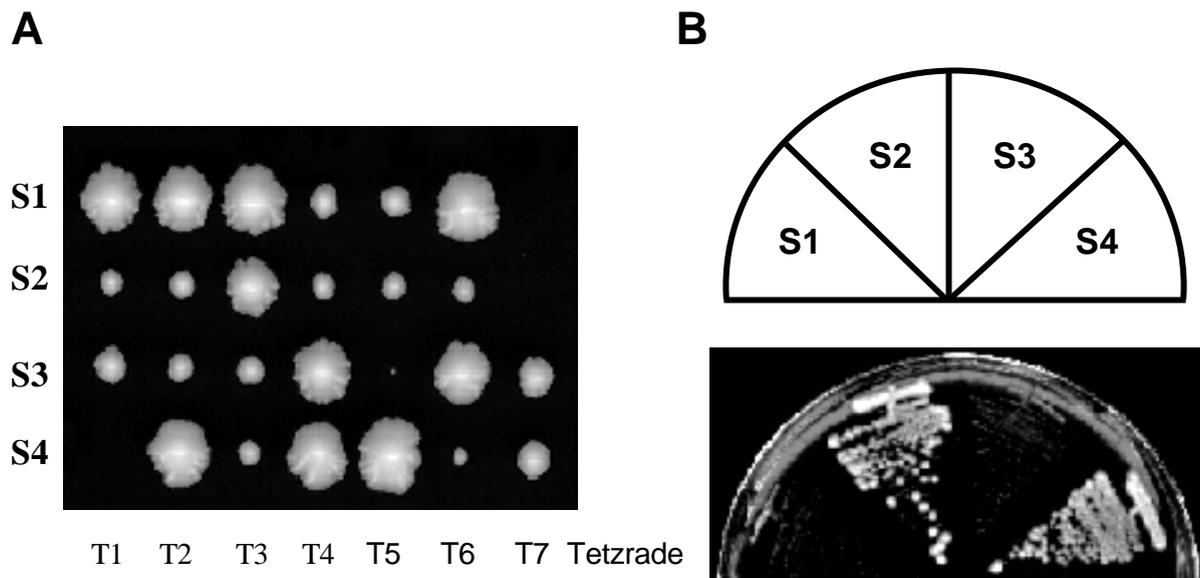
MY1802	<i>Mata</i>	<i>ync2b::KAN pLEU2-hNC2b sup-mut</i>	Xie <i>et al.</i> , 2000
MY1781	<i>Mata<math>\alpha</math></i>	<i>ync2b::KAN pURA3-ync2b</i>	Xie <i>et al.</i> , 2000

Die Kreuzung dieser Elternstämme führt deshalb dazu, daß alle vier Sporen einer Tetrade die Disruption des *yNC2 $\beta$* -Gens besitzen und daher Kanamycin-resistent (G418) sind. Angenommen, daß der Suppressor-Stamm MY1802 eine einzige genomische Mutation aufweist, so werden in diesem Tetrudentest zwei Sporen einer Tetrade die Mutation erhalten, während die anderen zwei wildtyp bleiben.

Die Plasmide der Elternzellen können prinzipiell auf alle Tochterzellen vererbt werden. In Abwesenheit von Selektionsdruck können sie aber auch im Lauf der Zellteilungen verloren gehen. Da alle Zellen die genomische Deletion von *yNC2 $\beta$*  besitzen, sind die Zellen auf das Vorkommen des episomalen Plasmids mit *NC2 $\beta$*  angewiesen. Die Sporen, die weder das *URA3*-Plasmid mit *yNC2 $\beta$*  noch das *LEU2*-Plasmid mit *hNC2 $\beta$*  besitzen, können nicht wachsen (wie die Spore S4 von Tetrade T1 und Spore S1, S2 von Tetrade T7 in Abb. 13A). Die An- oder Abwesenheit des Plasmids wurde durch einen Wachstumstest auf selektiven Medien überprüft. Die Tetraden mit vier Sporen (Tetrade T2, T3, T4 und T6) wurden weiter untersucht.

Hefezellen, die eine unzureichende Menge an *NC2 $\beta$*  hatten, zeichnen sich durch einen langsam wachsenden Phänotyp aus, während die Suppressoren ein normales Wachstum aufwiesen. Die unterschiedlichen Genotypen der Sporen einer Tetrade im Bezug auf das Vorkommen der Suppressormutation wurden daher durch die Wachstumsunterschiede gekennzeichnet. Um die Häufigkeit des Vorkommens von Suppressormutation in den Sporen einer Tetrade zu bestimmen, wurden die Sporen in Vierergruppen auf FOA-Platten transferiert, um das *URA3*-Plasmid mit *yNC2 $\beta$*  zu entfernen. Das Vorhandensein einer Wildtyp-Kopie von *yNC2 $\beta$*  kann ein normales Wachstum der Hefezellen unabhängig von dem Vorkommen der Suppressormutation gewährleisten. Auf FOA-Platten ergaben alle kompletten Tetraden aus der Kreuzung vom Stamm MY1802 und MY1781 ein 2:2 Verhältnis bezüglich der Wachstumsrate (ein Beispiel Tetrade ist in Abb. 13B gezeigt). Dies bedeutet zugleich, daß der Suppressorstamm MY1802 eine Punktmutation im Genom besitzt.

Zusammenfassend wurde hier ein Suppressor identifiziert, der eine Punktmutation im Genom aufweist, welche zu einem Kälte-sensitiven Phänotyp bei 16°C führt.



**Abb. 13:** Bestimmung der Anzahl von Mutationen im Suppressor MY1802. **(A)** Tetradenanalyse des diploiden Stamms aus der Kreuzung vom Stamm MY1781 und MY1802. Beide Stämme haben genomisches  $\gamma\text{NC2}\beta$  deletiert und tragen zusätzlich eine Kopie von  $\text{NC2}\beta$  auf einem  $\text{URA3}$ -Plasmid. Die vier Sporen (S1-S4) einer Tetrade (T1-T7) unterscheiden sich in der Wachstumsrate. Sporen, die kein  $\text{NC2}$  besitzen, können nicht wachsen (S4 aus T1; S1 und S2 aus T7). **(B)** Der Suppressor MY1802 hat eine Punktmutation auf dem Chromosom. Die vier Sporen einer Tetrade (S1 bis S4) wurden auf einer 5-FOA-Platte nebeneinander ausgestrichen und bei  $30^\circ\text{C}$  für 3-4 Tagen inkubiert. Das Verhältnis von Sporen mit schneller Wachstumsrate (S2 und S4, Suppressormutation anwesend) zu denen mit langsamer Wachstumsrate (S1 und S3, Suppressormutation abwesend) ist 2:2.

#### 4.5.2. Die Punktmutation des Suppressor-Stammes lokalisiert in *Toa1*

Zur Identifikation der Punktmutation in dem Suppressor mit Kälte-sensitivem Phänotyp wurde der Suppressor-Stamm MY1802 mit seinem Wildtyp-Elternstamm MY4 (Tabelle in Kapitel 2.9) gekreuzt. Die diploiden Zellen wurden zur Sporulation induziert, und die Tetraden analysiert. Der Stamm MY4 trägt einen mutierten Genlokus für *his3*, der durch das *TRP1*-Gen ersetzt war (*his3::TRP1*). Da der Suppressor MY1802 den Genotyp  $\text{HIS3}^+ \text{trp1}^-$  aufwies, war es zu erwarten, daß zwei Sporen einer Tetrade den Genotyp  $\text{HIS3}^+ \text{trp1}^-$  bekommen und zwei  $\text{his3}^- \text{TRP1}^+$  besitzen. Insgesamt wurden 32 Tetraden untersucht. Die Ergebnisse zeigten, daß mit wenigen Ausnahmen (3 von 32 Tetraden) alle Tochterzellen, die die Suppressormutation besaßen, gleichzeitig *HIS3*-positiv waren. Die Erklärung dafür könnte sein, daß der mutierte Lokus des Suppressors sich in unmittelbarer Nähe des *HIS3*-Gens befindet. Das *HIS3*-Gen befindet sich auf dem Hefe-Chromosom XV. Etwa 20 kb entfernt davon liegt das *TOA1*-Gen. Das *TOA1*-Gen codiert für die große Untereinheit von Hefe-TFIIA (im Folgenden als  $\gamma\text{TFIIA}$  bezeichnet). Das *Toa1* schien ein vielversprechender Suppressor-Kandidat zu sein, da es *in vitro* mit  $\text{NC2}$  um die Bindung an TBP kompetitiert (Goppelt *et al.*, 1996).

Um diese Theorie zu überprüfen, wurde das *TOA1*-Gen aus dem Suppressor-Stamm über PCR amplifiziert. Drei unabhängige Klone wurden isoliert und sequenziert. Alle enthielten eine einzelne

Punktmutation der Aminosäure Valin in Position 251. Der Austausch von Guanin zu Thymin ändert Valin 251 zu der ebenfalls hydrophoben Aminosäure Phenylalanin (V251F, oder *toa1-2* für das mutierte Gen).

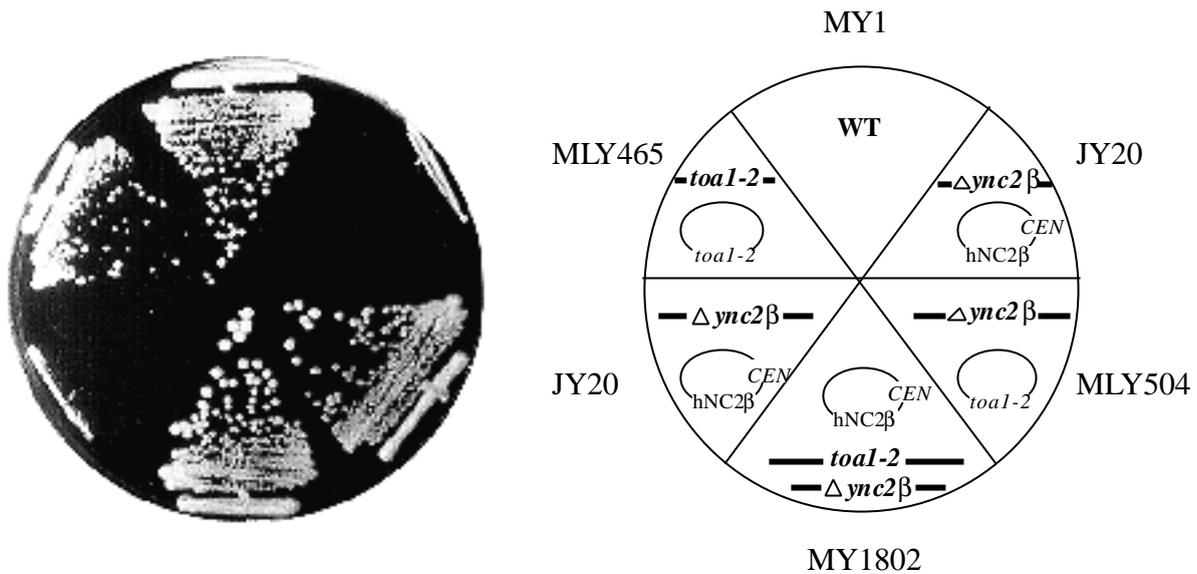
Damit war die Suppressor-Mutation im *TOA1*-Gen auf dem Chromosom XV lokalisiert.

#### 4.5.3. Die Suppressormutation ersetzt die NC2 $\beta$ -Funktion *in vivo*

NC2 $\alpha$  und NC2 $\beta$  sind essentiell für das vegetative Wachstum von Hefe (S.J.Kim *et al.*, 1997; Prelich, 1997; Kapitel 4.2.2 dieser Arbeit). Deletion eines der beiden NC2-Gene wirkt letal für die Hefe. Dies führte zu der Frage, ob NC2-Gene notwendig sind für den Suppressorstamm. Tetraden-Analyse aus der Kreuzung von Suppressorstamm MY1802 und Wildtypstamm MY4 lieferte ein interessantes Ergebnis: Sporen, die die Suppressormutation trugen aber kein NC2 $\beta$ -Gen konnte normal wachsen. Sie waren G418-resistent und hatten einen Leu<sup>-</sup>-Phänotyp (Daten nicht gezeigt). Die G418-Resistenz sprach für die genomische Disruption von NC2 $\beta$ , während der Leu<sup>-</sup>-Phänotyp auf die Abwesenheit des hNC2 $\beta$ -codierenden Plasmids mit *LEU2*-Marker zurückzuführen war.

Zur Bestätigung dieser Beobachtung wurde die *toa1-2* in einen Hefe-Expressionsvektor kloniert (pML83, Xie *et al.*, 2000) und mittels Plasmid-Austausch gegen das Wildtyp-*TOA1*-Gen ausgetauscht. Dadurch wurde der Stamm MLY465 erhalten. Der Stamm MLY465 (*Mat $\alpha$* ) wurde mit dem Hefestamm mit yNC2 $\beta$ -Defizienz (JY20, *Mata*) gekreuzt. Bei der Tetradenanalyse wurden wachsende Sporen entdeckt, deren NC2 $\beta$ -Gene deletiert waren (G418-resistent) und in denen die *TOA1*-Kopien durch mutierte *toa1*-Gene (*toa1-2*, auf pML83) ersetzt waren (MLY504). Diese Zellen verhielten sich wie der ursprüngliche Suppressorstamm (Abb. 14).

Daraus läßt sich schließen, daß die Suppressormutation (V251F) in *Toa1* das NC2 $\beta$  vollständig ersetzt.



**Abb. 14:** Die Suppressormutation ersetzt die NC2-Funktion in Hefe. Hefezellen verschiedener Stämme wurden auf YPD-Platte ausgestrichen und für 3 Tage bei 30°C inkubiert. Zellen, mit der Suppressormutation auf dem Chromosom (MY1802) oder auf dem Plasmid (MLY465) zeigen ähnliches Wachstum wie der Wildtypstamm MY1 (WT), und dies auch in Abwesenheit von NC2 $\beta$ -Gen (*nc2?*, MLY504). Zellen mit niedriger NC2 $\beta$ -Konzentration (JY20) wachsen extrem langsam. Genetische Zusammensetzung verschiedener Stämme ist schematisch dargestellt. Die Chromosomen sind durch Linien und Plasmide durch Kreise symbolisiert.

#### 4.5.4. Die Suppressormutation ersetzt gleichzeitig NC2 $\alpha$ und NC2 $\beta$ in Hefe

NC2 ist ein Dimer-Komplex aus NC2 $\alpha$ - und NC2 $\beta$ -Untereinheiten (Goppelt *et al.*, 1996). Es gab aber auch Berichte über unabhängige Funktionen von NC2 $\beta$  (S.J.Kim *et al.*, 1997). Es stellte sich hier die Frage, ob die Suppressormutation V251F (*toa1-2*) auch die NC2 $\alpha$ -Funktion beeinflusst. Eine Antwort darauf lieferte die Tetradenanalyse des diploiden Stammes aus der Kreuzung vom Suppressorstamm MY1870 mit MY1784 (Tabelle in Kapitel 2.9), welcher die genomische Kopie von NC2 $\alpha$  deletiert hat. In der Tat konnten Ura<sup>-</sup> (NC2 $\alpha$  fehlt) Kälte-sensitive Sporen (in Anwesenheit der Suppressormutation) erhalten werden (MY1903).

Dieses Resultat ließ den Schluß zu, daß in Anwesenheit der Suppressormutation *toa1-2*, sowohl das NC2 $\beta$ - als auch das NC2 $\alpha$ -Gen nicht mehr für das normale Hefewachstum benötigt werden. Es deutet zugleich auf eine Funktionsabhängigkeit der beiden NC2-Untereinheiten *in vivo* hin.

#### 4.6. Die Punktmutation des Suppressors liegt auf der Dimerisierungsoberfläche von $\gamma$ TFIIA

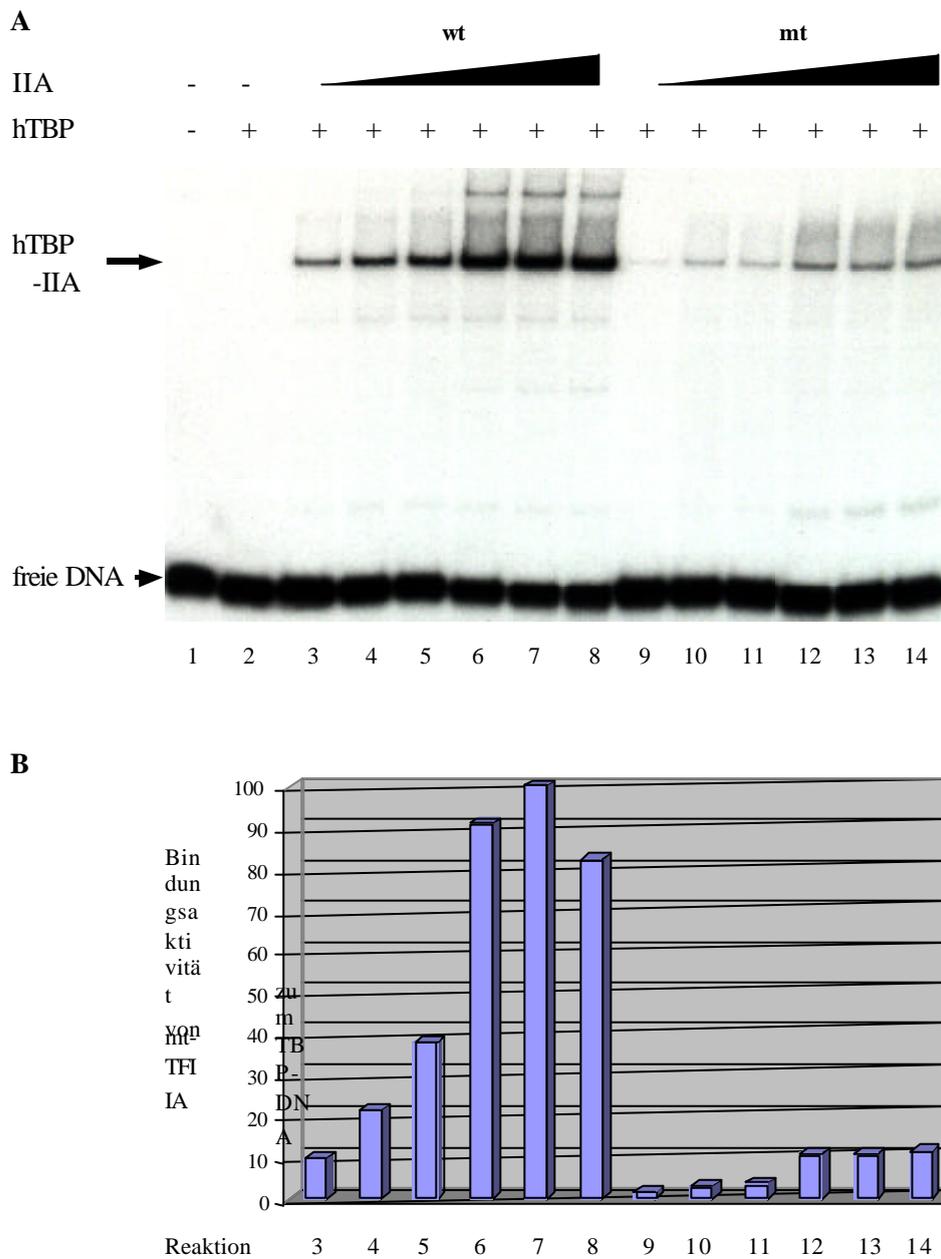
Der Hefe-Transkriptionsfaktor IIA ( $\gamma$ TFIIA) ist zusammengesetzt aus zwei Untereinheiten, Toa1 und Toa2, welche aus 286 Aminosäuren bzw. 122 Aminosäuren besteht. Beide Untereinheiten sind essentiell für das vegetative Wachstum von Hefe und erforderlich für die Transaktivierung und Komplexbildung mit TBP und DNA *in vitro* (Ranish and Hahn, 1991; Ranish *et al.*, 1992). Die funktionellen Domänen von  $\gamma$ TFIIA sind definiert worden (Kang *et al.*, 1995). In Toa1 werden sie in den konservierten N- und C-terminalen Regionen festgelegt, während der zentrale nichtkonservierte Bereich, der fast 60% des gesamten Proteins ausmacht, entbehrlich ist. Für die Dimerisierung zwischen Toa1 und Toa2 wird ein großer Teil der konservierten Regionen beider Untereinheiten benötigt. In Toa1 sind sie die Aminosäuren 1-54 und 241-286, in Toa2 die Aminosäuren 1-92 und 101-112. Es wird ein kompakter Komplex ausgebildet, der durch großflächige Wechselwirkungen stabilisiert wird.

Die Röntgenkristallstruktur von  $\gamma$ TFIIA im Komplex mit  $\gamma$ TBP und DNA wurde aufgeklärt (Geiger *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 1996). Dies ermöglichte die Bestimmung der Lage der Toa1-Mutation vom Suppressor im ternären Komplex. Das Val251 liegt auf der Dimerisierungsoberfläche von Toa1 (Abb. 15B), in unmittelbarer Nähe der TBP- und DNA-Interaktionsdomäne (Abb. 15A). Diese Beobachtung war der Ausgangspunkt für eine eingehende biochemische Untersuchung der Suppressor-Mutante in Toa1.

#### 4.7.2 Die Toa1-Mutante weist Defekte in der TBP-DNA Komplexbildung vor

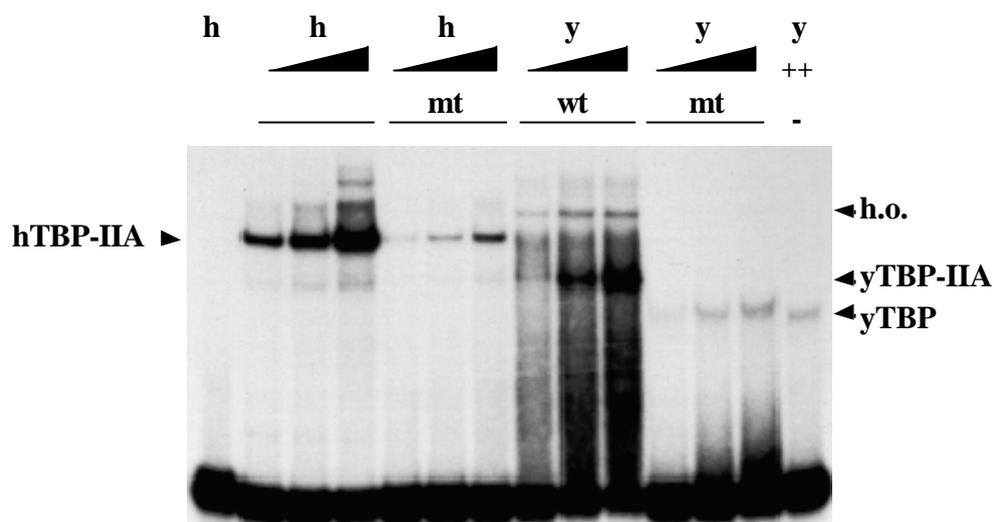
Val251 von Toa1 befindet sich in unmittelbarer Nähe der DNA-Bindungs- und TBP-Interaktionsoberfläche (Abb. 15A). Der hydrophobe Austausch von Valin zu Phenylalanin in der Suppressor-Mutante könnte daher möglicherweise die Formation des ternären Komplexes auf der DNA beeinflussen.

Um diese Hypothese zu testen, wurden Komplexbildungen von  $\gamma$ TFIIA mit TBP und DNA in Gelshift-Experimente untersucht. Als DNA diente ein HIV-Core-Promotor-Fragment. Zunächst wurde bei konstanter Menge hTBP, die mt- und wt- $\gamma$ TFIIA titriert. Im Vergleich zu wt- $\gamma$ TFIIA bildete mt- $\gamma$ TFIIA weniger Protein-DNA-Komplexe aus und dies auch bei sättigenden Bedingungen (Abb. 17, vergleiche Spuren 3 - 8 mit Spuren 9 - 14). Dieser Effekt war über einen weiten Konzentrationsbereich des  $\gamma$ TFIIA von 1 ng bis 50 ng, unabhängig von der TBP-Konzentration zu sehen (Abb. 18, vergleiche Spuren 2 - 4 mit Spuren 5 - 7). Auch die DNA-Konzentration beeinflusst die Komplexbildung von mt- $\gamma$ TFIIA nicht (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 17:** Effekte der Suppressormutation auf die Komplexbildung von yTFIIA mit TBP und DNA. In Gelshift-Experimenten wurden rekombinantes gereinigtes hTBP, Wildtyp (wt)- und Mutante (mt)-yTFIIA eingesetzt. **(A)** Bei einem Überschuß von hTBP (30 ng) wurden wt- und mt-yTFIIA von 1, 2.5, 10, 25, 37.5 bis zu 50 ng titriert. **(B)** Quantitative Darstellung der Komplex-Konzentration aus (A).

Da die Suppressormutation aus Hefe isoliert worden war, stellte sich die Frage, ob die *Toa1*-Mutation sich in Gegenwart von  $\gamma$ TBP ähnlich verhält. Bindungsexperimente mit  $\gamma$ TBP lieferten ähnliche aber nicht identische Ergebnisse. Unter den gewählten Bedingungen bindete  $\gamma$ TBP allein an den Promotor (Abb. 18, Spur 16).  $\gamma$ TFIIA interagiert mit TBP-DNA und bildete Komplexe aus, die geringere Mobilität hatten als das Promotor-Fragment (Abb. 18, vergleiche Spuren 8-10 mit Spur 14). TBP- $\gamma$ TFIIA-Komplexe waren nicht detektierbar wenn *mt*- $\gamma$ TFIIA eingesetzt wurde (Abb. 18, vergleiche Spuren 8-10 mit Spuren 11-13).



**Abb. 18:** Vergleich von humanen und Hefe-TBP (hTBP,  $\gamma$ TBP) im Gelshift-Experiment. Bei einer konstanten Menge (2.5 ng) an *wt*- oder *mt*- $\gamma$ TFIIA wurden 5, 10 oder 20 ng von hTBP (h) oder  $\gamma$ TBP (y) eingesetzt.  $\gamma$ TBP ("++", 10 ng) bindet ohne  $\gamma$ TFIIA an die Promotor-DNA (Spur 14); *wt*- $\gamma$ TFIIA bildet mit  $\gamma$ TBP Komplex auf DNA ( $\gamma$ TBP-DNA, Spur 8-10); Komplexe aus *mt*- $\gamma$ TFIIA und  $\gamma$ TBP (Spur 11-13) sind nicht vorhanden. Der  $\gamma$ TFIIA-TBP-DNA Komplex höherer Ordnung (h.o.) entsteht durch Bindung eines zweiten *wt*- $\gamma$ TFIIA-TBP-Komplexes an die DNA.

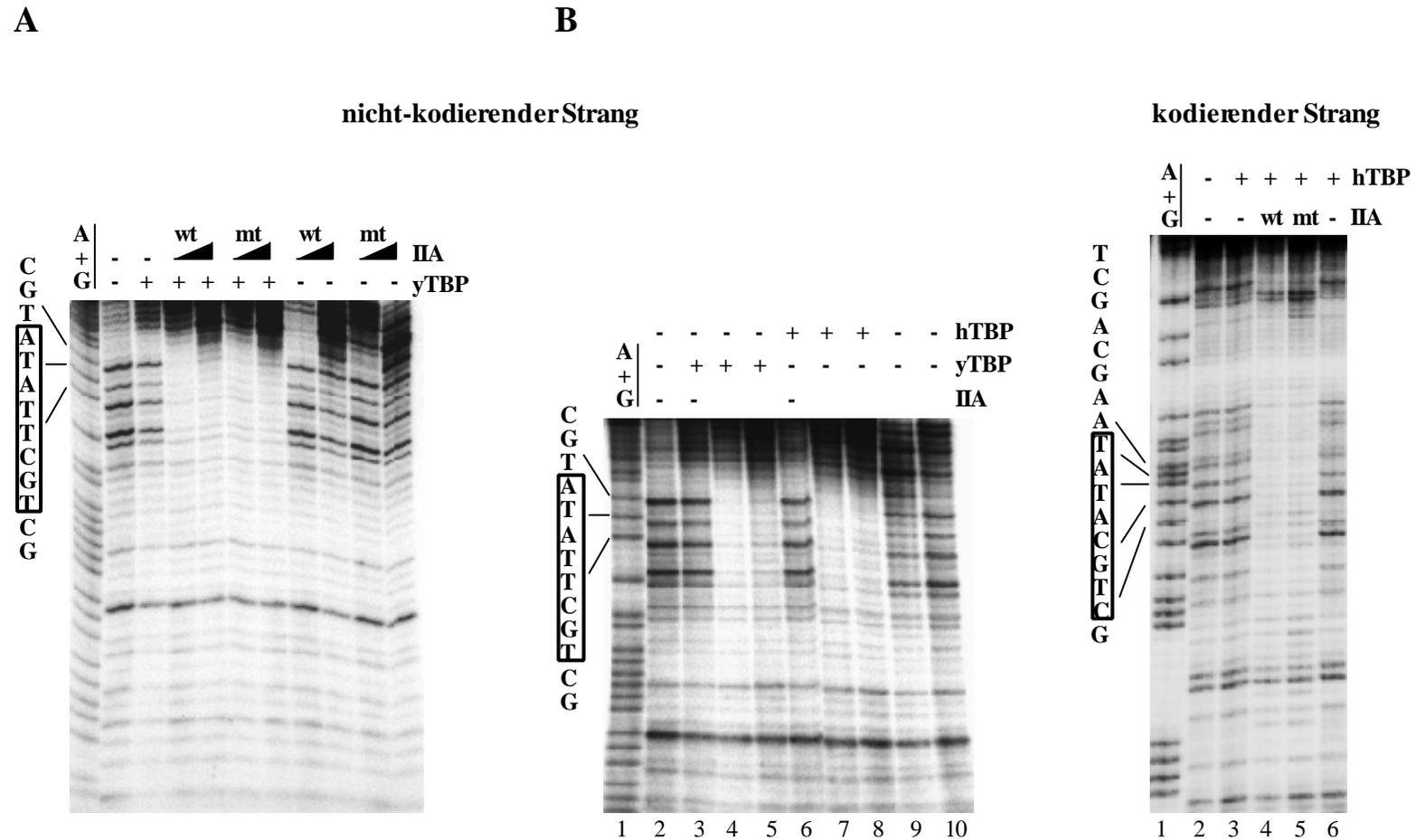
V251F erzeugt danach einen spezifischen Defekt in der ternären Komplex-Bildung mit TBP auf Promotor. Unterschiede waren auch bei sättigenden Konzentrationen von  $\gamma$ TFIIA sichtbar, was auf einen komplizierten Prozeß im Gegensatz zu einem simple Gleichgewicht zweier Partner schließen läßt.

### 4.7.3. Die Suppressor-Mutante unterstützt die TBP-Bindung an die TATA-Box

Der Defekt von mt-yTFIIA in der TFIIA-TBP-Promotor-Komplexbildung wurde bereits durch eine DNA-Bindungsanalyse demonstriert (Kapitel 4.7.2). Diese Ergebnisse sollten in DNase I-Footprinting-Experimenten überprüft werden. In diesen Experimenten werden DNA-Bereiche, an die Protein gebunden haben, vor Hydrolyse durch DNase I geschützt, und im denaturierenden Polyacrylamidgel als "Fenster" sichtbar gemacht.

Unter Bedingungen, bei denen yTBP an das Promotor-Fragment in Gelshift-Experiment bindet, war auf dem nicht-codierenden Strang der HIV-1 Promotor-DNA kein geschützter Bereich detektierbar (Abb. 19A, Spur 3 versus Spur 2), stattdessen deutliche Abnahme der Intensität im 5'-Bereich der TATA-Box (Abb. 19A, vergleiche Spur 2 und Spur 3 im unteren Bereich). Nach Zugabe von wt-yTFIIA-Komplex zum Reaktionsansatz war ein kompletter Schutz um TATA-Box zu erkennen (Spur 4 und 5). Bindung an die TATA-Box erforderte TBP, wie die Kontrolle der DNase I-Reaktion mit yTFIIA zeigte (Spur 8-11). Überraschenderweise wurden unter identischen Bedingungen vergleichbare Effekte mit mt-yTFIIA beobachtet (Abb. 19A, vergleiche Spur 6, 7 mit Spur 4, 5). Sowohl der wt- als auch der mt-yTFIIA-Komplex waren in der Lage, die Bindung von TBP an die TATA-Box auf der Promotor-DNA zu unterstützen. Bei Verwendung des codierenden Strangs vom HIV-Promotor als Bindungsvorlage wurden vergleichbare Bindung an die TATA-Box gemessen (Abb. 19C).

Unterschiedliches Verhalten von TBP aus Mensch und Hefe wurden in Bezug auf die ternäre Komplex-Bildung im Gelshift-Experiment demonstriert. hTBP und yTBP wurden ebenfalls in Footprinting-Analysen verglichen (Abb. 19B). Sowohl in Gegenwart von hTBP als auch von yTBP konnte mt-yTFIIA quantitativ an TBP auf der DNA assoziieren und einem effektiven Schutz um die TATA-Box generieren (vergleiche Spur 4, 5 versus Spur 7, 8).

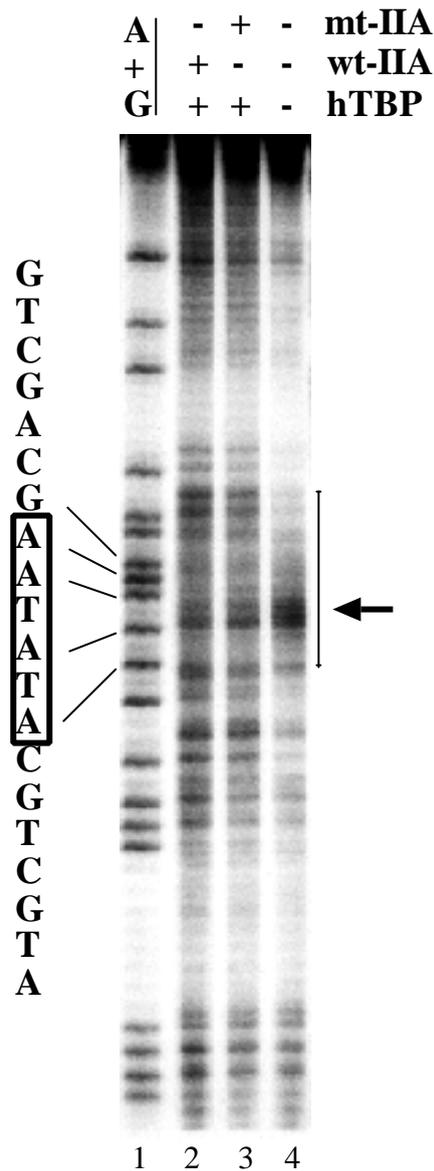


**Abb. 19:** Analyse der Suppressor-Mutante im DNase I-Footprinting-Experiment. Die minimal geschützten Regionen auf der Promotor-DNA sind an der Maxam-Gilbert A+G-Reaktion eingerahmt. Es wurde der nicht-codierende Strang eines 60 bp HIV-Promotor-Fragments (A, B) und der codierende Strang eines 90 bp HIV-Promotor-Fragments (C) verwendet. Die Reaktionen enthielten 50 ng rekombinantes hTBP oder yTBP wenn die Spuren mit "+" markiert sind. (A) Titration des yTFIIA-Proteins (IIA): 10, 25 ng rekombinantes wt- und mt-yTFIIA wurden eingesetzt. (B) Vergleich von hTBP und yTBP im DNase I-Footprint. Die Reaktion enthielt 25 ng wt- und mt-yTFIIA kombiniert mit hTBP (Spuren 4, 5) oder yTBP (Spuren 7, 8). Spuren 9, 10 zeigen Kontroll-Reaktionen ohne TBP. (C) Footprinting-Analyse von yTFIIA-TBP-Komplexen auf dem codierenden Strang eines HIV-Promotors. Der Ansatz enthielt 10 ng wt- oder mt-yTFIIA (IIA).

DNase I ist eine unspezifische Endonuklease, die sich in der kleinen Furche des DNA-Doppelstrangs einlagert und ihn hydrolytisch abbaut. Da DNase I selbst ein 30 kDa großes Protein ist, kann es bei seinem Einsatz im DNA-Footprinting zu sterischen Behinderungen mit den gleichzeitig DNA-gebundenen Proteinen kommen. Um die Auflösung des Footprinting-Experiments zu erhöhen, wurde eine "In-Gel-Footprinting"-Technik angewandt, die auf der Reaktion von Phenanthrolin-Kupfer Ionen mit DNA beruht und die sterische Zwänge nicht vorkommt. Bindungsreaktionen zwischen Proteinen und DNA wurden unter identischen Bedingungen wie im Gel-Shift durchgeführt. Protein-DNA-Komplexe und die freie DNA-Probe wurden nach der elektrophoretischen Auftrennung direkt im Gel mit Phenanthrolin-Kupfer-Lösung behandelt.  $[\text{OP}]_2\text{Cu}^+$  diffundiert in das Gel, lagert sich an den DNA-Strang an und baut ihn oxidativ ab. Da das  $[\text{OP}]_2\text{Cu}^+$ -Ion ein kleines Molekül ist, bleibt keine Region vor seinem Eingriff verschont, außer sie ist von Proteinen besetzt. Die geschnittenen DNA-Fragmente der Protein-DNA-Komplexe und der freien DNA-Probe werden dann aus dem Gel isoliert und mittels Polyacrylamidgelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen analysiert (technische Details siehe Material und Methoden).

Dennoch lieferte auch die Anwendung dieser Technik keine Unterschiede zwischen wt- und mt-yTFIIA (Abb. 20). Man beobachtet die Entstehung hypersensitiver Stellen in der Umgebung der TATA-Box (mit Klammern gekennzeichnet) in Anwesenheit von wt- bzw. mt-yTFIIA (Abb. 20, vergleiche Spur 2, 3 mit Spur 4). Sichtbar war eine minimal geschützte Region zwischen dem zweiten und vierten Nukleotid der TATA-Box (gekennzeichnet mit Pfeil, vergleiche Spur 2, 3 mit Spur 4).

Zusammenfassend zeigen diese Footprinting-Experimente, daß mt- wie auch wt-yTFIIA die TBP-Rekrutierung auf den Promotor unterstützt.



**Abb. 20:** Phenanthrolin-Kupfer-Footprint von wt- und mt-yTFIIA mit hTBP auf dem codierenden Strang eines 90 bp-HIV Core-Promotor-Fragments. 10 ng rekombinantes hTBP und 50 ng aktives wt- oder mt-yTFIIA wurden eingesetzt. Die Bindungsreaktionen und die nachfolgende Auftrennung erfolgten unter Standard-Gelshift-Bedingungen (siehe Material und Methoden). Die Bereiche mit hypersensitiven Stellen nach der Bindung von wt- und mt-yTFIIA sind durch Klammern markiert und die geschützten Regionen sind mit Pfeilen bezeichnet. Die Sequenzreaktion für die Nukleotide A und G (A+G) wurde nach einer Modifikation des Maxam-Gilbert Protokolls durchgeführt.

Dieses Resultat steht im Widerspruch zu Gelshift-Experimenten, in denen mt- und wt-yTFIIA deutliche Unterschiede zeigten. Unterschiede zwischen wt- und mt-yTFIIA waren besonders deutlich in Gegenwart von yTBP. Grundsätzlich trotz identischen Bedingungen war die Anzahl der mt-yTFIIA-TBP-DNA Komplexe im Gel-Shift wesentlich kleiner als in Footprinting Experimenten, in denen die meisten der DNA-Proben geschützt waren. Eine Erklärung dafür könnte sein, daß mt-yTFIIA zwar an TBP auf Promotor binden kann, aber weniger stabile Komplexe ausbildet. Ein großer Teil dieser instabilen Komplexe konnten die Widerstände während der langen

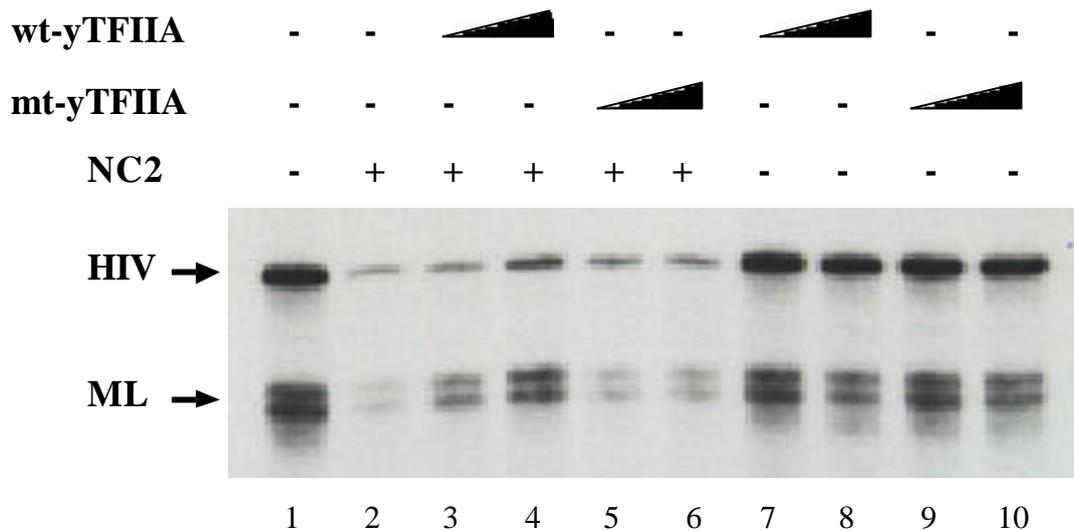
Elektrophorese (6 Stunden) beim Gel-Shift nicht überstehen und dissoziierte auseinander von DNA. Es blieb schließlich ein kleiner Anteil von Komplexen, der sich detektierbar waren. Eine Alternative Erklärung wäre, daß yTFIIA nach der Bindung an TBP-DNA eine Konformationsänderung unterzieht und von instabilen zu stabilen Komplexen isomerisiert. Reduzierte Komplex-Konzentration von mt-yTFIIA mit TBP und DNA beruht auf einen Defekt in dieser Isomerisierung.

Nimmt man alle Aspekte im Betracht, so läßt dies die Annahme zu, daß die Mutation in Toa1 den yTFIIA so modifiziert, daß er die initiale Bindung von TBP an Promotor unterstützt, aber instabile yTFIIA-TBP-DNA Komplexe ausbildet.

#### **4.7.4. Die Toa1-Mutante ist defekt in der Anti-Repressionsfunktion in der Transkription**

Eine wichtige offene Frage bestraf der Effekt der Suppressor-Mutante auf die Transkription und die Inhibition von NC2. Die vorangegangenen Studien haben gezeigt, daß TBP und TFIIA zwischen Mensch und Hefe ausgetauscht werden können (Hahn *et al.*, 1989). Da ein rekonstruiertes humanes Transkriptionssystem bereits im Arbeitskreis etabliert und ein vergleichbares Hefesystem nicht vorhanden war, wurden die yTFIIA-Komplexe im humanen *in vitro*-Transkriptionssystem getestet.

NC2 ist ein effektiver Transkriptionsrepressor in einem gereinigten rekonstruierten System, in dem fast alle generelle Faktoren (GTFs) rekombinant oder in höchstem Reinheitsgrad vorzufinden sind. NC2 ist auch aktiv in einem groben Kernextrakt, vielleicht das physiologischste *in vitro*-System. Der grobe Kernextrakt enthält aber den TFIID-Komplex, generelle Faktoren und Cofaktoren wie TFIIA (Hansen *et al.*, 1997; Brand *et al.*, 1999). Um der Suppressor zu testen mußte ein partiell gereinigtes System verwendet werden, welche kein TFIIA enthält (siehe Material und methoden). Dieses wurde mit rekombinantem TBP, NC2 und yTFIIA komplementiert. Transkribiert wurden Modellpromotoren von dem HIV Core-Promotor (HIV) und dem Adenovirus Major Late-Promotor (AdML). Transkribiert wurde eine G-freie Kassette in der Abwesenheit von GTP. NC2 wirkt hier als ein starker Repressor der basale Transkription auf beide Promotoren. (Abb. 21, Spur 2 versus Spur 1). Durch Zugabe von wt-yTFIIA zu den Reaktionsansätzen wurde die NC2-abhängige Transkriptionsrepression auf dem AdML-Promotor aufgehoben (Abb. 21, vergleiche Spur 4 mit der Kontrolle in Spur 8) und die auf dem HIV-Promotor reduziert (Spur 3, 4 versus Spur 7, 8). Im Gegensatz dazu, war der mt-yTFIIA-Komplex völlig inaktiv in der Freisetzung der NC2-Inhibition der basalen Transkription (Abb. 21, Spur 5, 6 versus Spur 9, 10). Gleiche Resultate wurden auch mit yTBP erhalten (Daten nicht gezeigt).



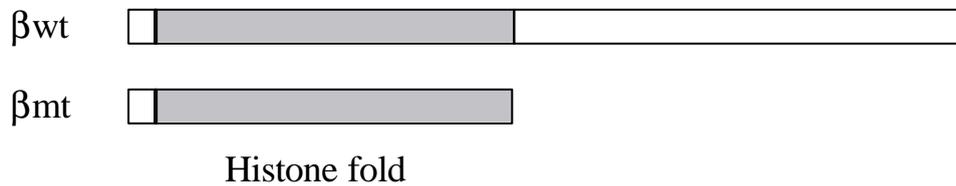
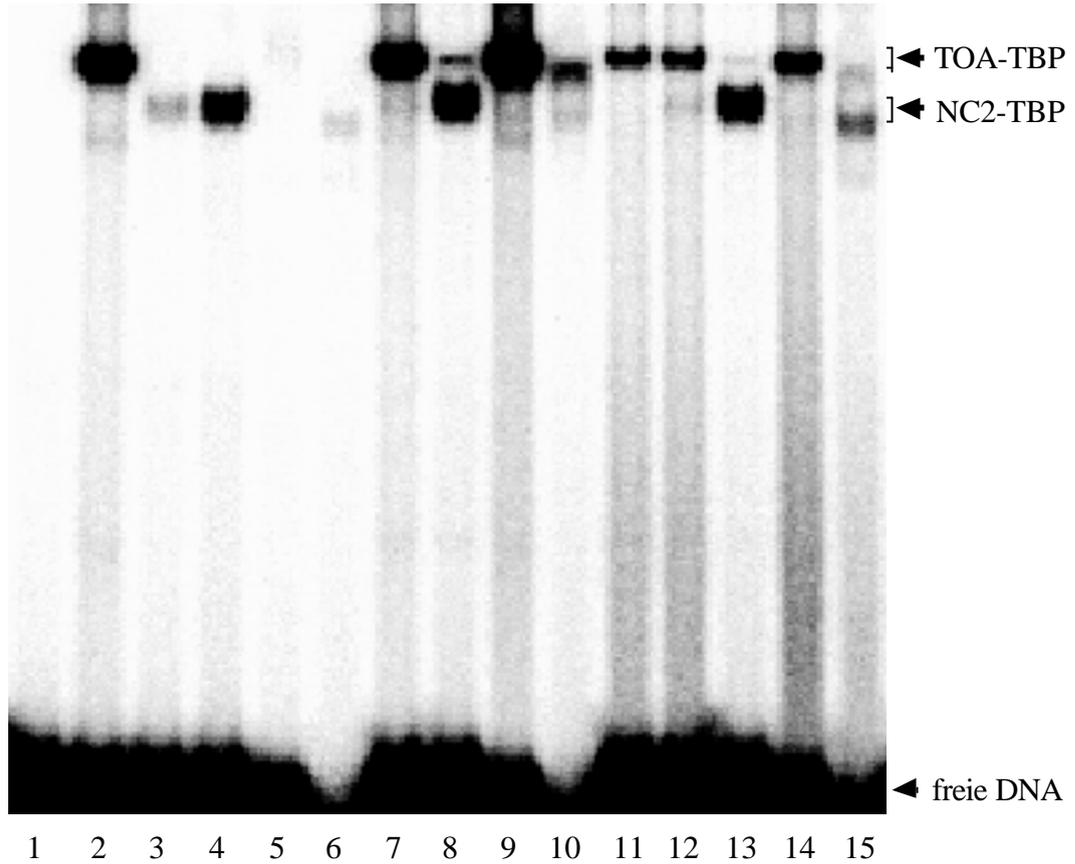
**Abb. 21:** Analyse des Suppressors in der Transkription. Wildtyp-yTFIIA (Spuren 3, 4) aber nicht der Mutant-yTFIIA (Spuren 5, 6) revertiert die Transkriptionsinhibition durch das humane NC2 *in vitro* (Spur 3, 4 versus Spur 2; Spur 5, 6 versus Spur 2). Der HIV-1- (HIV) und AdML (ML $\Delta$ )-Core-Promotor wurden in einer partiell gereinigten Transkriptionssystem transkribiert. In den Reaktionen wurden 70 ng hNC2, 7.5 ng aktives wt-yTFIIA bzw. mt-yTFIIA eingesetzt.

Es wurde angenommen, daß der molekulare Mechanismus der inhibitorischen Aktivität von NC2 auf einer Freisetzung von TFIIA und TFIIIB von am Promotorgebundenen TBP beruht (Meisterernst and Roeder, 1991; Goppelt *et al.*, 1996; Mermelstein *et al.*, 1996). Tatsächlich wurde eine direkte Konkurrenz zwischen TFIIA und NC2 in der TBP-Bindung in DNA-Bindungsexperimenten beobachtet (Meisterernst and Roeder, 1991; Goppelt *et al.*, 1996). Um zu überprüfen, ob sich die geschwächte Anti-Repressionsfunktion von mt-yTFIIA in einer geschwächten Konkurrenz in der DNA-Bindung widerspiegelt, wurde eine Konkurrenzanalyse durchgeführt. Dazu wurden wt- und mt-yTFIIA zusammen mit TBP und DNA inkubiert, und ihre Bindung an TBP wurde mit wt- bzw. einem mutierten NC2 (wt-, mt-NC2) kompetitiert (Abb. 22). Mutierte NC2 enthielt hier verkürztes NC2 $\beta$  ( $\beta$ mt), welches C-terminal von der Histone-Fold Dimerisierungsdomäne fehlt. Unter gewählten Bedingungen zeigte mt-NC2 geschwächte Komplexbildung mit TBP-DNA (Abb. 22, vergleiche Spur 5, 6 mit Spur 3, 4). Mutierte NC2 war nicht in der Lage, mit wt-yTFIIA (wt-IIA) um die TBP-Bindung zu konkurrieren (Spur 9, 10), war aber fähig, dem mt-yTFIIA (mt-IIA) entgegen zu wirken (Spur 14, 15). Diese Ergebnisse deuten auf einen Gleichgewichtszustand zwischen NC2 und TFIIA: Das Abschwächen der NC2-Funktion durch Konzentrationsminderung löst spontan eine gleichzeitige Schwächung der TFIIA-Funktion in der Zelle aus, womit die inhibitorische Wirkung von NC2 und die aktivierende Funktion von TFIIA auf die Transkription wieder ausgeglichen werden können.

Zusammengefaßt lassen die in den vorherigen Kapiteln dargestellten Experimente die Schlußfolgerung zu, daß der mt-yTFIIA-Komplex vom Suppressor im NC2-Anti-repressions-

prozess eliminiert wurde und sein Potential zur Formation eines stabilen Komplexes mit TBP auf DNA reduziert war.

mt-IIA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
wt-IIA	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
mt-NC2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
wt-NC2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



**Abb. 22:** Konkurrenz von  $\gamma$ TFIIA und NC2 bei der Komplexbildung mit TBP auf DNA. Rekombinantes und gereinigtes hTBP (10 ng), wt-, mt- $\gamma$ TFIIA (2.5 ng aktive Proteine) und wt- bzw. mt-NC2 (14, 70 ng) wurden eingesetzt. Mutiertes NC2 hat ein verkürztes NC2 $\beta$  ( $\beta$ mt), welches allein die Histone-Fold-Domäne enthält (schematisch dargestellt im unteren Teil des Bildes). mt-NC2, das schwächer an TBP-DNA bindet (vergleiche Spuren 5,6 mit 3, 4) ist nicht in der Lage mit wt- $\gamma$ TFIIA (wt-IIA) zu konkurrieren (Spuren 9,10) aber mit mt- $\gamma$ TFIIA (mt-IIA, Spur 14, 15).

#### 4.8. Gezielte Mutagenese von hNC2 und Analyse *in vitro* und *in vivo*

Die Primärstruktur von NC2 ist von Hefe bis zu Mensch hochkonserviert (diskutiert in Kapitel 4.1). Signifikante Homologie wurde zwischen NC2, den Untereinheiten des CBF-Proteins und den Histonen H2A und H2B beobachtet. Die ausgeprägteste Homologie findet sich in den N-terminalen Histone-Fold-Domänen von NC2 $\alpha$  und NC2 $\beta$  (Goppelt *et al.*, 1996; Goppelt and Meisterernst, 1996). Vorangegangene Struktur-Funktionsanalysen haben gezeigt, daß die Histone-Fold-Domänen beider NC2-Untereinheiten und eine kurze C-terminale Region von NC2 $\beta$  für die NC2-Funktion *in vitro* und *in vivo* notwendig sind (Inostroza *et al.*, 1992; Goppelt *et al.*, 1996; Yeung *et al.*, 1994, 1997; S.J.Kim *et al.*, 1997 und Kapitel 4.2.3 dieser Arbeit).

Um die Funktionseigenschaften des NC2-Repressors weiter zu untersuchen, wurden Mutagenese-Studien mit Hilfe des Plasmid-Austauschsystems in Hefe durchgeführt. Mutationen wurden sowohl in die Histone-Fold-Domänen beider Untereinheiten als auch in die essentielle C-terminale Region von hNC2 $\beta$  eingefügt. Die Mutanten, die ihre Funktion in der Hefe-Zelle verloren hatten, wurden weiterführend biochemisch charakterisiert.

##### 4.8.1. Konstruktion von Punktmutanten in NC2 $\alpha$ und NC2 $\beta$

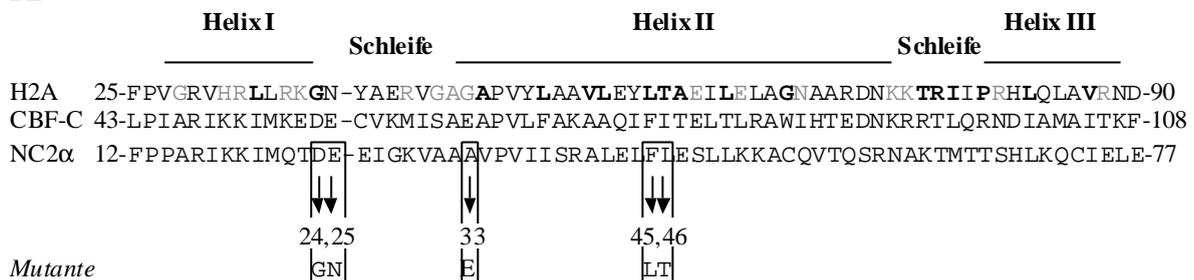
Histone-Fold-Domänen sind strukturell weitgehend charakterisiert. So wurde die Röntgenstruktur der Histone im Nukleosom aufgeklärt (Arents *et al.*, 1991; Luger *et al.*, 1997). Die Histone-Fold-Domänen aller vier Core-Histon-Proteine weisen ein hochkonserviertes Strukturmotiv auf: es besteht aus drei  $\alpha$ -Helices, die mit zwei  $\beta$ -Schleifen verbunden sind. Im H2A-H2B-Histonpaar interagieren die zwei Histone-Fold-Domänen so, daß ihre zentralen Helices sich überkreuzen und ein "Handschlag"-Motiv ausbilden (Abb. 24A, Pruss *et al.*, 1995; Luger *et al.*, 1997). Konservierung der Primärstruktur von NC2 zu Histonen deutet auf eine verwandte Struktur. So sind insbesondere die Aminosäuren in der Histone-Fold-Domänen hochkonserviert, die in der Stabilisierung des Histondimers involviert sind. Aufgrund dieser Annahme wurde die Struktur des H2A-H2B-Dimers als ein Modell für NC2 herangezogen. Eine Projektion der NC2-Untereinheiten in diese Struktur erlaubt eine Vorhersage der Funktion einzelner Aminosäuren.

In Abb. 23 werden die wichtigsten Aminosäuren-Positionen innerhalb der Histone-Fold-Domäne von H2A und H2B wiedergegeben. Die Oberflächen-Aminosäuren und die Aminosäuren, die bei der H2A-H2B-Heterodimerisierung involviert sind, werden markiert (Abb. 23, H2A, H2B). Der NC2-Repressor ist ein Heterodimer-Komplex aus NC2 $\alpha$  und NC2 $\beta$ . Beide Untereinheiten sind für die Transkriptionsrepression und für die TBP-Bindung erforderlich. Es war deshalb zunächst von Interesse, die Dimerisierungsdomäne innerhalb des NC2-Komplexes zu definieren.

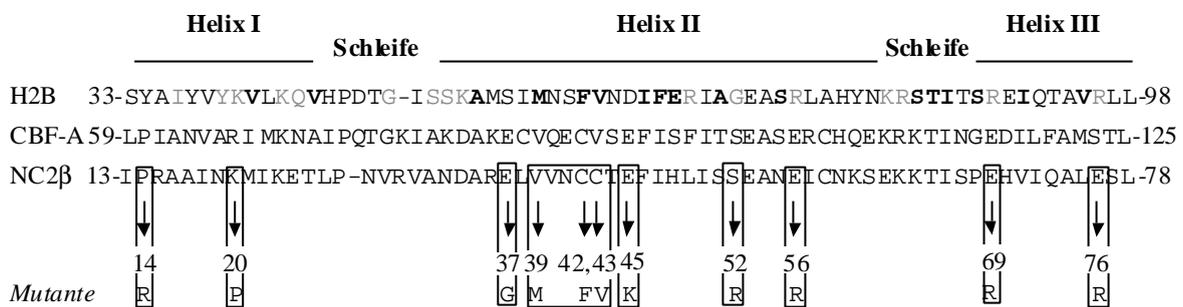
Die Interaktionen zwischen den Histone-Fold-Domänen sind hauptsächlich hydrophobe Wechselwirkungen. Wichtig für die Dimerisierung ist die zentrale  $\alpha$ -Helix (Helix II) des "Histone-Folds". Aus diesem Grund wurden die Mutanten DE24,25GN, FL45,46LT in hNC2 $\alpha$  und die Mutante VCC39,42,43MFV in hNC2 $\beta$  konstruiert (Abb. 23 und Tab. III). Die sauren Aminosäuren DE in Positionen 24 und 25 von hNC2 $\alpha$  sind bei allen Mitgliedern der NC2 $\alpha$ -Gruppe konserviert außer bei Histon H2A, wobei sie ungeladene GN sind (vgl. Abb. 3A in Einleitung). Das Glycin an dieser Stelle in H2A kontaktiert das H2B im H2A-H2B-Heterodimer (Abb. 23A). Um die Dimerisierungsoberfläche der NC2-Untereinheiten zu identifizieren wurde die DE24,25 von hNC2 $\alpha$  zu GN wie in H2A mutiert (DE24,25GN). Ebenso ist das Phenylalanin (F) in der Position 45 von hNC2 $\alpha$  bei den NC2 $\alpha$ -Mitgliedern bis auf das Histon H2A konserviert, während die Aminosäuren in der Position 46 bei allen homolog sind. Es handelt sich entweder um Leucin in hNC2 $\alpha$  oder Isoleucin in  $\gamma$ NC2 $\alpha$ , CBF-C und HAP5 (Abb. 3A). Die FL45,46 befinden sich in der Mitte der Helix II von hNC2 $\alpha$ , wo sich die zentralen Helices beider Untereinheiten übereinander kreuzen (Abb. 24B). Die Aminosäuren an diesen Positionen in H2A sind LT (für Leucin und Theronin). Sie sind wichtig für die Dimerisierung von H2A-H2B (Abb. 23). Anhand diesen Überlegungen wurde die Dimerisierungsmutante FL45,46LT von hNC2 $\alpha$  generiert.

## Humane NC2-Mutanten

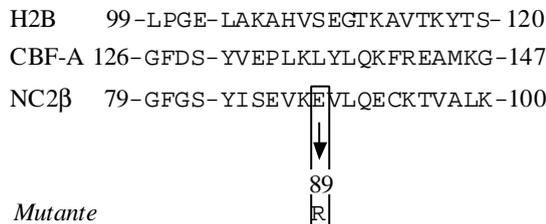
**A**



**B**



### Helix IV



**Abb. 23:** Konstruktion von Punktmutanten in hNC2 $\alpha$  (A) und hNC2 $\beta$  (B) innerhalb der essentiellen Regionen. Die Mutationsstrategie wurde anhand des Aminosäuresequenz-Vergleichs zwischen den hNC2-Untereinheiten, den Histon-Proteinen H2A, H2B und den CBF-Untereinheiten (CBF-C, -A) sowie der Kristallstruktur des H2A-H2B-Dimers in Nukleosom festgelegt. Verschiedene Mutanten sind eingerahmt. Die Positionen der drei Helices, die den Histone-Fold bilden, bzw. die vierte Helix von H2B (Helix IV) sind mit durchgezogenen Linien angegeben (nach Luger *et al.*, 1997).

Untersucht man die Lage der FL45,46 von hNC2 $\alpha$  im Strukturmodell, so wurden die hydrophoben Aminosäuren VCC39,42,43 in hNC2 $\beta$  identifiziert. VCC39,42,43 von hNC2 $\beta$  liegt exakt auf der Oberfläche gegenüber FL45,46 und beiden zeigen sich nach Innen des Proteins (Abb. 24B). Diese VCC sind zwischen den NC2 $\beta$ -Homologen teilweise konserviert (Abb. 3A). Die Aminosäuren von H2B an diesen Positionen (MFV) sind in der H2A-H2B-Dimerisierung involviert (Abb. 23A). So wurden eine weitere Dimerisierungsmutante konstruiert. VCC39,42,43 wurde entweder zu den Aminosäuren MFV wie in Histon H2B oder zu Alanin (AAA) mutiert (Tab. III).

Die schattierten Positionen innerhalb der Sequenzen von H2A und H2B in Abb. 24 bezeichnen die Aminosäuren, die an der Proteinoberfläche liegen. Oberflächen-Aminosäuren sind gute Kandidaten für die Interaktion mit Funktionspartner. Das Alanin in der Position 33 in hNC2 $\alpha$  ist eine Oberfläche-Aminosäure, die ausschließlich bei Mensch und Hefe konserviert (Abb. 3A). Es wäre deshalb möglich, daß dieses Alanin in spezifischen Funktionen von NC2, wie in der Bindung an TBP oder dem spezifischen Kontakt zur DNA eine Rolle spielt. So wurde das Alanin<sub>33</sub> zu Glutamat mutiert (A33E), wodurch gleichzeitig eine lokale negative Ladung zugefügt ist. Dagegen scheint die negative Ladung in der Position 37 von hNC2 $\beta$  wichtig zu sein, da sie in NC2 $\beta$  aus Mensch und Hefe, in CBF-A und seinem Hefe-Homolog HAP3 als Glutamat (E) und in NC2 $\beta$  von *C. elegans* als Aspartat (D) vorkommt (Abb. 3A). Um die mögliche Funktion der negativen Ladung an dieser Stelle zu untersuchen, wurde die Mutation E37G in hNC2 $\beta$  eingefügt.

Die funktionelle Domäne von TBP wurde in seiner konservierten C-terminalen Region identifiziert (Hernandez, N. 1993; Burley and Roeder, 1996). Sie besteht aus zwei sich direkt wiederholende Abfolgen, die durch eine Sequenz reichlich an basischen Aminosäuren verbunden sind (Hoffmann *et al.*, 1990). Die Röntgenstruktur-Analyse hat gezeigt, daß die hochkonservierte Domäne von TBP eine pseudosymmetrische sattelförmige Struktur ausbildet, wobei die große Konvexe Oberfläche aus Helices dieser basischen Domäne besteht (J.L.Kim *et al.*, 1993; Nikolov and Burley, 1994; Nikolov *et al.*, 1995). Die basischen Aminosäuren (Lysine) in den Helices des  $\gamma$ TBP wurden als Interaktionspartner für TFIIA, NC2 $\beta$ , CBF-A und CBF-C beschrieben (T.K.Kim *et al.*, 1995; Bellorini *et al.*, 1997). Als gute Kandidaten für die TBP-Bindung wurden daher die negativ geladenen Aminosäuren in NC2 angesehen. Die Glutamat-Reste innerhalb der essentiellen Regionen von hNC2 $\beta$  wurden paarweise ausgewählt, EE56,69 und EE76,89. Diese Glutamate-Resten sind zwischen den NC2 $\beta$ -Homologen teilweise konserviert und befinden sich auf der Proteinoberfläche (Tab. III und Abb. 24C). So wurden die sauren Aminosäuren Glutamat durch basische Arginin ersetzt (EE56,69RR und EE76,89RR), wodurch das Ladungsverhältnis dieser Region umgekehrt ist.

Der Transkriptionsfaktor CBF ist ein DNA-bindendes Heterotrimer-Protein aus CBF-A, CBF-B und CBF-C (Cousty *et al.*, 1996; Sinha *et al.*, 1995, 96; Bellorini *et al.*, 1997). Die CBF-A- und CBF-C-Untereinheit beinhalten ein Histone-Fold-ähnliches Motiv. Hinsichtlich des Histone-Fold-Motivs ist NC2 besonders eng mit CBF-Proteinen verwandt. Die Heterodimerisierung von CBF-A und CBF-C über Histone-Fold-Domänen ist die Voraussetzung für die Trimerisierung mit der dritten Untereinheit, CBF-B, und für die Bindung an DNA (J.S.Kim *et al.*, 1996; Sinha *et al.*, 1996; Bellorini *et al.*, 1997a). In diesem Zusammenhang simuliert das CBF-B die Rolle des TBP in NC2-Kontext. Ohne den dritten Partner (TBP oder CBF-B) kann weder NC2 (Goppelt *et al.*, 1996; Gadboris *et al.*, 1997; S.J.Kim *et al.*, 1997; Prelich, 1997) noch der CBF-A/-C-Dimer-Komplex (Sinha *et al.*, 1995; Bellorini *et al.*, 1997a) stabil an DNA binden.

Es konnte funktionelle Cluster innerhalb der CBF-Untereinheiten identifiziert werden (Sinha *et al.*, 1996; I.S.Kim *et al.*, 1996). So wurden zwei Punktmutanten (E92, S99) in der konservierten Region des CBF-A (homolog zu NC2 $\beta$ ) beschrieben, die intakte CBF-A/-C-Dimer ausbildeten, waren aber nicht in der Lage an CBF-B (äquivalent zu TBP für NC2) und DNA zu binden. Die Aminosäuren dieser Position sind zwischen den CBF-A und NC2 $\beta$  konserviert und befinden sich auf der Proteinoberfläche (Abb. 23B und Abb. 24C). So wurden zwei hNC2 $\beta$ -Mutanten (E45K und S52R) zur Analyse der TBP- und DNA-Bindung von NC2 konstruiert (Abb. 24 und Tab. III).

Eine weitere Mutante P60R wurde in NC2 $\beta$ -Homolog CBF-A charakterisiert (Sinha *et al.*, 1996). Die CBF-A-P60R zeigte intakte Funktion in der Komplexbildung mit CBF-C- und CBF-B, verlor aber ihre Aktivität in der DNA-Bindung. Dieses Prolin ist in allen Mitgliedern des NC2 $\beta$  konserviert. So wurde das Prolin in der Position 14 von hNC2 $\beta$  zu Arginin mutiert, wodurch eine Kandidat für die DNA-Bindung von NC2 entstand (P14R) (Tab. III). Aus gleicher Überlegung wurde die Mutante K20P in hNC2 $\beta$  (homolog zu R66P von CBF-A) konstruiert.

#### **4.8.2. Untersuchung der NC2-Punktmutanten in Hefe**

Die NC2-Punktmutanten wurden mittels des Mutagenese-Verfahrens nach Kunkel (Kapitel 3.4.17.2 in Material und Methoden) konstruiert und in Hefe-Expressionsvektoren kloniert. Die Plasmide dieser NC2-Mutanten wurden jeweils zusammen mit denen ihrer Wildtyp-Dimerisierungspartner in MY1791 co-transformiert. Die Transformanten wurden auf FOA-haltigem Medium angezogen, um auf die Zellen zu selektionieren, die die Wildtyp-Kopien von  $\gamma$ NC2 verloren hatten. Die Effekte der Mutationen für NC2 *in vivo* wurden anhand ihrer Auswirkungen auf das Hefewachstum gemessen. Die Ergebnisse sind in Tab. III zusammengefaßt.

	Mutante	konserviert in			mutiert zu	Funktion in		Hefe-Wachstum
		y	CBF	H2A(B)		Histon	CBF	
hNC2 $\alpha$	DE24,25GN	+			H2A	Dimerisierung		-
	A33E	+			CBF-C	Oberfläche		-
	FL45,46LT	+	+		H2A	Dimerisierung		-
hNC2 $\beta$	P14R	+	+		+Ladung zugefügt		DNA-Bindung	+
	K20P	+	+	+	ungeladen	Oberfläche	DNA-Bindung	+
	E37G	+	+		H2B	Oberfläche		+
	E45K	+	+		Ladung von - zu +	Oberfläche	DNA-, CBF-A/B-Bindung	-
	S52R	+	+		+Ladung zugefügt	Oberfläche	DNA-, CBF-A/B-Bindung	-
	EE56,69RR	+	+		Ladung von - zu +	Oberfläche		-
	EE76,89RR	+	+		Ladung von - zu +	Oberfläche		-
	VCC39,42,43 MFV	+	+		H2B	Dimerisierung		+
	VCC39,42,43 AAA	+	+		Alanin	Dimerisierung		+

Tab. III: Konstruktion und *in vivo*-Charakterisierung der Punktmutanten des humanen NC2 $\alpha$  und NC2 $\beta$ . Die Bezeichnungen der NC2-Mutanten sind in Abb. 23 dargestellt. Die Konservierung der mutierten Positionen zwischen NC2-Untereinheiten aus Mensch und Hefe, den Histonen H2A und H2B sowie den CBF-Proteinen sind mit "+" angegeben. Die Funktionen der äquivalenten Aminosäuren mutierter Positionen in Histonen bzw. CBF-Proteinen sind zusammengefaßt. Die Auswirkungen der Punktmutanten auf das Hefewachstum werden mit "+" (Wachstum) oder "-" (Tot) angegeben.

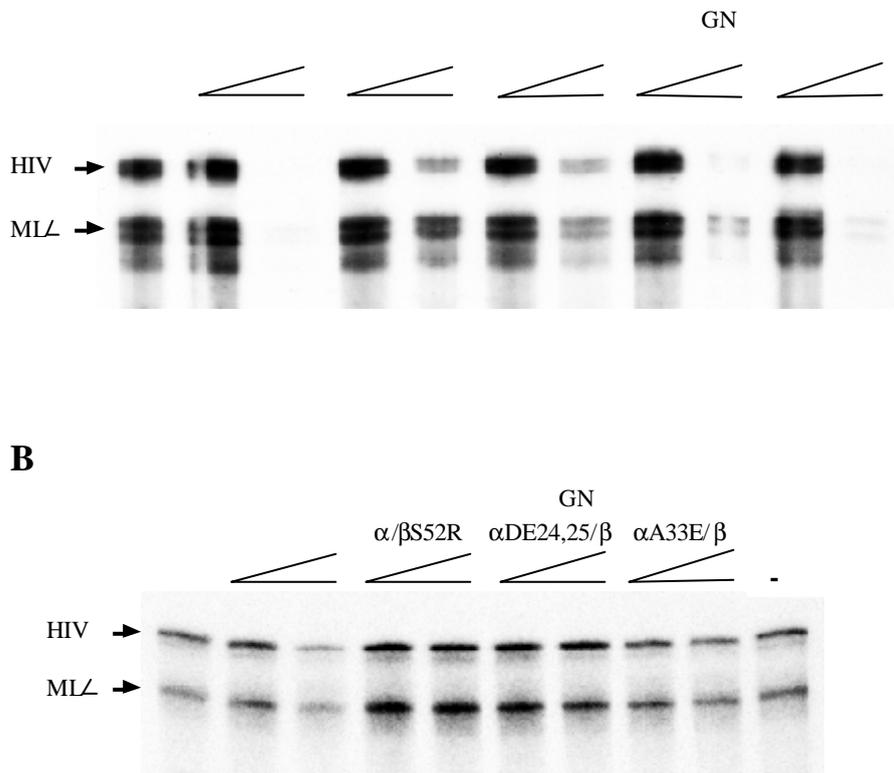
### 4.8.3. *In vitro*-Charakterisierung der NC2-Mutanten

Die NC2-Mutanten  $\alpha$ A33E,  $\alpha$ DE24,25GN,  $\alpha$ FL45,46LT und  $\beta$ E45K,  $\beta$ S52R,  $\beta$ EE56,69RR und  $\beta$ EE76,89RR zeigten vollständige Verluste in ihrer Funktionen *in vivo*. Um die molekulare Ursache dieser fehlenden Funktionen festzustellen, wurden sie weiterhin in biochemischen Untersuchungen eingesetzt. Rekombinante Proteine dieser Mutanten wurden in *E. coli* exprimiert und nativ gereinigt (siehe Material und Methoden).

#### 4.8.3.1. Analyse der NC2-Punktmutanten in der Transkription

Die NC2-Punktmutanten wurden in der *in vitro*-Transkription getestet. Die Transkriptionsreaktion wurde zunächst in einem gereinigten System durchgeführt. Dieses

System wurde mit rekombinanten und gereinigten TBP und TFIIB sowie den restlichen Faktoren aus hochgereinigter Phosphocellulose 0.5 M KCl-Fraktion von HeLa-Kernextrakten rekonstruiert. Analysiert wurde die basale Transkription des HIV- und AdML-Promotors. Die Transkription beider Promotoren wurde bei hoher Konzentration an Wildtyp-NC2 vollständig reprimiert (Abb. 25A, Spur 3 versus Spur 1). Einige Mutanten verloren teilweise ihre Aktivität in der Transkriptionsrepression (Abb. 25A, Spur 5, 7, 9 versus Spur 1). Die Mutanten  $\alpha$ A33E,  $\beta$ EE56,69RR und  $\beta$ EE76,89RR zeigten keinen Verlust ihrer Repressorfunktion (Abb. 25A, Spur 11 versus Spur 1 und Daten nicht gezeigt). Auch die Transkriptionsanalyse mit einem teilweise gereinigten, physiologischeren System aus Phosphocellulose-Fractionen von humanen Kernextrakten lieferte ähnliche Ergebnisse (Abb. 25B, Spur 3, 5, 7 und 9 versus Spur 1 und 10).



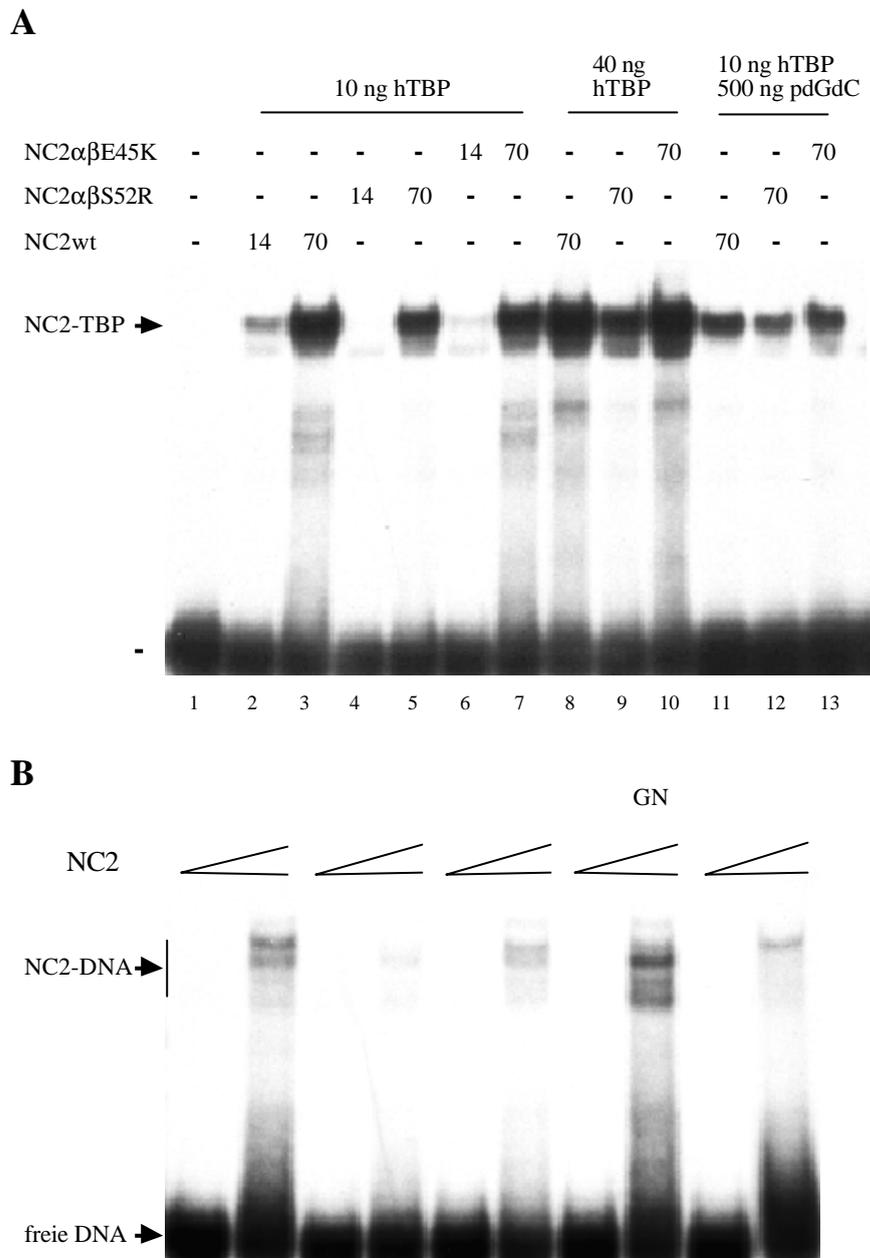
**Abb. 25:** Analyse der NC2-Punktmutanten in der *in vitro*-Transkription. Die Abkürzungen über den einzelnen Spuren stehen für die Kombinationen von NC2 $\alpha$ - und NC2 $\beta$ -Untereinheiten ( $\alpha/\beta$ ). Es wurden 14 und 70 ng rekombinante und gereinigte NC2-Proteine eingesetzt. Die basale Transkription des HIV-1- (HIV) und des AdML-Promotors (ML $\Delta$ ) wurde in gereinigter (**A**) und grober Fraktion vom Kernextrakt (**B**) untersucht.

#### 4.8.3.2. Analyse der NC2-Mutanten in TBP- und DNA-Bindungsexperimenten

NC2 $\alpha$  und NC2 $\beta$  bilden stabile Komplexe mit TBP auf der DNA aus (Goppelt and Meisterernst, 1996; Goppelt *et al.*, 1996). Die NC2-Mutanten wurden in DNA-Bindungsexperimenten (EMSAs) mit einem 60 bp Oligonukleotid aus dem HIV-Promotor untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. IV zusammengefaßt.

In Abbildung 29A sind die Effekte der Mutanten  $\beta$ E45K und  $\beta$ S52R auf die ternäre Komplexbildung zusammen mit TBP und DNA dargestellt. Sowohl die Mutante  $\beta$ E45K als auch  $\beta$ S52R zeigten verminderte Aktivität bezüglich der TBP-Bindung (Abb. 26A, Spur 4-7 versus Spur 2, 3). Durch Zusatz von vierfacher Menge an TBP konnte der Defekt der Mutante  $\beta$ E45K teilweise kompensiert werden, wohingegen der Defekt von Mutante  $\beta$ S52R wenig beeinflussen ließ (vergleiche Spur 9, 10 mit Spur 8). Die Zugabe großer Mengen an unspezifischer Kompetitor-DNA (500 ng, 200-fachen Überschuß zum markierten 60 bp-Oligonukleotid) reduzierte die gesamte Anzahl von Protein-Komplexen auf der DNA zeigte aber kaum Einfluß auf die Unterschiede zwischen wt- und mt-NC2 (Abb. 26, Spur 11-13). Diese Ergebnisse der Mutanten  $\beta$ E45K und  $\beta$ S52R korrelieren gut zu denen Transkriptionsanalysen. Man kann daraus schließen, daß Defekte beider Mutanten in der Transkriptionsrepression auf Unterschiede in der ternären Komplexbildung beruhen.

NC2 bindet an DNA auch in Abwesenheit von TBP (Goppelt *et al.*, 1996). Die physiologische Bedeutung der direkten NC2-DNA-Bindung sowie die Erkennungssequenz auf der Promotor-DNA sind noch nicht aufgeklärt. Die NC2-Mutanten wurden in einem DNA-Bindungsexperiment ohne Zusatz von TBP getestet. Das Wildtyp-NC2 sowie die Mutante  $\alpha$ DE24,25 binden in Abwesenheit von TBP effektiv an die Promotor-DNA (Abb. 26B, Spur 2 und 8). Dagegen konnten die Mutanten  $\beta$ S52R,  $\beta$ E45K und  $\alpha$ A33E nicht stabil an die DNA binden (Spur 4, 6 und 10 versus Spur 2). Hier war wiederum der Effekt bei der Mutante  $\beta$ S52R am stärksten ausgeprägt (Abb. 26B, vergleiche Spur 4 mit Spur 2).



**Abb. 26:** Analyse der NC2-Mutanten in DNA-Bindungsexperimenten in Anwesenheit (A) oder Abwesenheit (B) von TBP. Der Versuchsansatz enthielt ein 60 bp markiertes HIV-Promotor-Oligonukleotid. Die Positionen des NC2-TBP-Promotor-Komplexes (NC2-TBP), des NC2-Promotor-Komplexes (NC2-DNA) und der freien DNA sind angegeben. Die Reaktionen enthielten die Standardkonzentration an NC2 oder NC2-Mutanten (14, 70 ng). (A) Die Reaktionen wurden mit unterschiedlicher Menge an hTBP (wie angegeben) durchgeführt. Die Spuren 11-13 enthielten außerdem 500 ng unspezifische DNA (pdGdC). (B) Bindungsexperiment von NC2-Mutanten in Abwesenheit von TBP.

Die Ergebnisse der Mutagenese-Studien aus den bisher beschriebenen Versuchen sind in Tab. IV zusammengefaßt. Neben dem Verlust der *in vivo*-Funktionen korrelieren die Mutanten auch in ihrer *in vitro*-Aktivität, der Transkriptionsrepression, ternären Komplexbildung mit TBP und DNA, sowie in der direkten DNA-Bindung in Abwesenheit vom TBP. Die Mutante  $\beta$ S52R erschien besonders interessant, da sie in allen Funktionen des NC2 deutlich beeinträchtigt war.

Mutante	Repression in gereinigtem System	Komplexbildung mit	
		TBP-DNA	DNA
$\alpha$ FL45,46LT	n.d.	1	n.d.
$\alpha$ DE24,25GN	1,5*	1	1
$\alpha$ A33E	1	1	5
$\beta$ E45K	2,5	2	5
$\beta$ S52R	5	5	10
$\beta$ EE56,69RR	1	1	n.d.
$\beta$ EE76,89RR	1	1	n.d.

\*Die Zahlen ergeben den Quotienten der Aktivitäten (Repression und Komplexbildung) von Wildtyp- und jeweiliger Mutante an.

**Tab. IV:** Zusammenfassung der Ergebnisse aus den *in vitro* Analysen der NC2-Punktmutanten. Die verbleibenden Aktivitäten verschiedener Mutanten sind durch Unterschiede zum wt-NC2 ausgedrückt. Die Zahlen geben den Quotienten der Funktionen (Repression oder Komplexbildung) von Wildtyp und jeweiliger Mutanten an. "n.d." steht hier für "Daten nicht vorhanden".

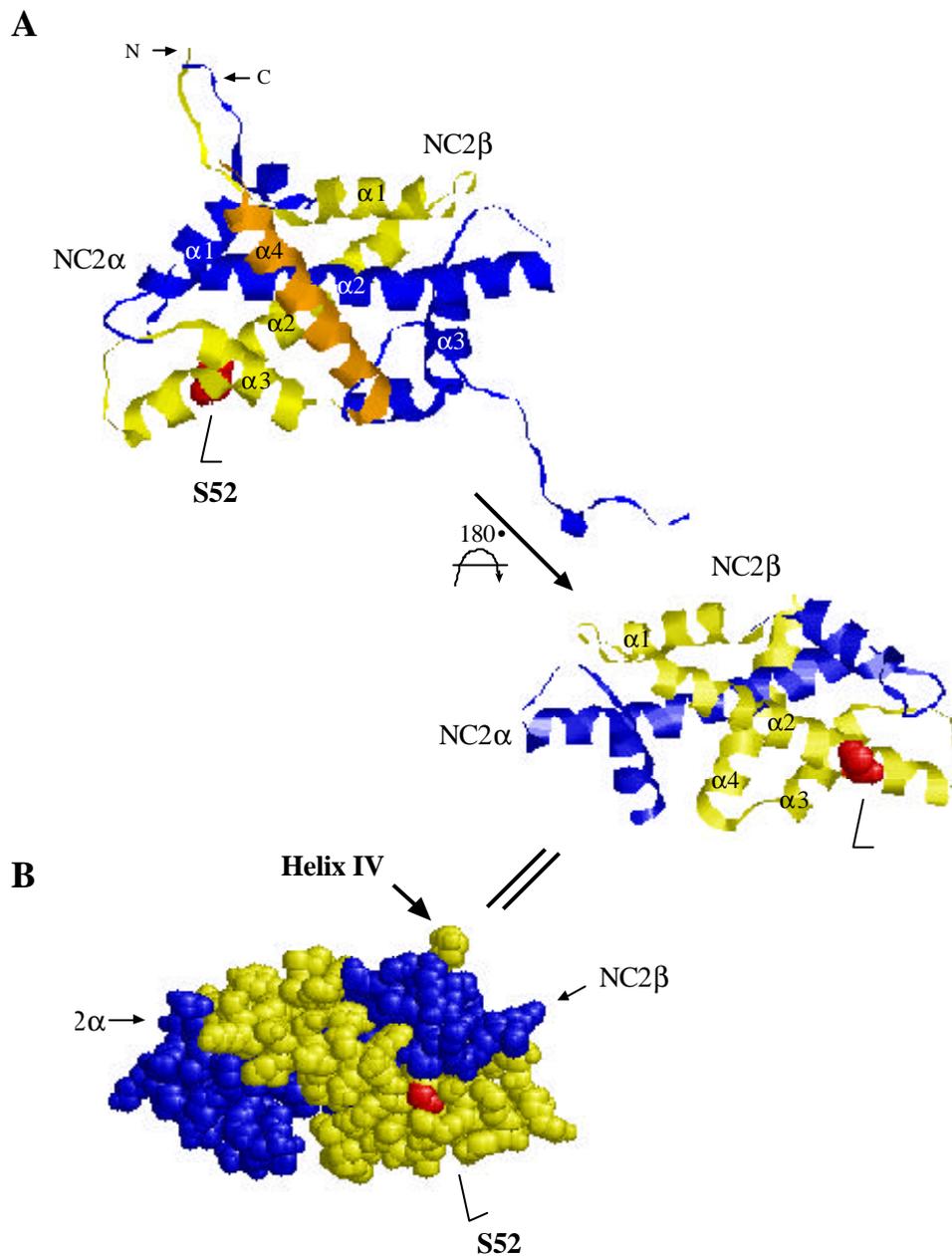
#### 4.8.4. Funktionelle Untersuchung der NC2b-Mutante S52R

Aufgrund ihrer deutlichen Defekte in allen NC2-Funktionen, wurde die Mutante  $\beta$ S52R genauer charakterisiert.

##### 4.8.4.1. Untersuchung der $\beta$ S52R-Mutante im Struktur-Modell für NC2

Die Konservierung der Primärstruktur in der Histone-Fold-Domänen von NC2 und den Histonen H2A und H2B ermöglichte eine Projektion von NC2-Punktmutationen im Strukturmodell und eine Vorhersage der Funktion einzelner Aminosäuren. Die Dimerisierung der Histone H2A und H2B basiert hauptsächlich auf hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den N-terminalen Histone-Fold-Domänen. Die C-terminale Region insbesondere die vierte Helix (Helix IV), welche direkt an das Histone-Fold-Motiv von H2B angrenzt, stabilisiert die gesamte Dimer-Struktur. Weiterhin wird das H2A-H2B-Heterodimer durch Kontakte zur DNA stabilisiert (Arents *et al.*, 1991; Luger *et al.*, 1997). Die Aminosäuren-Sequenz der Helix IV ist zwischen NC2 $\beta$  und H2B konserviert.

Das Serin52 von hNC2 $\beta$  wurde im Struktur der Histone H2A-H2B näher betrachtet. Das Ser52 liegt auf der Oberfläche von Protein, welche sich auf der Gegenseite der vierten Helix von NC2 $\beta$  befindet (Abb. 27). Man könnte spekulieren, daß Ser52 zusammen mit Glu45 auf der Proteinoberfläche liegen, die für die TBP-Interaktion wichtig ist. Dieser Aspekt und die Funktion des Ser52 in DNA-Kontakt wurden im Folgenden untersucht.



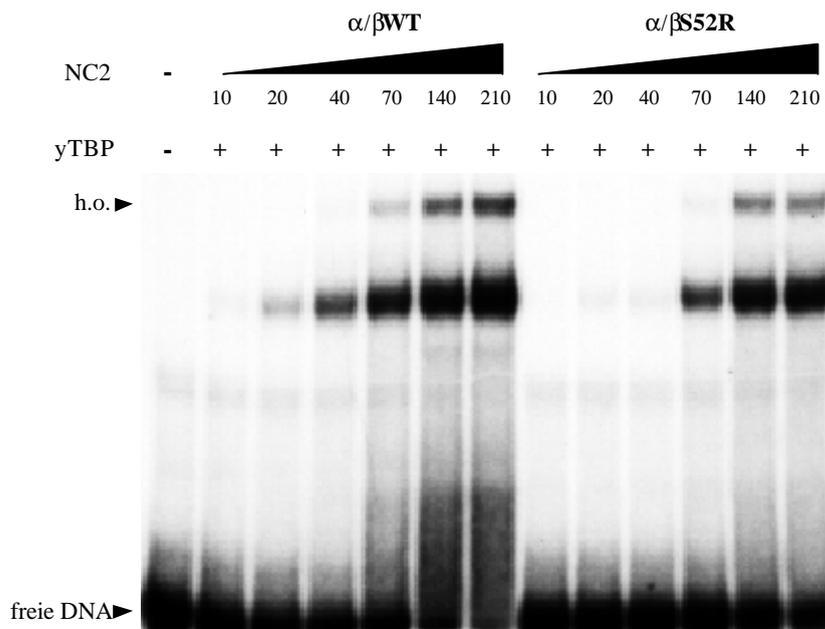
**Abb. 27:** Mögliche Lage des Serin52 von NC2 $\beta$  in Anlehnung an die H2A-H2B-Struktur. **(A)** Die Histone-Fold-Domänen von NC2 $\alpha$  (blau) und NC2 $\beta$  (gelb) interagieren sich über Kreuzung der zentralen  $\alpha$ -Helix ( $\alpha$ 2) welche jeweils von zwei kurzen Helices ( $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 3) flankiert ist. Das C-terminale Ende von NC2 $\beta$  und das N-terminale Ende von NC2 $\alpha$  sind angezeichnet. Serin52 (S52) (rot) liegt innerhalb der zentralen Helix ( $\alpha$ 2) von NC2 $\beta$  und kurz vor dem Übergang zu Helix III ( $\alpha$ 3). Die Seitenkette von S52 liegt an der Oberfläche des Proteins und befindet sich auf der Gegenseite der vierten Helix ( $\alpha$ 4) von NC2 $\beta$ . **(B)** Die große Dimerisierungsfläche zwischen NC2 $\alpha$  und NC2 $\beta$  ist in der "space fill"-Version der Struktur deutlich zu erkennen. Die Position des S52 ist in rot dargestellt.

#### 4.8.4.2. Analyse der Mutante $\beta$ S52R in der Komplexbildung auf DNA

Mutante S52R zeigte signifikante Defekte in der Komplexbildung mit TBP auf DNA (diskutiert in Kapitel 4.8.3.2). Defekte in der Komplexbildung mit TBP-DNA hatte auch die Suppressormutante V251F in Toa1 (mt-yTFIIA) aufgewiesen (Kapitel 4.7.2). Aber im Fall des mt-yTFIIA, bindete das mt-yTFIIA nicht an Hefe-TBP ( $\gamma$ TBP) und die reduzierte Konzentration an ternärem Komplex mit hTBP und DNA ließ sich nicht durch Konzentrationserhöhung der Reaktionspartner TFIIA und TBP kompensieren (Abb. 17, 21).

Um weitere Vergleiche anzustellen wurden wt- und mt-NC2 (S52R) zusammen mit rekombinantem  $\gamma$ TBP im Gelshift-Experiment untersucht. Bei konstanter Menge an  $\gamma$ TBP und DNA wurden wt- und mt-NC2 über große Konzentrationsbereiche titriert (10-210 ng). Im Unterschied zu mt-yTFIIA, bindet  $\beta$ S52R an  $\gamma$ TBP. Unterschiede zwischen wt- und  $\beta$ S52R-Mutante sind konzentrationsabhängig (Abb. 28). Eine signifikante Schwächung der ternären Komplexbildung mit mt-NC2 wurde ausschließlich bei niedrigen Proteinkonzentrationen beobachtet (Abb. 28, vergleiche Spur 8-11 mit Spur 2-5).

Dieses Resultat ließ den Schluß zu, daß die NC2-Mutante  $\beta$ S52R und die Suppressormutante V251F in Toa1 unterschiedliche Defekte in der ternären Komplexbildung mit TBP und DNA aufweisen. Der Defekt in NC2 $\beta$ S52R basiert hauptsächlich auf eine Schwächung in der TBP-Bindung eines einfachen Gleichgewichts aus NC2, TBP und DNA, während der Defekt in mt-yTFIIA auf einen komplizierteren Prozeß zurückzuführen ist.



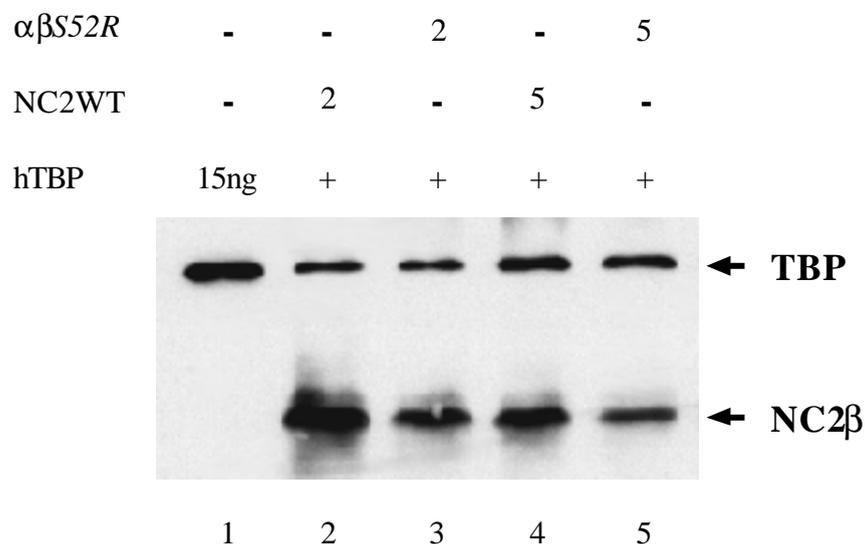
**Abb. 28:** Effekte der NC2 $\beta$ -Mutation S52R auf die Komplexbildung von NC2 mit TBP auf DNA. Im Gelshift-Experiment wurde rekombinantes gereinigtes  $\gamma$ TBP, wt-NC2 ( $\alpha/\beta$ WT) und mt-NC2 ( $\alpha/\beta$ S52R) verwendet. In Anwesenheit einer konstanten Menge an  $\gamma$ TBP (5 ng) wurden wt- und mt-NC2 von 10, 20, 40, 70, 140 bis zu 210 ng titriert. Die Positionen der ternären Komplexe (TBP-NC2), der freien DNA und der Komplexe höherer Ordnung (h.o.), die durch Bindung eines zweiten TBP-NC2 an die DNA zustande kamen, sind gekennzeichnet.

#### 4.8.4.3. Analyse der NC2 $\beta$ -Mutante S52R in Immunopräzipitation

Nachdem die NC2 $\beta$ -Mutante S52R verminderte Komplexbildung mit TBP und DNA zeigte, stellte sich die Frage, ob die direkte Interaktion zwischen TBP und NC2 betroffen war.

Um diese Frage zu beantworten, wurden Immunopräzipitationen mit monoklonalen Antikörper (hergestellt mit Fusionsprotein GST-NC2 $\alpha$  aus Ratte in der Arbeitsgruppe E. Krämmer, GSF) gegen das hNC2 $\alpha$  durchgeführt (Details siehe Material und Methoden). Es wurden gereinigtes, rekombinantes hTBP und Wildtyp-NC2 (wt) sowie die Mutante  $\beta$ S52R (mt) unter Bedingungen verglichen, in denen unterschiedliche Bindungsaktivitäten von wt- und mt-NC2 in Gelshift-Experimenten beobachtet worden waren. Die mit SDS-Puffer eluierte Proteine wurden durch SDS-PAGE analysiert und das hTBP und NC2 $\beta$  durch Antikörpern im Western-Blot nachgewiesen.

Die NC2-Mutante S52R konnte genauso wie das wt-NC2 effizient an TBP binden, sowohl bei niedriger als auch bei hoher NC2-Konzentration (Abb. 29, vergleiche Spur 2 mit Spur 3 bzw. Spur 4 mit Spur 5). Gleichzeitig wurde gezeigt, daß die NC2 $\beta$ -Mutante S52R in der Dimerisierung mit hNC2 $\alpha$  kompetent war (unterer Band, Spur 3 versus Spur 2 und Spur 5 versus Spur 4).

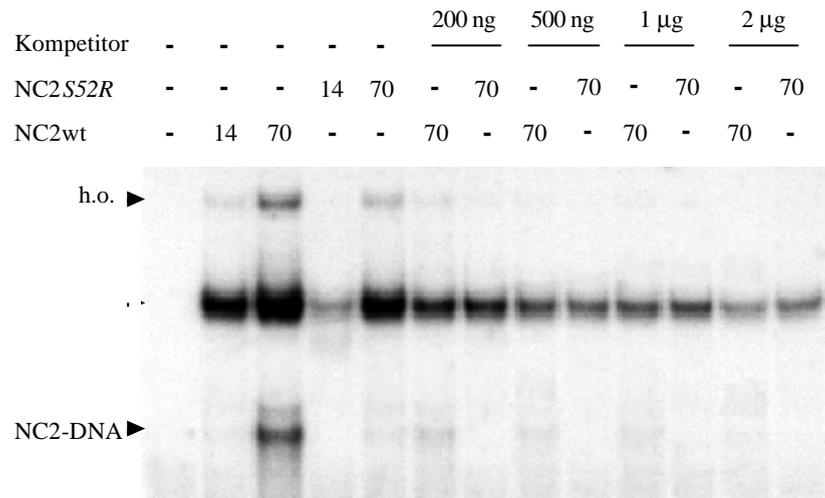


**Abb. 29:** Analyse der NC2 $\beta$  S52R-Mutante in der Immunopräzipitation. An der mit Antikörper gegen hNC2 $\alpha$  gekoppelten Protein G-Sepharose wurden rekombinantes hTBP (480 ng) und wt- ( $\alpha/\beta$ WT) bzw. mt-NC2 ( $\alpha/\beta$ S52R) (700 ng und 2,8  $\mu$ g) im 1 ml-Puffer geladen. Die gebundenen Proteine wurden mit SDS-Auftragspuffer eluiert. Nach Auftrennung in SDS-PAGE wurden hTBP und hNC2 $\beta$  im Western-Blot nachgewiesen. Die NC2  $\beta$ S52R-Mutante zeigt vergleichbare Aktivität in der Interaktion mit TBP und mit der hNC2 $\alpha$ -Untereinheit (Spur 3 versus Spur 2 und Spur 5 versus Spur 4). Spur 1 enthält 15 ng rekombinantes hTBP.

#### 4.8.4.4. Einfluß der DNA-Bindung auf die Komplexbildung von NC2-Mutante $\beta$ S52R mit TBP

NC2-TBP-DNA-Komplexe sind relativ resistent gegenüber großen Mengen an unspezifischer Kompetitor-DNA pdGdC, die eine GC-reiche Sequenz hat. Dagegen ist die direkte Interaktion zwischen NC2 und DNA durch pdGdC kompetitierbar (Goppelt *et al.*, 1996). Die mangelnde Aktivität von Mutante  $\beta$ S52R in der Bindung an TBP und DNA konnte teilweise aufgehoben werden, in dem man die NC2-Konzentration erhöhte (Abb. 28). Diese Experimenten wurden ohne Kompetitor-DNA durchgeführt. Ein erstes Anzeichen für einen möglichen Einfluß von DNA auf die Komplexbildung lieferte ein Gelshift-Experiment mit 500 ng pdGdC (Abb. 26A).

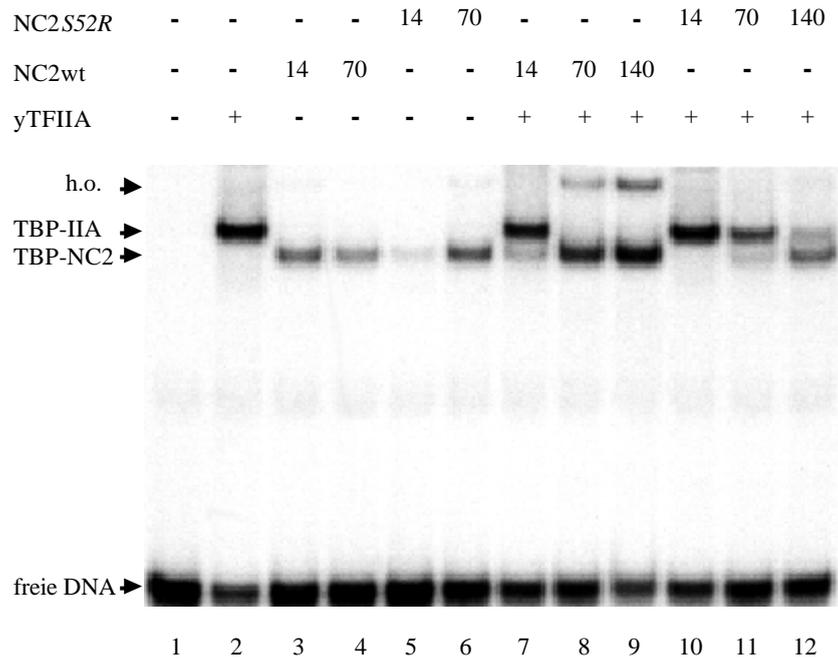
Um den Einfluß der DNA-Bindung von  $\beta$ S52R-Mutante genauer zu untersuchen, wurde der Kompetitor pdGdC im Gelshift-Experiment titriert. NC2-Konzentrationen wurden dafür innerhalb der Bereiche gewählt, in denen deutliche Unterschiede zwischen wt- und mt-NC2 in der Komplexbildung nachgewiesen worden waren (Abb. 28). Unterschiede zwischen S52R und wt-NC2 nahmen mit steigender Konzentration an pdGdC ab (Abb. 30, Spur 4, 5 versus Spur 2, 3). Bei 1  $\mu$ g Kompetitor-DNA (350-fachem Überschuß zu markierten Promotor-Fragmenten) waren keine Unterschied zu sehen (Abb. 30, Spur 10, 11). Überraschenderweise bindete mt-NC2 ( $\beta$ S52R) eher besser an TBP-DNA als wt-NC2 bei 700-fachem Überschuß von pdGdC (2  $\mu$ g). Ein möglicher Grund dafür ist die unterschiedliche Affinität von wt- und mt-NC2 zu DNA. Wildtyp-NC2, nicht aber die mt-NC2 (S52R) ist kompetent in der DNA-Bindung (Abb. 26B). In Anwesenheit großen Mengen an Kompetitor-DNA bindet sie das NC2, und diese ist weniger mit dem mt- als dem wt-NC2.



**Abb. 30:** Effekte der unspezifischen Kompetitor-DNA auf die Komplexbildung von NC2-Mutante S52R mit TBP-DNA. Die Reaktionen enthielten ein 60 bp lang markiertes HIV-Promotor-Oligonukleotid (75 fmol) und gereinigtes, rekombinantes hTBP (10 ng). Die Konzentrationen von NC2 (wenn anwesend) sind in ng angegeben. Kompetitor-DNA pdGdC wurde von 200 ng bis 2 µg titriert, was einem 70- bis 700-fachen Überschuß zum Promotor-Fragment entspricht. Die Positionen der monomeren Komplexe auf DNA (TBP-NC2) und Komplexe höherer Ordnung (h.o.) sowie Komplexe aus NC2 und DNA (NC2-DNA) sind markiert.

#### 4.8.4.5. Einfluß der bS52R-Mutation auf die Konkurrenz zwischen NC2 und TFIIA auf Promotor

NC2 reprimiert die RNA-Polymerase II Transkription durch Verhinderung der Assoziation von TFIIA und TFIIB zur basalen Transkriptionsmaschinerie (Goppelt *et al.*, 1996; Mermelstein *et al.*, 1996). Die Mutante S52R wurde auf Konkurrenz mit TFIIA überprüft. Rekombinantes  $\gamma$ TFIIA und eine vergleichbare Menge an wt- und mt-NC2 wurden eingesetzt. Die Reaktionen enthielten limitierende Mengen an TBP und DNA um möglichen Wechsel von TBP zwischen den Bindungspartner, TFIIA und NC2 zu beobachten. Wildtyp-NC2 kompetitierte effektiv mit TFIIA um die TBP-DNA-Bindung. Bei hoher Konzentration von wt-NC2 wurden die Komplexe aus TFIIA und TBP auf der DNA (TBP-IIA) komplett durch NC2-TBP-DNA (TBP-NC2) ersetzt (Abb. 31, Spur 7, 8, 9). Wie erwartet war die NC2-Mutante S52R schwächer in der Konkurrenz mit TFIIA. Auch bei hoher Konzentration von NC2 (Spur 12) konnte der TFIIA nicht vollständig von TBP entfernt werden (Abb. 31, Spur 10-12 versus Spur 7-9).



**Abb. 31:** Konkurrenz von NC2 und  $\beta$ S52R-Mutante mit TFIIA. Bindungsreaktionen enthielten HIV-Promotor-Oligonukleotid (25 fmol), rekombinanten hTBP (7,5 ng) und yTFIIA (50 ng). Verschiedene Konzentrationen an wt-(NC2wt) und mt-NC2 (NC2S52R) (Zahlen in ng) wurden eingesetzt. Die Positionen der monomeren und multimeren TBP-NC2-DNA Komplexe (TBP-NC2 und h.o.), der Komplexe von TFIIA-TBP-DNA (TBP-IIA) sowie der freien DNA sind angegeben.

Zusammengefaßt, weist die NC2-Mutante S52R Defekte in der Komplexbildung mit TBP auf DNA, insbesondere im direkten Sequenz-unspezifischen DNA-Kontakt auf. In Korrelation mit ihrer verlorenen Funktion in der Transkriptionsrepression, zeigt die Mutante  $\beta$ S52R ihre Inkompetenz in der Konkurrenz mit dem generellen Transkriptionsfaktor TFIIA.

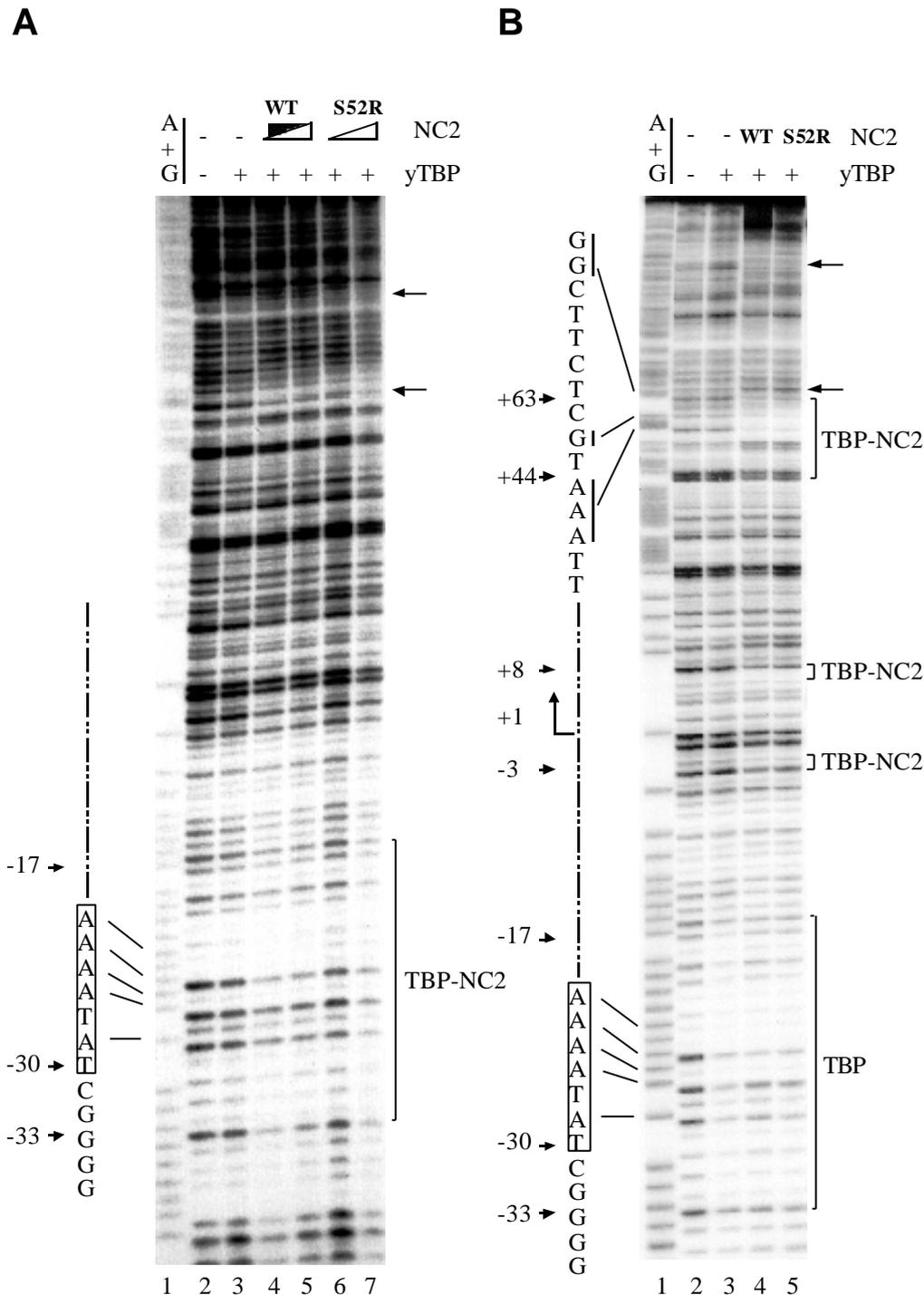
#### 4.8.4.6. DNase I Footprinting-Analyse der NC2-Mutante S52R

Frühe Arbeiten haben gezeigt, daß NC2 zusätzliche DNA-Kontakte außerhalb der TATA-Box auf Promotor induziert (Goppelt *et al.*, 1996). In DNA-Footprinting-Experimenten, schützen NC2 und TBP die TATA-Box des HIV-Promotors vor DNase I-Verdau. Gleichzeitig werden DNase I-hypersensitiven Stellen in der Umgebung der TATA-Box ausgebildet. Ein zusätzliches "Fenster" in einer Thymidin-reichen Region wurde stromabwärts der TATA-Box beobachtet (Goppelt *et al.*,

1996). Ähnliche Effekte werden ebenfalls für AdML-Promotor (AdML) beschrieben (J.Kim *et al.*, 1996).

Mutante  $\beta$ S52R wurde am Adenovirus Major Late-Promotor auf die Komplexbildung mit  $\gamma$ TBP untersucht.  $\gamma$ TBP allein ruft keinen unspezifischen leichten Schutz vor DNase I hervor (Abb. 32A, Spur 2 versus Spur 1). Durch Titration von wt-NC2 wurde allmählich die TATA-Box zwischen den Positionen -33 und -17 geschützt (Abb. 32A, Spur 4, 5 versus Spur 2). In Anwesenheit der  $\beta$ S52R-Mutante ist das Fenster auch zu sehen, allerdings erst bei höherer Konzentration (Abb. 32A, Spur 6, 7 versus Spur 4, 5). Außerdem wurde geringe Unterschiede im 3'-Bereich der TATA-Box beobachtet, ohne daß diese bisher exakt zugeordnet wurden.

Dieses Experiment wurde mit einer höheren Konzentration an wt- und mt-NC2 wiederholt. Das Resultat ist in Abb. 32B dargestellt. Hier sieht man die Bindung von TBP an die TATA-Box und somit die Generation eines einen Schutzbereiches von Position -33 bis -17 auf dem Promotor. Der Zusatz von wt-NC2 bzw. S52R-Mutante deckte zusätzliche Fenster (um -3, um +8 und von +44 bis +63) sowie eine Reihe hypersensitiver Stellen auf. Allerdings war kein Unterschied zwischen wt- und mt-NC2 festzustellen (Abb. 32B, Spur 4, 5 versus Spur 3).



**Abb. 32:** DNase I Footprinting-Analyse von TBP-NC2-Promotor Komplexen. Die mit "A+G" bezeichneten Spuren geben die Sequenzen der Promotor-Fragmente (des AdML-Promotors, auf den nicht-codierenden Strang) wieder. yTBP (30 ng) und Wildtyp- (WT) bzw. Mutante-NC2 (S52R) wurden mit Promotor-DNA inkubiert. Die eingesetzten NC2-Konzentrationen waren 400 und 550 ng. Die geschützten Regionen (eckige Klammern) im Bereich um TATA-Box (eingerahmt) sind markiert. (A) Zusammen mit TBP schützte NC2-Mutante S52R die TATA-Box-Region erst bei höherer Konzentration, während wt-NC2 auch bei niedrigerer Konzentration effektiv mit TBP an TATA-Box binden konnte. Auf dem nicht-codierenden Strang schützte NC2 zusammen mit TBP die Positionen -33 bis -17. (B) Vergleich der durch TBP und TBP-NC2 geschützten Bereiche auf AdMLP-Fragmenten. Die Bindung von TBP allein bietet einen kompletten Schutz um die TATA-Box (Spur 3 versus Spur 2). Der Zusatz von wt- bzw. mt-(S52R) NC2 induzierte einen zusätzlichen Schutz außerhalb der TATA-Box. Die TATA-Box und die spezifisch durch TBP-NC2 geschützten Positionen sind mit Klammern markiert. Die durch TBP-NC2 hervorgerufenen DNase I-hypersensitiven Stellen sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

## 5. Diskussion

---

Die Transkriptionsregulation in Eukaryonten involviert ein kompliziertes Netzwerk aus positiv- bzw. negativ-wirkenden Aktivitäten. Die Ursache hierfür liegt darin, daß eine optimale Expression der Gene in Abhängigkeit von der Entwicklung und Zelldifferenzierung sowie von Veränderungen der Umweltbedingungen aufrechterhalten werden muß. Trotz einer großen basalen Transkriptionsmaschine wird eine weitere Klasse von Transkriptionsregulatoren, den sogenannten Cofaktoren benötigt, welche eine Kommunikation zwischen den basalen Faktoren, den Aktivator-Proteinen, dem Chromatin und der DNA ermöglichen (Übersichtsartikel: Hampsey, 1998; Hampsey and Reinberg, 1999).

Viele Cofaktoren, darunter auch die RNA-Polymerase II assoziierten Vermittlerproteine, nämlich die sogenannten SRB- (Suppressor von RNA-Polymerase B) und Mediator-Komplexe, sind durch eine Kombination von biochemischen Verfahren und reverser Hefegenetik entdeckt worden (Y.J.Kim *et al.*, 1994; Koleske and Young, 1994).

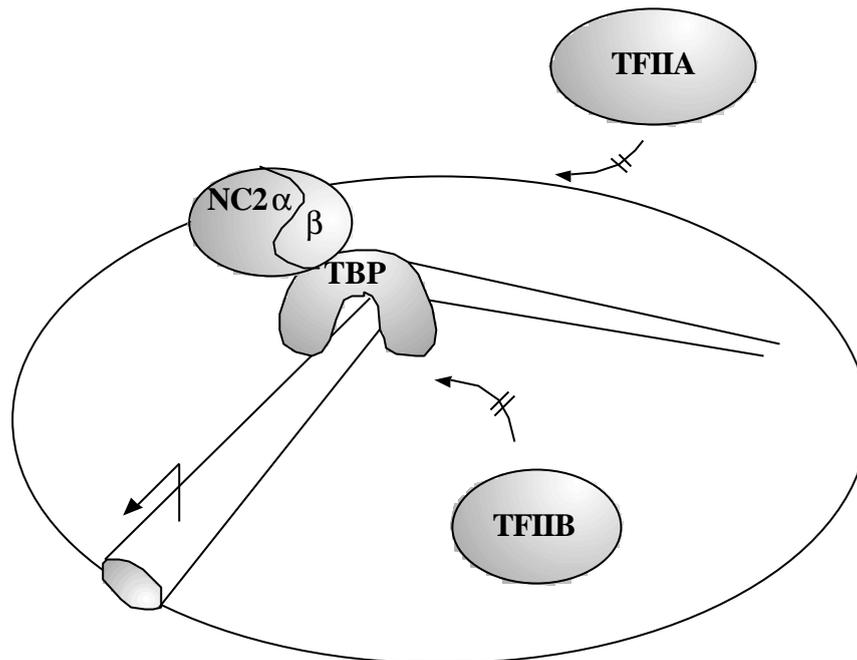
Der negative Cofaktor NC2 wurde ursprünglich als eine Aktivität aus Kernextrakten von Säugerzellen identifiziert, welche spezifisch an TBP bindet und die basale Transkription der Klasse II-Gene reprimiert (Meisterernst *et al.*, 1991; Meisterernst and Roeder, 1991). Biochemische Untersuchungen lieferten ein Modell für den molekularen Mechanismus der Transkriptionsrepression durch NC2 (Meisterernst and Roeder, 1991; Inostroza *et al.*, 1992; Goppelt *et al.*, 1996) und führten zur Klonierung der für NC2 codierenden Gene. Nach der Klonierung einer Untereinheit (NC2 $\beta$ /Dr1) von NC2 in der Arbeitsgruppe von Danny Reinberg (Inostroza *et al.*, 1992), wurde die zweite Untereinheit (NC2 $\alpha$ ) erst Jahre später isoliert und kloniert (Goppelt *et al.*, 1996). Parallel dazu wurden Hefe-NC2 $\alpha$  und -NC2 $\beta$  (yDr1) als Suppressoren einer Temperatur-sensitiven SRB4-Mutation *in vivo* identifiziert (Gadboris *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998). Da das SRB4-Gen eine essentielle Komponente des RNA-Pol II-Holoenzym codiert, die als genereller Coaktivator für die Transkription von bis zu 93% der Klasse II-Gene benötigt wird (Holstege *et al.*, 1998), kann man annehmen, daß NC2 einen globalen Corepressor der RNA-Pol II-Transkription darstellt.

## 5.1. Funktionelles Gegenspiel zwischen TFIIA und NC2

### 5.1.1. Molekularer Mechanismus von NC2

In einem genetischen Ansatz wurde der Funktionsmechanismus von NC2 *in vivo* untersucht. Es wurde eine Mutation in der großen Untereinheit von Hefe-TFIIA ( $\gamma$ TFIIA), Toa1, als Suppressor einer limitierenden NC2-Funktion in Hefe identifiziert. Der Suppressor trägt einen einzigen konservativen Aminosäure-Austausch (Valin zu Phenylalanin). Diese Suppressor-Mutation wurde durch Generierung einer unzureichenden NC2 $\beta$ -Konzentration in Hefe induziert. Das Ersetzen der Wildtyp-Kopie des Hefe-NC2 $\beta$  durch ein *CEN*-Plasmid-exprimiertes hNC2 $\beta$  in der Zelle lieferte als Resultat einen langsam wachsenden Phänotyp, der sich spontan durch genomische Mutationen außerhalb des NC2-Gens revertieren ließ. Bemerkenswerterweise konnte die Suppressor-Mutation in Toa1 das Erfordernis von NC2 für das Hefewachstum vollständig umgehen. In Anwesenheit der Suppressormutation wiesen die Zellen ein normales Wachstum auf und dies auch in Abwesenheit der NC2 $\beta$ - und NC2 $\alpha$ -Gene. Das auf den *in vitro*-Studien basierende Modell des Repressionsmechanismus von NC2 spricht für eine direkte Konkurrenz zwischen NC2 und den generellen Transkriptionsfaktoren TFIIA und TFIIB. Dies gilt auch nach der Komplexbildung von TFIIA-TFIIB mit TBP (Goppelt *et al.*, 1996 und Abb. 33). Spezifische Bindung von NC2 an TBP inhibiert die weitere Anlagerung von TFIIA und TFIIB, und führt dadurch zum Abbruch der Bildung des Präinitiationskomplexes.

Durch *in vivo*-Untersuchungen der NC2-Funktion konnte gezeigt werden, daß dieses Modell des molekularen Mechanismus von NC2 physiologisch relevant ist. Eine Punktmutante von TFIIA, die in der Komplexbildung mit TBP und in der Antirepressionsfunktion defekt war, wirkte als direkter Gegenspieler von limitierender NC2-Funktion *in vivo*. Dies spricht für eine präzise Balance zwischen den Funktionen der positiven und negativen Faktoren in der Transkriptionsregulation. Diese Aussage wird durch die Identifikation von NC2 als ein Antagonist einer Mutation im positiven Mediator SRB4 unterstützt (Gadboris *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998).



**Abb. 33:** Modell des Mechanismus der Transkriptionsrepression durch NC2. Die stabile Bindung des NC2-Komplexes (aus NC2 $\alpha$  und NC2 $\beta$ ) an DNA-gebundenes TBP verhindert die weitere Anlagerung von TFIIA und TFIIB (Goppelt *et al.*, 1996). Der Startpunkt der Transkription ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

### 5.1.2. Interaktionen zwischen NC2, TFIIA und TBP

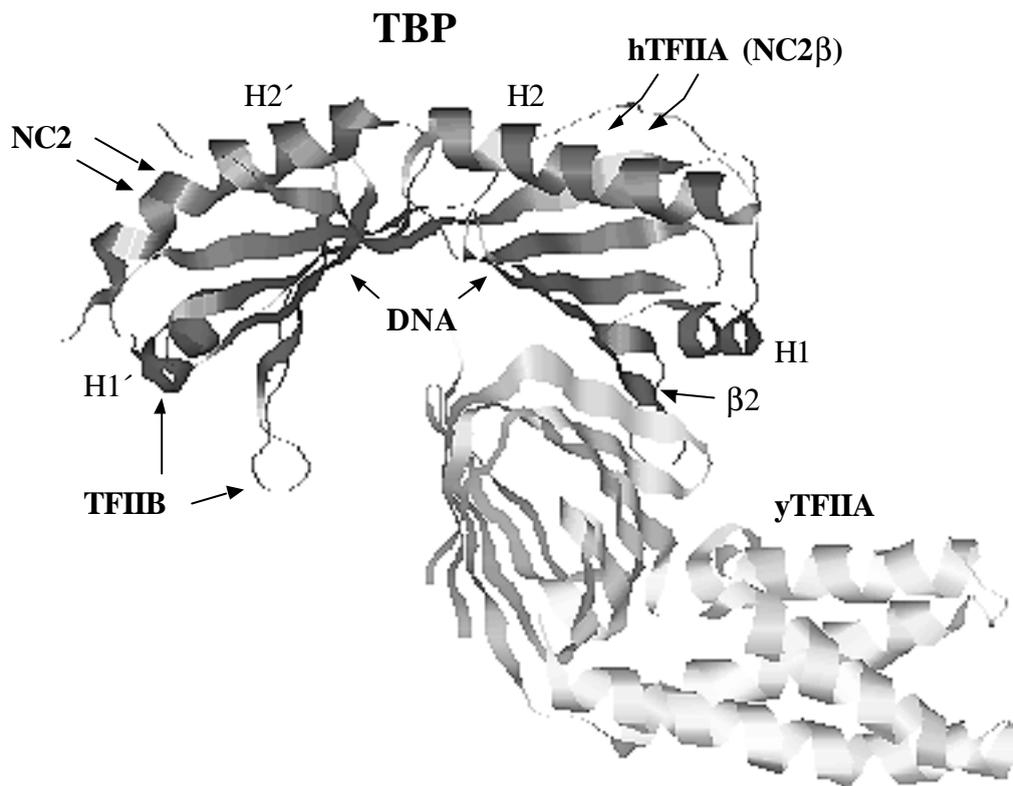
Das TATA-bindende Protein, TBP spielt eine zentrale Rolle in der Transkriptionsregulation der RNA-Polymerase II (Pol II). Die Bindung von TBP an die TATA-Box ist der erste Schritt der Transkriptionsinitiation während der Ausbildung des Präinitiationskomplexes (PIC) (Matsui *et al.*, 1980). TBP wurde als Zielprotein zahlreicher Transkriptionsfaktoren beschrieben. Dazu zählen die generellen Transkriptionsfaktoren TFIIA und TFIIB, die C-terminale Domäne der Pol II, die verschiedenen TBP-assoziiierenden Faktoren (TAF<sub>II</sub>s), zahlreiche zellulären und viralen Transkriptionsaktivatoren und die negativen Cofaktoren Mot1 und NC2 (Übersichtsartikel: Hampsey, 1998).

Die hochkonservierte Domäne von TBP bildet eine sattelförmige Struktur mit der konkaven Oberfläche für DNA-Kontakte und einer basischen konvexen Oberfläche für Interaktionen mit weiteren Transkriptionsfaktoren. Die Röntgenstruktur von  $\gamma$ TFIIA im Komplex mit TBP und DNA wurde aufgeklärt (Geiger *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 1996). Die extensiven Protein-Protein-Interaktionen bestehen hauptsächlich auf hydrophoben Wechselwirkungen zwischen einem  $\beta$ -Strang der kleinen Untereinheit (Toa2) von  $\gamma$ TFIIA und dem  $\beta$ 2-Strang von TBP (dargestellt in Abb. 34).

Mutagenese-Studien haben einige basische Aminosäuren auf der Oberfläche von Helix H2 des TBP identifiziert, die in der TBP-hTFIIA-Interaktion involviert sind (Buratowski *et al.*, 1992; T.K.Kim *et al.*, 1995). Die Kristallstruktur des Komplexes TBP/yTFIIA/DNA zeigt keine direkten Kontakte zwischen yTFIIA und der Helix H2 von TBP (Abb. 34, Geiger *et al.*, 1996). Eine Erklärung dafür könnte sein, daß das humane TFIIA (hTFIIA) eine zusätzliche Bindungsdomäne auf Helix H2 besitzt. Die Kristallstruktur beinhaltet ausschließlich die konservierten Domänen der großen Untereinheit von yTFIIA. Die große Untereinheit des TFIIA aus Mensch und *Drosophila* besitzen eine weitere konservierte Region, welche der Struktur von yTFIIA fehlt. Diese Region ist reich an sauren Aminosäuren, während das Äquivalent in Toa1 vom yTFIIA eher basische Natur aufweist (Geiger *et al.*, 1996). Die saure Region von hTFIIA könnte daher die essentielle Kontakte zwischen TBP und dem hTFIIA vermitteln. Innerhalb derselben basischen Cluster der Helix H2 von TBP wurden Aminosäuren identifiziert, die für die Interaktion zwischen TBP und NC2 $\beta$  verantwortlich sind (T.K.Kim *et al.*, 1995). Dies deutet als erstes darauf hin, daß die Konkurrenz zwischen NC2 und TFIIA für die Bindung an TBP auf eine direkte sterische Hinderung beider Proteine basieren könnte. Die vorgezeigten Ergebnisse aus der Konkurrenzanalyse von TFIIA mit NC2 in Gelshift- und Transkriptionsexperimenten widersprechen diese Theorie. Das Wildtyp-NC2 war in der Lage effektiv an TBP zu binden, sowohl in Anwesenheit von hTFIIA (Goppelt *et al.*, 1996) als auch von yTFIIA (dieser Arbeit). Deshalb kann die überlappende Bindestelle nicht der Grund für funktionelle Konkurrenz zwischen NC2 und TFIIA sein. Es läßt sich eher auf eine NC2-induzierte Konformationsänderung in TBP oder DNA und somit die Veränderung der Bindungsoberfläche für TFIIA vermuten (siehe auch Kapitel 5.5).

Kürzlich wurde eine neue Interaktionsoberfläche auf TBP charakterisiert, welche für die Bindung an Dimer-NC2 verantwortlich ist (Cang *et al.*, 1999). Dieser regulatorische Cluster befindet sich auf der Helix H2' von TBP in unmittelbarer Nähe der Bindungsoberfläche für TFIIB (Abb. 34). Dies spricht für eine physikalische Blockierung der Bindung von TFIIB an TBP durch NC2. Allerdings fehlen bisher eindeutige funktionelle Hinweise sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.

Die Identifikation einer Punktmutation in TFIIA als Suppressor von defizienter NC2-Funktion *in vivo* lieferte wichtigen Hinweis für ein funktionelles Gegenspiel zwischen TFIIA und NC2 und unterstützte zusätzlich die Bedeutung der physikalischen Interaktionen von NC2, TFIIA und TBP aus Mutagenese-Studien und der Struktur-Analyse.



**Abb. 34:** Bindungsfläche von TBP. Dargestellt ist die Kristallstruktur von TBP (dunkel) im Komplex mit  $\gamma$ TFIIA (hell), der aus Toa2 und konservierten Regionen von Toa1 besteht. TBP ist gezeigt als sattelförmige Struktur mit vier Helices (H1, H2, H1' und H2') und zehn  $\beta$ -Stränge (darunter  $\beta 2'$ ). Die zusätzliche Bindungsfläche für hTFIIA, NC2 bzw. NC2 $\beta$  aus der Mutagenese-Studien sowie die TFIIIB- und DNA-Bindungsfläche aus der Kristallstrukturanalyse sind angegeben.

### 5.1.3. Rolle des TFIIA in der Transkriptionsregulation

In der vorliegenden Arbeit wurde ein funktionelles Gegenspiel zwischen  $\gamma$ TFIIA und NC2 festgestellt. Der Suppressor ersetzt vollständig die Funktion von NC2 in Hefe. In Anwesenheit der Suppressormutation, ist das Vorhandensein von NC2 für die Hefe nicht mehr essentiell. TFIIA jedoch ist weiterhin erforderlich. Dies führt zu der Annahme, daß TFIIA nicht nur Kompetitionsfunktion gegenüber Transkriptionsrepressor NC2, sondern zusätzliche Funktionen besitzen. Als genereller Transkriptionsfaktor weist TFIIA vielseitige Funktionen auf. Je nach Transkriptionssystem findet man unterschiedlichen Einfluß von TFIIA. Normalerweise wird TFIIA für die Transkription mit TBP im zellfreien System nicht gebraucht (Cortes *et al.*, 1992). Allerdings hat es eine stimulierende Funktion, wenn der Transkriptionsreaktion anstelle von TBP, TFIID zugefügt wird (Ozer *et al.*, 1994; Yokomori *et al.*, 1994; Ma *et al.*, 1996). Zusammen mit vielen Transkriptionsaktivatoren und

Coaktivatoren stimuliert TFIIA die Bildung des TFIID-TATA-Komplexes durch seine Funktion als molekulares Brückenprotein (Kaiser *et al.*, 1995). Diese Funktion von TFIIA in der Transaktivierung ist durch direkte biochemische Interaktionen zwischen TFIIA und verschiedenen Aktivierungsdomänen unterstützt (Ozer *et al.*, 1994; Kobayashi *et al.*, 1995).

Die Abhängigkeit der Transkription von TFIIA korreliert oft mit dem Reinheitsgrad des Transkriptionssystems; je höher der Reinheitsgrad, desto weniger ist das System von TFIIA abhängig. Dieser Unterschied läßt sich hauptsächlich auf die Antirepressionsaktivität des TFIIA gegen die Effekte mancher Transkriptionsrepressoren zurückführen. Dazu gehören der NC2-Komplex (Inostroza *et al.*, 1992), das Mot1-Protein (Auble *et al.*, 1994), die Topoisomerase I (Merino *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 1996) und der hTAF<sub>II</sub>250 (Ozer *et al.*, 1998b), die in einem grob gereinigten System vorkommen können. Die Coaktivierung und Antirepressionsaktivität von humanem TFIIA sind auf distinkte Domänen des Proteins zurückzuführen (Ma *et al.*, 1996). Dies läßt den Schluß zu, daß TFIIA über beide Mechanismen gleichzeitig verfügt um die Funktion des TFIID zu verstärken (Ma *et al.*, 1996). Biochemische Studien an Core-Promotoren ohne Initiator-Elemente lieferten Hinweise darauf, daß TFIIA auch an der Initiator-Aktivität beteiligt ist. Es stabilisiert spezifisch die TFIID-Bindung an die TATA-Box, die sich vor einem starken Initiator befindet. Dagegen zeigt TFIIA nur geringfügige Effekte auf einen Promotor, der ausschließlich eine TATA-Sequenz besitzt (Hansen and Tjian, 1995; Emami *et al.*, 1997).

Die Erkennung der TATA-Box durch TBP ist der geschwindigkeitslimitierende Schritt in der Transkriptionsinitiation (Übersichtsartikel: Orphanides *et al.*, 1996; Roeder, 1996). Neuere Untersuchungen führten zu einer alternativen Theorie, derzufolge nicht die Bindung der TATA-Box durch monomeres TBP, sondern die Dissoziation des TBP (TFIID)-Dimers eine entscheidende Rolle spielt (Jackson *et al.*, 1999). Die Dimer-Dissoziation des TBP wird wiederum durch TFIIA positiv reguliert (Coleman *et al.*, 1999). Die Identifikation der Toa1-Mutante als Suppressor der defizienten NC2-Funktion in Hefe kann in Zukunft dazu beitragen, die vielfältigen Aktivitäten von TFIIA zu klassifizieren.

Die Suppressor-Mutation, die durch eine künstliche Verminderung der Gendosis von NC2 $\beta$  selektioniert wurde, kann gleichzeitig die essentielle Erfordernis an NC2 $\beta$  und NC2 $\alpha$  umgehen. Dies belegt wiederum eindrucksvoll, daß eine Funktionsabhängigkeit von NC2 $\alpha$  und NC2 $\beta$  *in vivo* existiert, und beide Proteine als Dimer für die essentiellen Funktionen erforderlich sind.

## 5.2. Biochemische Eigenschaften der Suppressor-Mutante

Die Suppressor-Mutante in Toa1 konnte die essentielle Erfordernis für NC2 $\alpha$  und NC2 $\beta$  *in vivo* umgehen. Dies ist ein plausibles Argument dafür, daß die beiden antagonistisch wirkenden Transkriptionsfaktoren den gleichen Prozeß in lebenden Zellen kontrollieren. Zieht

man die molekulare Charakterisierung von NC2 in Betracht, könnte man vermuten, daß die Mutation in Toa1 den Gleichgewichtszustand zwischen TFIIA, NC2 und TBP in irgendeiner Art und Weise beeinträchtigt. Hinweise für ein solches Modell stammten aus den *in vitro*-Experimenten. In einem grob gereinigten Transkriptionssystem basiert die Bildung des Präinitiationskomplexes auf der TATA-Box-Erkennung durch TFIID. Eine effiziente und stabile Bindung des TFIID findet erst in der Gegenwart von TFIIA statt (Meisterernst and Roeder, 1991; DeJong and Roeder, 1993). Die Vorinkubationsexperimente haben demonstriert, daß der Repressor NC2 erst nach der Bindung von TFIID angreift und die Transkription selbst nach dem Eintritt von TFIIA und TFIIB inhibiert. Allerdings wird NC2 unwirksam, wenn der gesamte Präinitiationskomplex bereits ausgebildet ist (Meisterernst and Roeder, 1991).

Die biochemischen Eigenschaften der Suppressor-Mutante wurden mit rekombinantem Protein aus *E. coli* analysiert. Trotz der Lokalisation der Suppressor-Mutation auf der Dimerisierungs-oberfläche von Toa1, ist das mutierte Protein in der Lage, stabile TFIIA-Komplexe zusammen mit der kleinen Untereinheit Toa2 auszubilden. Allerdings führte diese Punktmutation zu einer Reduktion der ternären Komplexbildung mit TBP auf DNA, wie es im Gelshift-Experiment gezeigt war. Die Fähigkeit zur Unterstützung der TBP-Rekrutierung auf den Promotor hingegen ist weiterhin intakt. Footprinting-Analysen zeigten, daß die TATA-Box der Promotoren bei Verwendung von mt-yTFIIA durch die TBP-Bindung effektiv geschützt werden konnte. Dagegen läßt sich nur ein geringer Anteil der Promotoren als stabile Protein-DNA-Komplexe im Gel-Shift detektieren. Eine mögliche Erklärung für dieses offenbar paradoxe Verhalten des mt-yTFIIA könnte in der Stabilität des ternären Komplexes liegen und auf Unterschiede zwischen den Untersuchungsverfahren zurückgeführt werden. Der mt-yTFIIA konnte zwar an TBP auf dem Promotor assoziieren, der resultierende Komplex war aber weniger stabil als derjenige mit dem wt-yTFIIA. Ein großer Teil dieser instabilen Komplexe mit mt-yTFIIA konnte die verschiedenen Widerstände im Verlauf der langen Auftrennungszeit im Gelshift nicht überstehen und fiel wieder auseinander. Es blieb zum Schluß nur ein kleiner Anteil von Komplexen, die stabil waren und detektiert werden konnten.

TBP bindet an die TATA-Box in der kleinen Furche des DNA-Doppelstrangs. Es gab Hinweise aus der Literatur, daß TBP in Abwesenheit von weiteren Transkriptionsfaktoren Sequenz-unspezifisch an DNA bindet und sich entlang den DNA-Strang gleitet (Coleman and Pugh, 1995). Die Spezifität eines typischen Sequenz-spezifisch bindenden Proteins an der großen Furche von DNA liegt etwa 1000-fach höher als TBP zu TATA-Box (Coleman and Pugh, 1995). Unsere Footprinting-Experimente zeigen einen unspezifischen Schutz stromaufwärts der TATA-Box auf dem nicht-codierenden Strang des HIV-Promotors und deuten auf eine solche TATA-unabhängige TBP-DNA-Assoziation hin. In Gegenwart von TFIIA ist der TBP-DNA-Kontakt effizienter und sequenzspezifisch. Die Punktmutation in

Toa1 scheint diese Funktion des TFIIA nicht beeinträchtigt zu haben. Es kommt wahrscheinlich zur Ausbildung von Komplexen von geringerer Stabilität.

Es wird diskutiert, daß TBP nach der Bindung an DNA seine Konformation verändert (Coleman and Pugh, 1997). Ausgehend von einer schnellen Assoziation mit DNA, welche zur Ausbildung instabiler Intermediate führt, kommt es zu einer langsamen Isomerisierung zum stabilen Komplex. Es gab auch Berichte über eine Aktivator-induzierte Isomerisierung des ternären Komplexes TFIIA-TFIID-DNA nach der Rekrutierung zu TATA-Box (Chi and Carey, 1996; Emami *et al.*, 1997). Unter Berücksichtigung des spezifischen Defektes der Suppressor-Mutante darf man spekulieren, daß die im Gelshift sichtbaren Komplexe eine kleine isomerisierte Population von TBP-TFIIA-DNA-Komplexen repräsentieren, welche der Detektion im Footprintingexperiment entgehen. Anzeichen für das Vorhandensein solcher Populationen waren die spezifischen DNase I-hypersensitiven Stellen, die in Anwesenheit von wt- und mt-yTFIIA sichtbar waren. Darüberhinaus konnte man hypothetisieren, daß TFIIA nicht nur die Rekrutierung von TBP an Promotor-DNA sondern auch die darauf folgende Isomerisierung des ternären Komplexes induziert und stabilisiert.

### 5.3. Molekulare Ursache der Suppressormutante

Biochemische Untersuchungen der Suppressormutante in yTFIIA (mt-yTFIIA) haben darauf hingewiesen, daß die mt-yTFIIA Defekte bezüglich der Stabilität des ternären Komplexes mit TBP-DNA aufweist. Die entsprechende molekulare Ursache ist aber unklar. Der Stabilitätsdefekt in Anwesenheit von mt-yTFIIA könnte durch den Hebel-Effekt aus dem Aminosäure-Austausch von Valin zu Phenylalanin bei der Position 251 in Toa1 zustande kommen. Das Valin ist eine Aminosäure mit kurzer Seitenkette und Rotationsflexibilität. Dagegen ist das Phenylalanin eine Aminosäure mit viel größerer und unflexibler Seitenkette. Durch den Hebel-Effekt könnte eine lokale Veränderung in der DNA- und TBP-Bindungsoberfläche auf TFIIA hervorgerufen werden. Darüber hinaus könnte auch die korrekte Faltung der zentralen, nicht-konservierten Region von Toa1, welche in der Kristallstruktur von TFIIA-TBP auf DNA nicht vorhanden ist (Geiger *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 1996), durch die Val251Phe-Mutation beeinträchtigt werden. Der zentrale Bereich des Toa1-Proteins wird für seine Funktion *in vitro* und *in vivo* nicht benötigt (Kang *et al.*, 1995). Er übernimmt die Rolle eines "spacer" zwischen den konservierten N- und C-terminalen Regionen in Toa1. Sowohl das humane als auch das *Drosophila* Protein wird innerhalb der zentralen Domäne vom Toa1 proteolytisch geschnitten und zum reifen TFIIA in zwei Untereinheiten,  $\alpha$  und  $\beta$ , prozessiert (DeJong and Roeder, 1993; Yokomori *et al.*, 1993).

*In vivo*-Untersuchungen haben gezeigt, daß Zellen mit solchen minimalen Toa1 ohne zentrale Region zwar leben können, aber sensitiv auf höhere Temperatur (37°C) reagieren und eine abnormale Morphologie aufweisen (Kang *et al.*, 1995). yTFIIA aus minimalem Toa1

besitzt volle Aktivität in der TBP-DNA-Bindung, weist aber signifikant reduzierte Affinität zu TBP in der Abwesenheit von DNA auf (Kang *et al.*, 1995). Der Defekt der Suppressor-Mutante in der Komplexbildung zeichnete sich außerdem dadurch aus, daß er nicht durch Konzentrationserhöhung der Reaktionspartner, TFIIA oder TBP kompensieren läßt. Dieses Phänomen kann nur dadurch erklärt werden, daß es sich dabei mehr um einen komplizierten Prozeß als ein simples Gleichgewicht zweier Partner handelte.

#### 5.4. Analyse der Suppressor-Mutante in der *in vitro*-Transkription

Biochemische Eigenschaften der Suppressormutante wurden durch *in vitro*-Transkription untersucht. Das mt-yTFIIA war nicht in der Lage, die Transkriptionsrepression durch NC2 aufzuheben, während wt-yTFIIA sie effektiv revertieren konnte. Dieser Defekt der Suppressormutante liefert einen direkten Hinweis auf eine funktionelle Balance zwischen TFIIA und NC2. Dieses Ergebnis muß aber nicht unbedingt die tatsächlichen Abläufe in der Zelle widerspiegeln, da die Zellen des Suppressors praktisch weder NC2 $\beta$  noch NC2 $\alpha$  für ihr Wachstum benötigten. Es deutet eher auf das Vorhandensein weiterer Antagonisten hin. Der Defekt des mt-yTFIIA bei der Ausbildung des ternären Komplexes muß eine wichtige Rolle in diesem Kontext spielen. Er könnte sich auch auf andere Faktoren auswirken, die sensitiv gegenüber einer geschwächten TBP-Promotor-Rekrutierung sind.

Diese Hypothese wird durch die parallele Identifikation einer Mutante in Sin4 aus demselben Ansatz unterstützt (Lemaire *et al.*, 2000). Das *SIN4*-Gen codiert für eine Komponente des Mediator-Komplexes und des RNA-Polymerase II-Holoenzym (Li *et al.*, 1995). Sin4 besitzt als Transkriptionsregulator sowohl positive als auch negative Aktivitäten (Jiang and Stillman, 1992; Chen *et al.*, 1993; S.J.Kim *et al.*, 2000). Es gibt auch Hinweise darauf, daß Sin4 die Transkription reguliert, in dem es die Chromatin-Struktur verändert (Jiang *et al.*, 1995; Macatee *et al.*, 1997). Die Identifikation eines mutierten *sin4*-Allels als Suppressor von NC2 $\beta$  steht in Übereinstimmung mit der Beobachtung von Richard Young und Kollegen, in der NC2 $\alpha$  und NC2 $\beta$  der anderen Komponente des RNA Pol II-Holoenzym, nämlich SRB4, entgegen wirken (Lee *et al.*, 1998). Es spricht zugleich für eine direkte Verbindung zwischen Holoenzym-Komplex und NC2.

Antirepressionsaktivität des TFIIA ist auf dem Modellpromotor vom Adenovirus Major Late Core-Promotor (AdML) stärker ausgeprägt als auf dem vom HIV-Promotor. Vergleicht man beide viralen Promotoren, stellt man fest, daß sie zwar das gleiche Initiator-Element besitzen, aber eine unterschiedliche TATA-Box. Die Bindungsaffinität von TBP zu DNA und die Stabilität des Komplexes sind von der Sequenz der Bindestelle abhängig (Coleman and Pugh, 1995). Die TATA-Box vom AdML-Promotor enthielt eine perfekte Konsensus-Sequenz "TATAAAA" mit hoher Affinität zu TBP. Im Gegensatz dazu trägt der HIV-Promotor ein verkürztes TATA-Element, das mit niedrigerer Affinität von TBP erkannt wird. Außerdem

weist der AdML-Promotor eine Guanin-reiche Sequenz benachbart zur TATA-Box auf, wohingegen die Region um die HIV-TATA-Box herum eher Thymidin-reich ist. Diese Unterschiede in der Promotor-Struktur könnten für das abweichende Verhalten des TFIIA in der Antirepression verantwortlich sein. Diese Ansicht wird durch eine frühe Beobachtung unterstützt, in der NC2 zusammen mit TFIIA die Transkription Promotor-spezifisch modifiziert. Die Antirepressionsfunktion von TFIIA auf die NC2-abhängige Repression ist spezifisch auf dem AdML-Promotor nicht aber auf dem Immunoglobulin  $\mu$ -Promotor wirksam (J.Kim *et al.*, 1996). Diese Promotor-spezifische Funktion von NC2 wird durch neuere Berichte erweitert. An bestimmten Promotoren *in vivo* wurden positive Effekte von NC2 beobachtet. Beispiele dafür sind der *Gall1*- bzw. *Gall10*-Promotoren (Prelich, 1997) und die TATA-losen Promotoren der *HIS3*- und *HIS4*-Gene (Lemaire *et al.*, 2000).

### 5.5. Konsequenzen der NC2-Bindung an TBP auf Promotor

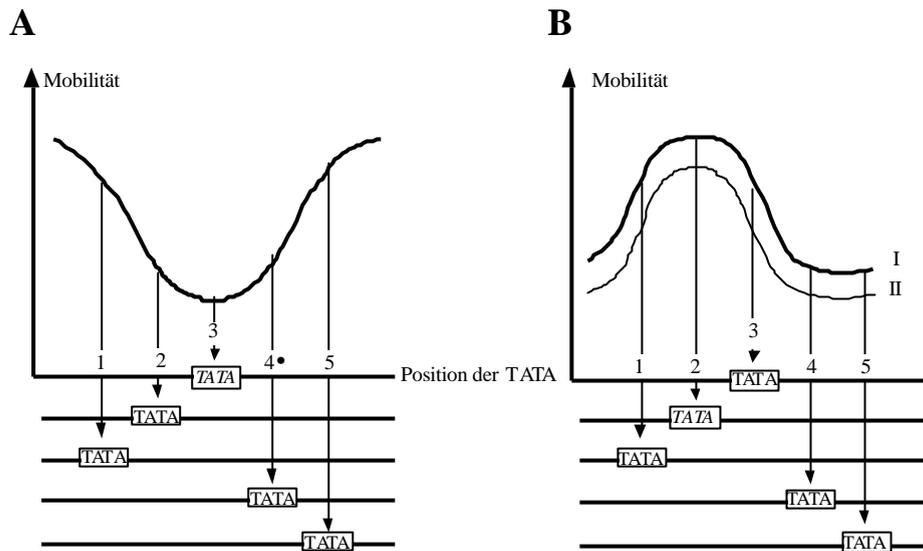
TBP bindet an die TATA-Box des Promotors und induziert dadurch eine Verbiegung der DNA um 90°. Die weitere Anlagerung von TFIIA und TFIIB verändert diesen Winkel nicht (Nikolov *et al.*, 1995; Geiger *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 1996). Ob die NC2-Bindung an TBP eine Konformationsänderung im Protein TBP und in der DNA hervorruft, ist noch unklar. Hinweise darauf ergaben sich aus Footprinting-Experimenten. Zusätzlicher Schutz im Bereich stromabwärts der TATA-Box und DNase I-hypersensitive Stellen wurden durch die Bindung von NC2 induziert. Weitere Hinweise für eine Veränderung der DNA-Konformation durch NC2-Bindung erbrachte die zirkuläre Permutationsanalyse (Daten nicht gezeigt). Dieses Experiment basiert auf einer veränderten elektrophoretischen Mobilität der Protein-DNA-Komplexe auf DNA-Fragmenten gleicher Länge, unter Veränderung der Positionen der Bindestellen von einem Ende bis zum anderen (entwickelt von Wu and Crothers, 1984). Geringste Mobilität zeigt der Komplex, in dem das Protein in der Mitte des DNA-Fragmentes bindet (Wu and Crother, 1984). Die TFIIA-TBP-Komplexe verhielten sich tatsächlich in diesem Sinne. Die Mobilität der Protein-DNA-Komplexe wird reduziert, wenn die Bindungsstelle von den Enden bis zur Mitte des Fragmentes verschoben wird (A. Goppelt and M. Meisterernst unveröffentlicht und schematisch dargestellt in Abb. 35A).

Die Bindung von NC2 an TBP-DNA verändert dieses Laufverhalten der Komplexe. Der NC2-TBP-Komplex mit höchster Mobilität wurde nicht bei einer Bindung am Ende der DNA, sondern auf einem ersten Drittel der Fragmentlänge beobachtet (Abb. 35B, I). Dieses Phänomen läßt vermuten, daß der NC2-TBP-Komplex eine Polarität relativ zur TATA-Box aufweist und daß seine Bindung an TBP die Topologie der Promotor-DNA verändert.

Der längere Abschnitt stromabwärts der TATA-Box auf dem DNA-Fragment könnte weitere Kontakte zu NC2 gewährleisten und Änderungen in der DNA-Konformation verursachen. Um festzustellen, ob dieses asymmetrische Verhalten des NC2-TBP-Komplexes

auf dem Promotor von der absoluten Länge des DNA-Fragmentes 3' der TATA-Box abhängig ist, wurde NC2 zusammen mit TBP erneut im zirkulären Permutationsexperiment untersucht. Durch Einsetzen eines doppelsträngigen Oligonukleotids wurde der DNA-Abschnitt 3' der TATA-Box und somit die gesamte Länge des DNA-Fragmentes um 37 bp verlängert. Der NC2-TBP-Komplex höchster Mobilität wurde auf dem gleichen Fragment wie vor der Verlängerung festgestellt (schematisch dargestellt in Abb. 35B, II). Dies deutet darauf hin, daß das extremste Laufverhalten von NC2-TBP nicht durch die Länge des DNA-Abschnitts stromabwärts der TATA-Box bestimmt ist. Verantwortlich dafür ist die absolute Länge des DNA-Abschnitts 5' der TATA-Box (J. Xie und M. Meisterernst unveröffentlicht).

Die physiologische Bedeutung der DNA-Bindung von NC2 ist noch unklar. Die NC2-Mutanten, die ihre Aktivität bezüglich der DNA-Kontakte verloren haben ( $\beta$ S52R,  $\beta$ E45K) zeichneten sich auch durch Defekte in der Repressor-Funktion *in vitro* und *in vivo* aus. Veränderungen der DNA-Konformation durch NC2 könnten zumindest einen Teil seiner Funktion als Transkriptionsrepressor erklären. Tatsächlich wurde eine Modifikation der Transkriptionsaktivität durch eine Veränderung der Winkel an der TATA-Box berichtet (Starr *et al.*, 1995). Veränderungen der DNA-Konformation durch NC2 könnten auch dazu beitragen, die Interaktion von anderen Transkriptionsfaktoren an DNA oder TBP zu begünstigen (wie für weitere Repressoren) oder zu verhindern (wie für TFIIA). Verstärkte Rekrutierung von TBP zur TATA-Box in Anwesenheit von NC2 ist in Gelshift- und Footprintig-Experimenten nachgewiesen werden.



**Abb. 35:** Zirkuläre Permutationsanalyse von NC2 und TBP. Die Mobilität der Komplexe von TFIIA (A) oder NC2 (B) mit TBP und DNA ist gegen die Position der TATA-Box des AdML-Promotors (angegeben durch 1 bis 5) auf dem DNA-Fragment schematisch dargestellt. Die Mobilität der Protein-DNA-Komplexe verändert sich mit der Position der TATA-Box, die von einem Ende bis zum anderen auf dem DNA-Fragment verschiebt (224 bp bei A, B-I oder nach einer Verlängerung um 37 bp 3' der TATA-Box bei B-II). Die Position der TATA-Box, welche extremste Mobilität aufweist ist fett markiert.

## 5.6. Funktionsanalyse von humanem NC2 in Hefe

### 5.6.1. Austauschbarkeit zwischen NC2-Untereinheiten aus Mensch und Hefe

Die Hefe besitzt zwei stark homologe Proteine zum menschlichen NC2. Beide sind essentiell für das vegetative Wachstum von Hefe. Diese Eigenschaft ermöglichte die funktionelle Untersuchung des humanen NC2 auf molekularer Ebene *in vivo*. Beide humanen NC2-Untereinheiten waren in der Lage, die essentielle Rolle ihres Hefe-Gegenstückes in der Zelle zu übernehmen, vorausgesetzt, daß hNC2 $\alpha$  von einem *CEN*-Vektor und hNC2 $\beta$  von einem  $\mu$ -Plasmid exprimiert wird. Dies steht im Gegensatz zur früheren Erkenntnis der Austauschbarkeit von humanem und Hefe-NC2 *in vivo*, wobei die Funktion vom hNC2 $\alpha$  in Hefe eine Coexpression von hNC2 $\beta$  erforderte (S.J.Kim *et al.*, 1997).

Die vorangegangenen *in vitro*-Untersuchungen haben gezeigt, daß die Struktur des NC2 nur in Anwesenheit beider Untereinheiten stabil ist, so daß der binäre Komplex die Repressor-Aktivität rekonstruiert (Goppelt *et al.*, 1996; Gadboris *et al.*, 1997; Prelich 1997). Es gab auch

ein Modell vorgeschlagen von Reinberg und Kollegen, welches eine eigenständige Funktion des Dr1 (NC2 $\beta$ ) forderte (Inostroza *et al.*, 1992; Yeung *et al.*, 1994). Es wurde diskutiert, daß Dr1 als ein Phosphoprotein im Kernextrakt vorliegt, ausschließlich in phosphorylierter Form stabil an TBP auf Promotor-DNA bindet und seine Funktion in der Transkriptionsrepression ausübt (Inostroza *et al.*, 1992). Allerdings ließen sich diese Effekte in unserer Arbeitsgruppe nicht wiederholen, stattdessen wurde die zweite Untereinheit des NC2, das NC2 $\alpha$  identifiziert (Goppelt *et al.*, 1996). Zusammen mit NC2 $\alpha$  kann Dr1 (NC2 $\beta$ ) alle Funktionen des NC2 *in vitro* rekonstruieren (Goppelt *et al.*, 1996). Kurz darauf wurde ein weiteres Protein DRAP1 von Danny Reinberg und Kollegen beschrieben, welches die Dr1-Funktion verstärkt und als Corepressor des Dr1 erklärt wurde (Mermelstein *et al.*, 1996).

Wenn das NC2 schließlich als Dimer-Komplex *in vivo* funktioniert, müßten die humane und Hefe-NC2-Proteine über die Histone-Fold-Domäne heterodimerisieren. Die Suppressor-Mutante, die ursprünglich aus Zellen mit limitierender NC2 $\beta$ -Konzentration isoliert wurde, konnte zugleich die Unabkömmlichkeit beider Untereinheiten, NC2 $\beta$  und NC2 $\alpha$ , umgehen. In derselben Selektion in Hefe wurde eine weitere Punktmutante in Sin4 identifiziert (Lemaire *et al.*, 2000). Ebenso wie der Toa1-Suppressor konnte die Sin4-Mutante sowohl die Funktion des NC2 $\beta$  als auch die des NC2 $\alpha$  *in vivo* ersetzen. Ergebnisse dieser *in vivo*-Studien bestätigen, daß der Repressor NC2 erst als Dimer-Komplex funktionsaktiv ist.

### 5.6.2. Funktionsdomänen von humanem NC2

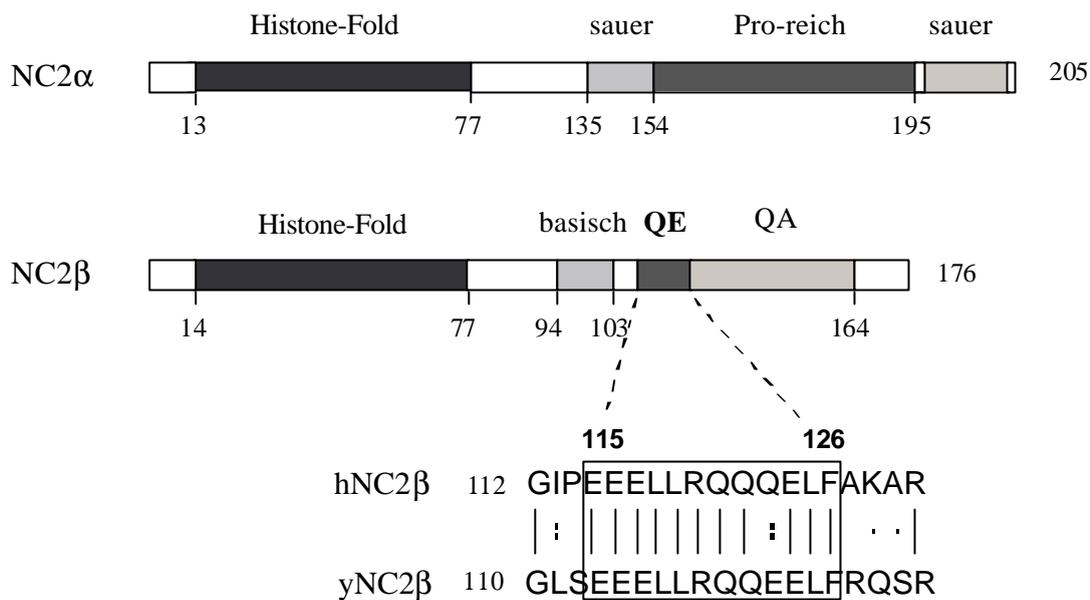
Um die Domänen in humanen NC2-Untereinheiten (hNC2) zu definieren, welche die konservierten *in vivo*-Funktionen vermitteln, wurden verschiedene Deletionsmutanten in NC2 $\alpha$  und NC2 $\beta$  konstruiert. Diese wurden in Hefe-Expressionsvektoren kloniert und anschließend mittels Plasmid-Austausch-Technik in die Hefe eingefügt.

Neben der hochkonservierten N-terminalen Histone-Fold-Domäne beider NC2-Untereinheiten werden zwei saure und eine Prolin-reiche Region in hNC2 $\alpha$  und eine basische sowie eine Glutamin/Alanin-reiche (QA) Domäne in hNC2 $\beta$  identifiziert (Abb. 36). Saure, Glutamin- oder Prolin-reiche Regionen wurden als Funktionsdomänen vieler Transaktivatoren als auch Repressoren charakterisiert (Madden *et al.*, 1993, Übersichtsartikel: Stargell and Struhl, 1996). Struktur-Funktionsanalysen zeigten, daß eine 5'-Deletion bis zur Aminosäure 7 und 3'-Deletion bis zur Aminosäure 81 von hNC2 $\alpha$  die *in vivo*-Funktion von NC2 kaum beeinflussen. Diese Deletionen umfassen den ganzen C-terminalen Bereich von NC2 $\alpha$ , nämlich die beide saure und die Prolin-reiche Regionen. Daraus kann man schließen, daß in Kombination mit Wildtyp-hNC2 $\beta$ , die Histone-Fold-Domäne von hNC2 $\alpha$  für die *in vivo*-Funktion von NC2 ausreichend und erforderlich ist. In Konsistenz damit zeigte die *in vitro*-Transkriptionsanalyse von NC2, daß die Histone-Fold-Domäne von hNC2 $\alpha$  zusammen mit hNC2 $\beta$  die Transkription im rekonstituierten System aus grob gereinigten Faktoren effektiv

reprimieren konnte (Goppelt *et al.*, 1996).

Die physikalische Interaktion zwischen C-terminaler Region von hNC2 $\alpha$  und einem Homeodomäne-Transkriptionsfaktor AREB6 wurde beobachtet (Ikeda *et al.*, 1998). AREB6 ist ein Gewebe-spezifischer Faktor, der die Transkription bestimmter Gene sowohl positiv als auch negativ reguliert (Watanabe *et al.*, 1993). Auch eine funktionelle Korrelation zwischen AREB6 und NC2 wurde festgestellt (Ikeda *et al.*, 1998). Daraus kann spekuliert werden, daß NC2 weitere Interaktionspartner neben TBP, TFIIA und TFIIB sowie Sin4 besitzen könnte. Während die Histone-Fold-Domäne von hNC2 $\alpha$  zusammen mit hNC2 $\beta$  die basale Transkription reguliert, ist seiner C-Terminus in Wechselwirkungen mit weiteren Transkriptionsregulatoren wie AREB6 involviert.

Bei der NC2 $\beta$ -Untereinheit wird allerdings außer der Histone-Fold-Domäne noch die angrenzende C-terminale Region von Aminosäuren 78-129 *in vivo* benötigt. Diese Regionen umfassen genau die evolutionär konservierten Domänen von NC2 $\beta$ . Eine 5'-Deletion bis zur Aminosäure 9 und 3'-Deletion bis zur Aminosäure 130 von hNC2 $\beta$  zeigten nur geringe Effekte. Dagegen war eine Deletionsmutante, welche ausschließlich die ersten 112 Aminosäuren (1-112) enthält, nicht funktionell in Hefe. Daraus kann man schließen, daß die Aminosäuren 113 und 129 von NC2 $\beta$  für die *in vivo*-Funktion von NC2 erforderlich sind. Dieser Bereich beinhaltet die basische Region (94-103), die als TBP-Bindungsdomäne beschrieben worden ist (Yeung *et al.*, 1994; S.J.Kim *et al.*, 2000). *In vitro*, eine NC2 $\beta$ -Mutante, welche ausschließlich aus der Histone-Fold-Domäne und dieser basischen Region besteht (Aminosäuren 1-112), ist zwar fähig stabile NC2-TBP-DNA-Komplexe zu bilden, aber nicht in der Lage die Transkription in Anwesenheit von TFIID (statt TBP) effektiv zu reprimieren (Goppelt *et al.*, 1996). Für eine effektive Repression ist zusätzlich die Glutamin/Alanin-reiche (QA) Region erforderlich (Yeung *et al.*, 1994; Goppelt *et al.*, 1996). Die *in vivo*-Ergebnisse zeigten, daß ein großer Teil dieser Region unter physiologischen Bedingungen nicht gebraucht wird. Allerdings wurde der angrenzende Bereich aus 12 Aminosäuren (115-126), der zwischen Mensch und Hefe hochkonserviert ist (91% Identität) zur vollständigen Funktion benötigt (Abb. 36). Dieser Bereich besteht fast ausschließlich aus Glutamin- und Glutaminsäure-Resten (QE).



**Abb. 36:** Schematische Darstellung der humanen NC2-Untereinheiten. Die Histone-Fold-Domäne, basische, saure, Prolin-reiche (Pro-reich), Glutamin/Alanin-reiche (QA) und Glutamin/Glutaminsäure-reiche (QE) Regionen sind verschieden markiert. Die entsprechenden Aminosäure-Positionen sind angegeben. Die Sequenz der hochkonservierten QE-Region zwischen dem humanen und Hefe-NC2 $\beta$  ist eingerahmt.

Die C-terminalen Domänen der beiden hNC2-Untereinheiten stabilisieren alle NC2-Aktivitäten. Solange das Histone-Fold-Motiv in beiden Untereinheiten intakt ist, kann eine reduzierte Aktivität, die aufgrund des Fehlens der C-terminalen Domäne in einer Untereinheit zustande kam, durch die Anwesenheit der C-terminalen Domäne der zweiten Untereinheit kompensiert werden (Yeung *et al.*, 1994, 1997; Goppelt *et al.*, 1996). Diese Eigenschaft wurde aber nicht in Hefe beobachtet. Diese Resultaten lassen vermuten, daß die spezifische Funktion der C-terminalen Regionen von NC2 nur in höheren Organismus vorhanden ist.

### 5.7. Mutagenese-Studien des NC2 *in vivo* und *in vitro*

Die Funktionsdomänen von hNC2 *in vivo* wurden in den evolutionär konservierten Regionen festgestellt. Um eine präzisere Lokalisation der Funktionscluster von NC2 zu erzielen, wurden Punktmutationen an den konservierten Aminosäure-Positionen innerhalb der Histone-Fold-Domäne beider Untereinheiten und der essentiellen Region von hNC2 $\beta$  gezielt eingefügt. Die Projektion der NC2-Proteine in der Kristallstruktur von Histondimer H2A-H2B erlaubt eine Vorhersage über die Funktion einzelner Aminosäuren. Mit Hilfe des Plasmid-Austausch-Verfahrens wurden diese Mutanten zunächst *in vivo* analysiert.

So wurden die Mutanten  $\beta$ E45K und  $\beta$ S52R identifiziert, die ihre Funktion in Hefe

verloren haben. Korreliert dazu waren die entsprechenden rekombinanten Proteine nicht in der Lage, die basale Transkription des HIV- und AdML-Promotors im rekonstituierten System effektiv zu reprimieren. In der Transkriptionsrepression wirkte das Wildtyp-NC2 2,5-fach aktiver als Mutante  $\beta$ E45K und 5-fach als Mutante  $\beta$ S52R. Das Glu45 und Ser52 befinden sich in einem Cluster auf der Protein-Oberfläche (vgl. Abb. 21). Homologe Aminosäuren in CBF-A sind für die Interaktion zwischen CBF-A und CBF-B und zwischen CBF-A und DNA verantwortlich (Sinha *et al.*, 1996). CBF-B stellt das Äquivalent von TBP im TBP-NC2-Komplex dar. So werden die  $\beta$ E45K und  $\beta$ S52R als TBP- und DNA-Bindungsmutanten angesehen. Tatsächlich weisen sie Defekte in der Bindungsaktivität auf. Signifikanter Verlust in dem direkten DNA-Kontakt sind bei Mutanten  $\beta$ E45K und  $\beta$ S52R beobachtet worden. Das Wildtyp-NC2 bindet etwa 10-mal effektiver an DNA als die Mutante  $\beta$ S52R.

Es konnte auch gezeigt werden, daß die  $\beta$ S52R-Mutation die gesamte binäre Struktur des NC2 nur gering beeinflusst. Effektive Assoziation der  $\beta$ S52R zu NC2 $\alpha$  ist in der Immunoprecipitationsanalyse mittels Antikörper gegen hNC2 $\alpha$  nachgewiesen worden. Auch in Wechselwirkung mit TBP in Abwesenheit von DNA weist die  $\beta$ S52R-Mutante eine Aktivität wie das Wildtyp-NC2 $\beta$  auf. Dies führt zu der Annahme, daß die reduzierte Aktivität von  $\beta$ S52R (wie auch  $\beta$ E45K) in der ternären Komplexbildung auf starke Verluste im DNA-Kontakt basiert. Weitere Anhaltspunkte stammen aus Gelshift-Experimenten von  $\beta$ S52R- und  $\beta$ E45K-Mutanten. Die Effekte beider Mutanten auf die Komplexbildung mit TBP und DNA sind konzentrationsabhängig. Die Reduktion in der Komplex-Menge in Anwesenheit der Mutanten lassen sich durch Konzentrationserhöhung der Reaktionspartner, TBP und NC2 kompensieren. Dies liefert wiederum Hinweise dafür, daß die  $\beta$ S52R- und  $\beta$ E45K-Mutanten in der TBP-Bindungsfläche von NC2 lokalisiert sind.

Die mit dem Wildtyp-NC2 vergleichbare Aktivität der  $\beta$ S52R-Mutante in der Wechselwirkung mit TBP in Lösung scheint im ersten Augenblick im Widerspruch zu dem 5-fachen Unterschied in der ternären Komplexbildung mit TBP-DNA und in der Transkriptionsrepression zu stehen. Mutanten mit ähnlichem Verhalten sind auch in Toa1 identifiziert worden (Kang *et al.*, 1995). Eine Erklärung dafür wäre, daß die  $\beta$ S52R-Mutante zwar über eine intakte Interaktionsdomäne mit TBP verfügt, aber die Aktivität für kooperative Bindungen an TBP beeinträchtigt. Diese Reduktion in der kooperativen Bindung *in vivo* könnte z.B. durch Schwächung in Wechselwirkungen mit anderen Inhibitoren oder in Kompetitionen mit positiven Cofaktoren wie TFIIA zustande kommen. Diese Ansicht wird durch Untersuchungen der  $\beta$ S52R-Mutation im Struktur-Modell des NC2 unterstützt. Die mutmaßliche TBP-Bindungsdomäne in NC2 $\beta$ , die Aminosäuren 85-99, welche eine  $\alpha$ -Helix außerhalb des Histone-Fold-Motives bilden ( $\alpha$ 4), befinden sich auf einer Proteinoberfläche, die gegenüber von Ser52 in hNC2 $\beta$  lokalisiert ist (Abb. 24).

Vier mutmaßliche Dimerisierungsmutanten wurden konstruiert und charakterisiert. Es handelt sich dabei um die Mutanten  $\alpha$ DE24,25GN,  $\alpha$ FL45,46LT,  $\beta$ VCC39,42,43MFV und  $\beta$ VCC39,42,43AAA. Die Positionen dieser Aminosäuren befinden sich im Inneren des NC2-

Dimer-Komplexes, wobei sich VCC39,42,43 exakt auf der inneren Oberfläche von NC2 $\beta$  gegenüber FL45,46 in NC2 $\alpha$  befindet (vgl. Abb 21). Verlust in der *in vivo*-Funktion wurden bei  $\alpha$ DE24,25GN und  $\alpha$ FL45,46LT beobachtet. Im Gegensatz zu den Mutanten  $\beta$ S52R und  $\beta$ E45K konnte bei den Mutanten  $\alpha$ DE24,25GN und  $\alpha$ FL45,46LT kein Defekt in der Komplexbildung mit TBP und DNA festgestellt werden. Auch in der Transkriptionsanalyse zeigte  $\alpha$ DE24,25GN nur einen minimalen Verlust (1,5-fach) in der Repression der Transkription des HIV- und AdML-Promotors. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei den zwei Doppelpunktmutanten  $\beta$ EE56,69RR und  $\beta$ EE76,89RR erhalten. Trotz des vollständigen Verlustes der NC2-Funktion *in vivo*, konnten keine Effekte in bisher durchgeführten Funktionsanalysen mit rekombinanten Proteinen detektiert werden.

Es existieren möglicherweise alternative Funktionsmechanismen von NC2 *in vivo*. NC2 wurde z.B. als positive Regulator auf die TATA-lose Transkription spezifischer Promotoren beschrieben (Lemaire *et al.*, 2000). Alternativ könnten die Mutanten auch Defekte in der Interaktion mit weiteren Transkriptionsregulatoren aufweisen. NC2 bindet stabil an TBP und verhindert dadurch die Assoziation weiterer generellen Transkriptionsfaktoren (Meisterernst and Roeder, 1991; Goppelt *et al.*, 1996). Es wird diskutiert, daß der virale Aktivator E1A das TBP von NC2 befreit und die Anlagerung von TFIIA ermöglicht (Kraus *et al.*, 1994). Auch transiente Transfektionsexperimente zeigten, daß E1A der NC2-abhängigen Transkriptionsrepression entgegen wirken kann (G. Stelzer, persönliche Mitteilung). *In vivo* könnten die Mutanten  $\alpha$ DE24,25GN,  $\beta$ EE56,69RR und  $\beta$ EE76,89RR in Promotor-spezifischen Funktionen von NC2 defekt sein oder auch in Wechselwirkungen mit Faktoren, die Einfluß auf die Initiationskomplexbildung haben.

## 5.8. Physiologische Rolle von NC2

Transkriptionsrepression ist ein wichtiger Mechanismus in der Regulation der Genexpression. Die eukaryontischen Repressoren können über unterschiedliche Komponenten der Transkriptionsmaschine auf unterschiedliche Ebene der Genexpression auswirken (Übersichtsartikel: Hanna and Hansen, 1996; Maldonado *et al.*, 1999). Die generelle Repressoren wirken direkt auf die Chromatine oder auf die Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie. NC2 ist einer der generellen negativen Cofaktoren, die direkt an TBP binden können. NC2 reprimiert die basale Transkription einer Reihe von Hefe-, humanen- und viralen Promotoren (Meisterernst and Roeder, 1991; Yeung *et al.*, 1994; T.K.Kim *et al.*, 1995; J.Kim *et al.*, 96; Goppelt and Meisterernst, 1996; Goppelt *et al.*, 1996; Mermelstein *et al.*, 1996; Gadboris *et al.*, 1997). Neulich wurde seine Funktion auf die aktivierende Transkription diskutiert (Castano *et al.*, 2000). NC2 interagiert physikalisch mit Komponenten des humanen Mediator-Komplexes und selektiv assoziiert zu RNA-Pol II mit

phosphorylierter CTD (carboxyl-terminalen Domäne) (Castano *et al.*, 2000). Die Verbindung zwischen NC2 und Pol II-Holoenzym wurde durch die Identifikation von NC2 als Suppressor der Mutationen in SRB4 und SRB6 unterstützt (Lee *et al.*, 1998). Suppressor-Mutationen gleicher Auswirkung sind auch in Genen des Not-Komplexes, NOT1 bis NOT5, entdeckt worden (Lee *et al.*, 1998). Die direkte Interaktion zwischen Not1 und TBP wurde beobachtet (Collart, 1996). Aus diesen Analysen kann man annehmen, daß NC2 gemeinsam mit dem Not-Komplex eine generelle Repression der Transkription über stabile Bindung an TBP aufrechterhält, welche durch das Pol II-Holoenzym während der Transkriptionsinitiation überwunden werden muß.

Das NC2 $\alpha$ -Protein aus Hefe wurde in einer genetischen Selektion des *SUC2*-Promotors mit deletierter Aktivierungselement (UAS) als Bur6 (bypass of UAS requirement) identifiziert. Aus gleichem Ansatz wurde das Mot1 als Bur3 isoliert (Prelich, 1997). Dies deutet darauf hin, daß NC2 und Mot1 teilweise überlappende Funktionen besitzen. Mot1 reguliert die Transkription durch die Freisetzung des TBP von Promotor in einem ATP-abhängigen Prozeß (Auble *et al.*, 1994). NC2 reguliert die Transkription über einen anderen Mechanismus, der sich folgendes von Mot1 unterscheidet. NC2 entfernt kein TBP von Promotor, es stabilisiert sie und verhindert aber dadurch die weitere Anlagerung von TFIIA und TFIIB an TBP (Meisterernst and Roeder, 1991; Goppelt *et al.*, 1996). Deletion an einer der Untereinheiten von NC2 oder an das Mot1 wirkt letal auf die Hefe, welche wiederum für eine unabhängige Funktion von NC2 und Mot1 spricht. Synergistische Effekte auf die Transkription durch ein Zusammenwirken von NC2 und Mot1 sind diskutiert worden (Cang *et al.*, 1999). Jüngste Untersuchungen haben gezeigt, daß NC2 sowie Mot1 für die TATA-lose Transkription der *HIS3*- und *HIS4*-Gene *in vivo* erforderlich sind (Lemaire *et al.*, 2000). Die TBP-Bindung an Promotor wird außerdem durch den generellen Transkriptionsfaktor TFIIA und den Transkriptionsaktivator Spt3 positiv beeinflusst.

Zusammengefaßt ist es durchaus denkbar, daß *in vivo* zwischen NC2 und anderen Corepressoren, wie Mot1 oder Not-Komplex und dem aktiven Regulator TFIIA oder Spt3 ein Synergismus existiert. Sie regulieren die Transkription durch Kontakte zu TBP gleichzeitig oder nacheinander. Dies geschieht damit das TBP, die Schlüssel-Komponente und der limitierende Faktor der Transkriptionsinitiation zwischen den starken Promotoren mit hoher Affinität zu TBP und schwächeren mit geringerer Affinität je nach Bedarf der Entwicklung und Zelldifferenzierung optimal verteilt wird. Die Identifikation einer Mutation in TFIIA als Suppressor für die essentielle NC2-Erfordernis in Hefe erbrachte überzeugenden Hinweis für diese Annahme und für eine koordinierte Funktionen zwischen positiven und negativen wirkenden Faktoren in der Transkriptionsregulation.

Es gibt auch Hinweise auf eine wachstumsabhängige Funktion von NC2 in Hefe (Lemaire *et al.*, 2000). Es wurde beobachtet, daß die Repressorfunktion von NC2 auf bestimmten Promotor sich verstärkt, wenn die Zellen von der exponentiellen Phase in die stationären Phase übergehen. Dieser Wendegang von Hefe ist oft von einer generellen Reduktion der

Genexpression begleitet mit Ausnahmen für die Genen, die für die spätere Phase der Hefe spezifisch sind (Werner *et al.*, 1993). Gleiche Effekte sind auch bei Mot1- und Not1-Protein erhalten worden (Lemaire *et al.*, 2000). Dies liefert erste Hinweise auf eine Aktivierung der globalen Repressoren durch spezifische physiologische Bedingungen.

## 5.9. Ausblicke

Eine interessante Aufgabe besteht darin, die möglichen Funktionszusammenhänge zwischen NC2 und Komponenten des RNA-Pol II-Holoenzym wie Sin4, oder anderen Corepressoren wie Mot1 besser zu verstehen. Hierzu könnte der Einfluß von Mutationen in NC2, Sin4 oder Mot1 auf die Expression der gesamten Klasse II-Gene mittels Gen-Chip analysiert werden. Ebenfalls wichtig ist die Bestimmung der TBP-Interaktionsdomäne auf NC2. Dadurch könnte der Repressionsmechanismus von NC2 ausführlicher geklärt werden. Eine weitere Fragestellung betrifft die Aufklärung der möglichen posttranslationalen Modifikationen von NC2 und die Bedeutung einer solchen Modifikation in lebenden Zellen. NC2 stellt möglicherweise ein Zielprotein für bestimmte Proteinkinasen dar.

Die bisherigen Erkenntnisse über die physiologische Rolle von NC2 stammen größtenteils aus Untersuchungen an der Hefe. Hinweise auf Spezies- und wachstumsabhängige Funktionen von NC2 sind vorhanden. Als zukünftige Aufgabe sollte deshalb ein *in vivo*-Modellsystem aus Zellen höherer Organismen etabliert werden, um Aufschluß über Funktionen des NC2 in verschiedenen Phasen des Zellzyklus, der Zelldifferenzierung und der embryonalen Entwicklung erzielen zu können.

## 6. Zusammenfassung

---

Biochemische Untersuchungen beschreiben NC2 als einen Transkriptionsrepressor, welcher stabil an das TATA-Box bindende Protein (TBP) bindet. Die spezifische Bindung von NC2 an TBP inhibiert die weitere Anlagerung der generellen Transkriptionsfaktoren TFIIA und TFIIB und führt dadurch zur Unterbrechung der Bildung des Initiationskomplexes. NC2 besteht aus zwei Untereinheiten, NC2 $\alpha$  und NC2 $\beta$ , die starke Homologien zu den Histonen H2A bzw. H2B aufweisen.

Alle Erkenntnisse zu Beginn dieser Arbeit basierten auf Beobachtungen, die *in vitro* erhalten wurden. Unklar sind die Funktionen von NC2 in der Zelle. Die Aufgabe dieser Arbeit bestand darin, ein *in vivo*-Modellsystem zu etablieren. Als Modellorganismus wurde die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ausgewählt. Hefe hat zwei Proteine, die stark homolog zum menschlichen NC2 sind. Beide sind essentiell für das vegetative Wachstum von Hefe. Für Plasmid-Austausch-Experimente wurden Hefestämme konstruiert, bei denen die chromosomalen Gene für NC2 $\alpha$  und NC2 $\beta$  durch Wildtyp-Kopien auf einem *URA3*-Plasmid ersetzt wurden. Mit Hilfe einer negativen Selektion gegen das *URA3*-Gen in Anwesenheit von 5-FOA gelang es, die humanen NC2 $\alpha$ - und NC2 $\beta$ -Gene als episomale Kopien in Hefe stabil einzubringen. So zeigte sich unter anderem, daß die beiden humanen NC2-Untereinheiten, sowohl einzeln in Kombination mit ihrem Dimerisierungspartner aus Hefe als auch gemeinsam in Form des menschlichen binären Komplexes, fähig waren, die physiologische Funktion ihres Gegenstückes aus Hefe zu übernehmen. Das gleiche System wurde auch eingesetzt, um Deletionsmutanten der humanen NC2-Gene *in vivo* zu untersuchen. Es wurde festgestellt, daß in beiden NC2-Untereinheiten die Domänen, welche für die *in vivo*-Funktion notwendig sind, die vom Mensch zur Hefe konservierten Regionen enthalten.

Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit bestand darin, spontane Suppressoren einer limitierenden NC2-Funktion *in vivo* zu isolieren und Suppressoren mit genomischen Punktmutationen zu charakterisieren. Gefunden wurde eine Punktmutation in der großen Untereinheit (Toa1) des Hefe-TFIIA, welche einen einzigen Aminosäure-Austausch von Valin zu Phenylalanin verursacht. Hefezellen, die diese Suppressor-Mutation in Toa1 (mt-Toa1) tragen, weisen einen Kälte-sensitiven Phänotyp auf und sind trotz fehlender NC2-Gene lebensfähig.

Die biochemischen Eigenschaften des rekombinanten Proteins der Suppressor-Mutante wurden durch Gelretardations-, Footprinting- und *in vitro* Transkriptionsexperimente untersucht. Das Protein mt-Toa1 war in der Lage, stabile TFIIA-Komplexe zusammen mit der kleinen Untereinheit Toa2 auszubilden und die Rekrutierung von TBP an die TATA-Box auf dem Promotor zu unterstützen. Allerdings zeigten weitere Untersuchungen der Suppressor-

Mutante, daß der ternäre Komplex aus mt-yTFIIA, TBP und DNA weniger stabil ist. Hinweise darauf gab die reduzierte Menge an Protein-DNA-Komplexen im Fall von mt-yTFIIA in Gelretardationsexperimenten unter sättigenden Bedingungen. Das mt-yTFIIA verlor zugleich seine Antirepressionsaktivität in *in vivo*-Transkriptionsexperimenten in Anwesenheit von NC2. Die Isolierung und Charakterisierung der Suppressor-Mutante von NC2 lieferten zum ersten Mal den Beweis, daß die Genregulation *in vivo* eine präzise Balance zwischen positiv und negativ wirkenden Aktivitäten erfordert. Gleichzeitig bestätigen sie die *in vitro* Beobachtungen, insbesondere das Gleichgewicht zwischen TFIIA und NC2 in der Konkurrenz um das TATA-bindende Protein TBP.

Eine weitere Aufgabe der Arbeit waren Mutagenese-Studien von humanem NC2 *in vivo* und *in vitro*. Innerhalb des Histone-Fold-Motives beider NC2-Untereinheiten wurden Punktmutanten isoliert, die ihre essentielle Funktion in der Hefezelle vollständig verloren haben. Es konnten Mutanten identifiziert werden, die Einfluß auf das Wachstum der Hefe mit dem Verlust der *in vitro*-Aktivität korrelierten. Die Charakterisierung dieser Mutanten lieferte erste Hinweise auf funktionelle Oberflächen von NC2, die für die ternäre Komplexbildung (NC2-TBP-DNA) und die Repressionsfunktion wichtig sind.

Zusammengefaßt schafft die vorliegende Arbeit einen Einblick in die NC2-Funktion in der Zelle und erweitert unser Verständnis über den molekularen Mechanismus der Transkriptionsregulation während der Initiation der Klasse II-Transkription.

## 7. Literaturverzeichnis

---

**Albright, S.R. and Tjian, R.** (2000) TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas. *Gene*, **242**, 11-13.

**Allison, L.A., Wong, J.K., Fitzpatrick, V.D., Moyle, M. and Ingles, C.J.** (1988) The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II of *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, and mammals: a conserved structure with an essential function. *Mol Cell Biol*, **8**, 321-329.

**Altting-Mees, M.A. and Short, J.M.** (1989) pBluescript II: gene mapping vectors. *Nucleic Acids Res.* **17**: 9494.

**Archambault, J., Chambers, R.S., Kobor, M.S., Ho, Y., Cartier, M., Bolotin, D., Andrews, B., Kane, C.M. and Greenblatt, J.** (1997) An essential component of a C-terminal domain phosphatase that interacts with transcription factor IIF in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 14300-14305.

**Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.C., Love, W.E. and Moudrianakis, E.N.** (1991) The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10148-10152.

**Arents, G. and Moudrianakis, E.N.** (1995) The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 11170-11174.

**Arents, G. and Moudrianakis, E.N.** (1993) Topography of the histone octamer surface: repeating structural motifs utilized in the docking of nucleosomal DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 10489-10493.

**Auble, D.T. and Hahn, S.** (1993) An ATP-dependent inhibitor of TBP binding to DNA. *Genes Dev*, **7**, 844-856.

**Auble, D.T., Hansen, K.E., Mueller, C.G., Lane, W.S., Thorner, J. and Hahn, S.** (1994) Mot1, a global repressor of RNA polymerase II transcription, inhibits TBP binding to DNA by an ATP-dependent mechanism. *Genes Dev*, **8**, 1920-1934.

**Auble, D.T., Wang, D., Post, K.W. and Hahn, S.** (1997) Molecular analysis of the SNF2/SWI2 protein family member MOT1, an ATP-driven enzyme that dissociates TATA-binding protein from DNA. *Mol Cell Biol*, **17**, 4842-4851.

**Banerji, J., Rusconi, S. and Schaffner, W.** (1981) Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell*, 299-308.

- Bartolomei, M.S., Halden, N.F., Cullen, C.R. and Corden, J.L.** (1988) Genetic analysis of the repetitive carboxyl-terminal domain of the largest subunit of mouse RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*, **8**, 330-339.
- Bauer, W.R., Hayes, J.J., White, J.H. and Wolffe, A.P.** (1994) Nucleosome structural changes due to acetylation. *J Mol Biol*, **236**, 685-690.
- Bellorini, M., Lee, D.K., Dantoni, J.C., Zemzoumi, K., Roeder, R.G., Tora, L. and Mantovani, R.** (1997a) CCAAT binding NF-Y-TBP interactions: NF-YB and NF-YC require short domains adjacent to their histone fold motifs for association with TBP basic residues. *Nucleic Acids Res*, **25**, 2174-2181.
- Bellorini, M., Zemzoumi, K., Farina, A., Berthelsen, J., Piaggio, G. and Mantovani, R.** (1997b) Cloning and expression of human NF-YC. *Gene*, **193**, 119-125.
- Birck, C., Poch, O., Romier, C., Ruff, M., Mengus, G., Lavigne, A.C., Davidson, I. and Moras, D.** (1998) Human TAF(II)28 and TAF(II)18 interact through a histone fold encoded by atypical evolutionary conserved motifs also found in the SPT3 family. *Cell*, **94**, 239-249.
- Bjorklund, S. and Kim, Y.J.** (1996) Mediator of transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci*, **21**, 335-337.
- Boeke, J.D., LaCrute, F. and Fink, G.R.** (1984) A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol Gen Genet*, **197**, 345-346.
- Brand, M., Yamamoto, K., Staub, A. and Tora, L.** (1999) Identification of TATA-binding protein-free TAFII-containing complex subunits suggests a role in nucleosome acetylation and signal transduction. *J Biol Chem*, **274**, 18285-18289.
- Brown, P.A. and Szostak, J.W.** (1983) Yeast vectors with negative selection. *Methods Enzymol*, **101**, 278-290.
- Brownell, J.E., Zhou, J., 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.
- Buratowski, S., Hahn, S., Guarente, L. and Sharp, P.A.** (1989) Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell*, **56**, 549-561.
- Buratowski, S. and Zhou, H.** (1992) Transcription factor IID mutants defective for interaction with transcription factor IIA. *Science*, **255**, 1130-1132.

**Burke, T.W. and Kadonaga, J.T.** (1996) Drosophila TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev*, **10**, 711-724.

**Burley, S.K. and Roeder, R.G.** (1996) Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu Rev Biochem*, **65**, 769-799.

**Cang, Y., Auble, D.T. and Prelich, G.** (1999) A new regulatory domain on the TATA-binding protein. *EMBO J*, **18**, 6662-6671.

**Castano, E., Gross, P., Wang, Z., Roeder, R.G. and Oelgeschlager, T.** (2000) The C-terminal domain-phosphorylated IIO form of RNA polymerase II is associated with the transcription repressor NC2 (Dr1/DRAP1) and is required for transcription activation in human nuclear extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7184-7189.

**Chao, D.M., Gadbois, E.L., Murray, P.J., Anderson, S.F., Sonu, M.S., Parvin, J.D. and Young, R.A.** (1996) A mammalian SRB protein associated with an RNA polymerase II holoenzyme. *Nature*, **380**, 82-85.

**Chen, S., West, R.J., Johnson, S.L., Gans, H., Kruger, B. and Ma, J.** (1993) TSF3, a global regulatory protein that silences transcription of yeast GAL genes, also mediates repression by alpha 2 repressor and is identical to SIN4. *Mol Cell Biol*, **13**, 831-840.

**Chevray, P.M. and Nathans, D.** (1992) Protein interaction cloning in yeast: identification of mammalian proteins that react with the leucine zipper of Jun. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 5789-5793.

**Chi, T. and Carey, M.** (1996) Assembly of the isomerized TFIIA-TFIID-TATA ternary complex is necessary and sufficient for gene activation. *Genes Dev*, **10**, 2540-2550.

**Cho, H., Kim, T.K., Mancebo, H., Lane, W.S., Flores, O. and Reinberg, D.** (1999) A protein phosphatase functions to recycle RNA polymerase II. *Genes Dev*, **13**, 1540-1552.

**Christianson, T.W., Sikorski, R.S., Dante, M., Shero, J.H. and Hieter, P.** (1992) Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene*, **110**, 119-122.

**Cisek, L.J. and Corden, J.L.** (1989) Phosphorylation of RNA polymerase by the murine homologue of the cell-cycle control protein cdc2. *Nature*, **339**, 679-684.

**Coleman, R.A. and Pugh, B.F.** (1995) Evidence for functional binding and stable sliding of the TATA binding protein on nonspecific DNA. *J Biol Chem*, **270**, 13850-13859.

**Coleman, R.A. and Pugh, B.F.** (1997) Slow dimer dissociation of the TATA binding protein dictates the kinetics of DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 7221-7226.

- 
- Coleman, R.A., Taggart, A.K., Benjamin, L.R. and Pugh, B.F.** (1995) Dimerization of the TATA binding protein. *J Biol Chem*, **270**, 13842-13849.
- Coleman, R.A., Taggart, A.K., Burma, S., Chicca, J.n. and Pugh, B.F.** (1999) TFIIA regulates TBP and TFIID dimers. *Mol Cell*, **4**, 451-457.
- Collart, M.A.** (1996) The NOT, SPT3, and MOT1 genes functionally interact to regulate transcription at core promoters. *Mol Cell Biol*, **16**, 6668-6676.
- Collart, M.A. and Struhl, K.** (1993) CDC39, an essential nuclear protein that negatively regulates transcription and differentially affects the constitutive and inducible HIS3 promoters. *EMBO J*, **12**, 177-186.
- Collart, M.A. and Struhl, K.** (1994) NOT1(CDC39), NOT2(CDC36), NOT3, and NOT4 encode a global-negative regulator of transcription that differentially affects TATA-element utilization. *Genes Dev*, **8**, 525-537.
- Conaway, R.C. and Conaway, J.W.** (1993) General initiation factors for RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem*, **62**, 161-190.
- Cooper, J.P., Roth, S.Y. and Simpson, R.T.** (1994) The global transcriptional regulators, SSN6 and TUP1, play distinct roles in the establishment of a repressive chromatin structure. *Genes Dev*, **8**, 1400-1410.
- Corden, J.L.** (1990) Tails of RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci*, **15**, 383-387.
- Cortes, P., Flores, O. and Reinberg, D.** (1992) Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: purification and analysis of transcription factor IIA and identification of transcription factor IJ. *Mol Cell Biol*, **12**, 413-421.
- Costello, J.F., Futscher, B.W., Kroes, R.A. and Pieper, R.O.** (1994) Methylation-related chromatin structure is associated with exclusion of transcription factors from and suppressed expression of the O-6-methylguanine DNA methyltransferase gene in human glioma cell lines. *Mol Cell Biol*, **14**, 6515-6521.
- Coustry, F., Maity, S.N., Sinha, S. and de, C.B.** (1996) The transcriptional activity of the CCAAT-binding factor CBF is mediated by two distinct activation domains, one in the CBF-B subunit and the other in the CBF-C subunit. *J Biol Chem*, **271**, 14485-14491.
- Cramer, P., Bushnell, D.A., Fu, J., Gnatt, A.L., Maier, D.B., Thompson, N.E., Burgess, R.R., Edwards, A.M., David, P.R. and Kornberg, R.D.** (2000) Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science*, **288**, 640-649.

- Dahmus, M.E.** (1996a) Phosphorylation of mammalian RNA polymerase II. *Methods Enzymol*, **273**, 185-193.
- Dahmus, M.E.** (1996b) Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem*, **271**, 19009-19012.
- de, M.J., Kern, L., Hubert, J.C. and Lacroute, F.** (1990) Cloning and sequencing of URA10, a second gene encoding orotate phosphoribosyl transferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, **17**, 105-111.
- DeJong, J. and Roeder, R.G.** (1993) A single cDNA, hTFIIA/alpha, encodes both the p35 and p19 subunits of human TFIIA. *Genes Dev*, **7**, 2220-2234.
- Del Sal, G., Mantioletti, G. and Schneider, C.** (1988) A one-tube plasmid mini-preparation suitable for sequencing. *Nucleic Acid Res.* **16**, 9878.
- Drysdale, C.M., Jackson, B.M., McVeigh, R., Klebanow, E.R., Bai, Y., Kokubo, T., Swanson, M., Nakatani, Y., Weil, P.A. and Hinnebusch, A.G.** (1998) The Gcn4p activation domain interacts specifically *in vitro* with RNA polymerase II holoenzyme, TFIID, and the Adap-Gcn5p coactivator complex. *Mol Cell Biol*, **18**, 1711-1724.
- Dubois, M.F., Marshall, N.F., Nguyen, V.T., Dahmus, G.K., Bonnet, F., Dahmus, M.E. and Bensaude, O.** (1999) Heat shock of HeLa cells inactivates a nuclear protein phosphatase specific for dephosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nucleic Acids Res*, **27**, 1338-1344.
- Dynlacht, B.D., Hoey, T. and Tjian, R.** (1991) Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell*, **66**, 563-576.
- Eick, D., Wedel, A. and Heumann, H.** (1994) From initiation to elongation: comparison of transcription by prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases. *Trends Genet*, **10**, 292-296.
- Emami, K.H., Jain, A. and Smale, S.T.** (1997) Mechanism of synergy between TATA and initiator: synergistic binding of TFIID following a putative TFIIA-induced isomerization. *Genes Dev*, **11**, 3007-3019.
- Gadbois, E.L., Chao, D.M., Reese, J.C., Green, M.R. and Young, R.A.** (1997) Functional antagonism between RNA polymerase II holoenzyme and global negative regulator NC2 *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3145-3150.
- Galas, D.J. and Schmitz, A.** (1978) DNase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res*, **5**, 3157-3170.

- Ge, H., Martinez, E., Chiang, C.M. and Roeder, R.G.** (1996) Activator-dependent transcription by mammalian RNA polymerase II: in vitro reconstitution with general transcription factors and cofactors. *Methods Enzymol*, **274**, 57-71.
- Geiger, J.H., Hahn, S., Lee, S. and Sigler, P.B.** (1996) Crystal structure of the yeast TFIIA/TBP/DNA complex. *Science*, **272**, 830-836.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R. and Woods, R.A.** (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, **11**, 355-360.
- Goppelt, A. and Meisterernst, M.** (1996) Characterization of the basal inhibitor of class II transcription NC2 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **24**, 4450-4455.
- Goppelt, A., Stelzer, G., Lottspeich, F. and Meisterernst, M.** (1996) A mechanism for repression of class II gene transcription through specific binding of NC2 to TBP-promoter complexes via heterodimeric histone fold domains. *EMBO J*, **15**, 3105-3116.
- Grant, P.A., Duggan, L., Cote, J., Roberts, S.M., Brownell, J.E., Candau, R., Ohba, R., Owen, H.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.
- Grant, P.A., Eberharter, A., John, S., Cook, R.G., Turner, B.M. and Workman, J.L.** (1999) Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes. *J Biol Chem*, **274**, 5895-5900.
- Grant, P.A., Schieltz, D., Pray, G.M., Steger, D.J., Reese, J.C., Yates, J.r. and Workman, J.L.** (1998a) A subset of TAF(II)s are integral components of the SAGA complex required for nucleosome acetylation and transcriptional stimulation. *Cell*, **94**, 45-53.
- Grant, P.A., Sterner, D.E., Duggan, L.J., Workman, J.L. and Berger, S.L.** (1998b) The SAGA unfolds: convergence of transcription regulators in chromatin-modifying complexes. *Trends Cell Biol*, **8**, 193-197.
- Grunstein, M.** (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, **389**, 349-352.
- Hahn, S., Buratowski, S., Sharp, P.A. and Guarente, L.** (1989) Identification of a yeast protein homologous in function to the mammalian general transcription factor, TFIIA. *EMBO J*, **8**, 3379-3382.
- 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.
- Hampsey, M.** (1998) Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 465-503.

- Hampsey, M. and Reinberg, D.** (1999) RNA polymerase II as a control panel for multiple coactivator complexes. *Curr Opin Genet Dev*, **9**, 132-139.
- Han, K. and Manley, J.L.** (1993) Transcriptional repression by the Drosophila even-skipped protein: definition of a minimal repression domain. *Genes Dev*, **7**, 491-503.
- Hanna, R.W. and Hansen, U.** (1996) Active repression mechanisms of eukaryotic transcription repressors. *Trends Genet*, **12**, 229-234.
- Hansen, S.K., Takada, S., Jacobson, R.H., Lis, J.T. and Tjian, R.** (1997) Transcription properties of a cell type-specific TATA-binding protein, TRF. *Cell*, **91**, 71-83.
- Hansen, S.K. and Tjian, R.** (1995) TAFs and TFIIA mediate differential utilization of the tandem Adh promoters. *Cell*, **82**, 565-575.
- Hengartner, C.J., Myer, V.E., Liao, S.M., Wilson, C.J., Koh, S.S. and Young, R.A.** (1998) Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases. *Mol Cell*, **2**, 43-53.
- Hengartner, C.J., Thompson, C.M., Zhang, J., Chao, D.M., Liao, S.M., Koleske, A.J., Okamura, S. and Young, R.A.** (1995) Association of an activator with an RNA polymerase II holoenzyme. *Genes Dev*, **9**, 897-910.
- Henzel, M.J., Wei, Y., Mancini, M.A., Van, H.A., Ranalli, T., Brinkley, B.R., Bazett, J.D. and Allis, C.D.** (1997) Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*, **106**, 348-360.
- Hernandez, N.** (1993) TBP, a universal eukaryotic transcription factor?. *Genes Dev*, 1291-1308.
- Hochuli, E., Dobeli, H. and Schacher, A.** (1987) New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr*, **411**, 177-184.
- Hoffmann, A. and Roeder, R.G.** (1991) Purification of his-tagged proteins in non-denaturing conditions suggests a convenient method for protein interaction studies. *Nucleic Acids Res*, **19**, 6337-6338.
- Hoffman, C.S. and Winston, F.** (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, **57**, 267-272.
- 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.

- 
- Holstege, F. and Young, R.A.** (1999) Transcriptional regulation: contending with complexity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2-4.
- Hoopes, B.C., LeBlanc, J.F. and Hawley, D.K.** (1992) Kinetic analysis of yeast TFIID-TATA box complex formation suggests a multi-step pathway. *J Biol Chem*, **267**, 11539-11547.
- Hope, I.A. and Struhl, K.** (1986) Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell*, **46**, 885-894.
- Ikeda, K., Halle, J.P., Stelzer, G., Meisterernst, M. and Kawakami, K.** (1998) Involvement of negative cofactor NC2 in active repression by zinc finger-homeodomain transcription factor AREB6. *Mol Cell Biol*, **18**, 10-18.
- Inostroza, J.A., Mermelstein, F.H., Ha, I., Lane, W.S. and Reinberg, D.** (1992) Dr1, a TATA-binding protein-associated phosphoprotein and inhibitor of class II gene transcription. *Cell*, **70**, 477-489.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A.** (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**:163-168.
- Jacob, F. and Monod, J.** (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* **3**: 318-356.
- Jackson, F.A., Chitikila, C., Mitra, M. and Pugh, B.F.** (1999) A role for TBP dimerization in preventing unregulated gene expression. *Mol Cell*, **3**, 717-727.
- Jiang, Y.W., Dohrmann, P.R. and Stillman, D.J.** (1995) Genetic and physical interactions between yeast RGR1 and SIN4 in chromatin organization and transcriptional regulation. *Genetics*, **140**, 47-54.
- Jiang, Y.W. and Stillman, D.J.** (1992) Involvement of the SIN4 global transcriptional regulator in the chromatin structure of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **12**, 4503-4514.
- Johnson, A.D.** (1995) The price of repression. *Cell*, **81**, 655-658.
- Jones, K.A., Jackson, F.A., Burma, S., Portnoy, M., Schneeweis, L.A., Coleman, R.A., Mitra, M., Chitikila, C. and Pugh, B.F.** (1999) Dimer dissociation and thermosensitivity kinetics of the *Saccharomyces cerevisiae* and human TATA binding proteins. *Biochemistry*, **38**, 11340-11348.
- Jones, K.A., Kadonaga, J.T., Rosenfeld, P.J., Kelly, T.J. and Tjian, R.** (1987) A cellular DNA-binding protein that activates eukaryotic transcription and DNA replication. *Cell*, **48**, 79-89.
- Kadonaga, J.T., Rosenfeld, P.J., Kelly, T.J. and Tjian, R.** (1987) A cellular DNA-binding protein that activates eukaryotic transcription and DNA replication. *Cell*, **48**, 79-89.

- Kaiser, K. and Meisterernst, M.** (1996) The human general co-factors. *Trends Biochem Sci*, **21**, 342-345.
- Kaiser, K., Stelzer, G. and Meisterernst, M.** (1995) The coactivator p15 (PC4) initiates transcriptional activation during TFIIA-TFIID-promoter complex formation. *EMBO J*, **14**, 3520-3527.
- Kang, J.J., Auble, D.T., Ranish, J.A. and Hahn, S.** (1995) Analysis of the yeast transcription factor TFIIA: distinct functional regions and a polymerase II-specific role in basal and activated transcription. *Mol Cell Biol*, **15**, 1234-1243.
- Kass, S.U., Landsberger, N. and Wolffe, A.P.** (1997a) DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr Biol*, **7**, 157-165.
- Kass, S.U., Pruss, D. and Wolffe, A.P.** (1997b) How does DNA methylation repress transcription?. *Trends Genet*, **13**, 444-449.
- Kass, S.U. and Wolffe, A.P.** (1998) DNA methylation, nucleosomes and the inheritance of chromatin structure and function. *Novartis Found Symp*, **214**, 22-35.
- Kim, I.S., Sinha, S., de, C.B. and Maity, S.N.** (1996) Determination of functional domains in the C subunit of the CCAAT- binding factor (CBF) necessary for formation of a CBF-DNA complex: CBF- B interacts simultaneously with both the CBF-A and CBF-C subunits to form a heterotrimeric CBF molecule. *Mol Cell Biol*, **16**, 4003-4013.
- Kim, J.L., Nikolov, D.B. and Burley, S.K.** (1993) Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of a TATA element. *Nature*, **365**, 520-527.
- Kim, J., Parvin, J.D., Shykind, B.M. and Sharp, P.A.** (1996) A negative cofactor containing Dr1/p19 modulates transcription with TFIIA in a promoter-specific fashion. *J Biol Chem*, **271**, 18405-18412.
- Kim, S.J., Na, J.G., Hampsey, M. and Reinberg, D.** (1997) The Dr1/DRAP1 heterodimer is a global repressor of transcription *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 820-825.
- Kim, S.J., Cabane, K., Hampsey, M. and Reinberg, D.** (2000) Genetic analysis of the YDR1-BUR6 repressor complex reveals an intricate balance among transcriptional regulatory proteins in yeast. *Mol Cell Biol*, **20**, 2455-2465.
- Kim, T.K., Hashimoto, S., Kelleher, R.r., Flanagan, P.M., Kornberg, R.D., Horikoshi, M. and Roeder, R.G.** (1994) Effects of activation-defective TBP mutations on transcription initiation in yeast. *Nature*, **369**, 252-255.

- 
- Kim, T.K., Zhao, Y., Ge, H., Bernstein, R. and Roeder, R.G.** (1995) TATA-binding protein residues implicated in a functional interplay between negative cofactor NC2 (Dr1) and general factors TFIIA and TFIIB. *J Biol Chem*, **270**, 10976-10981.
- Kim, Y.J., Bjorklund, S., Li, Y., Sayre, M.H. and Kornberg, R.D.** (1994) A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell*, **77**, 599-608.
- Klein, C. and Struhl, K.** (1994) Increased recruitment of TATA-binding protein to the promoter by transcriptional activation domains *in vivo*. *Science*, **266**, 280-282.
- Kobayashi, N., Boyer, T.G. and Berk, A.J.** (1995) A class of activation domains interacts directly with TFIIA and stimulates TFIIA-TFIID-promoter complex assembly. *Mol Cell Biol*, **15**, 6465-6473.
- Koh, S.S., Ansari, A.Z., Ptashne, M. and Young, R.A.** (1998) An activator target in the RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell*, **1**, 895-904.
- Koleske, A.J. and Young, R.A.** (1994) An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature*, **368**, 466-469.
- Koleske, A.J. and Young, R.A.** (1995) The RNA polymerase II holoenzyme and its implications for gene regulation. *Trends Biochem Sci*, **20**, 113-116.
- Krajewski, W.A. and Becker, P.B.** (1998) Reconstitution of hyperacetylated, DNase I-sensitive chromatin characterized by high conformational flexibility of nucleosomal DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 1540-1545.
- Kraus, V.B., Inostroza, J.A., Yeung, K., Reinberg, D. and Nevins, J.R.** (1994) Interaction of the Dr1 inhibitory factor with the TATA binding protein is disrupted by adenovirus E1A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 6279-6282.
- Kretzschmar, M., Stelzer, G., Roeder, R.G. and Meisterernst, M.** (1994) RNA polymerase II cofactor PC2 facilitates activation of transcription by GAL4-AH *in vitro*. *Mol Cell Biol*, **14**, 3927-3937.
- Kunkel, T.A., Roberts, J.D. and Zakour, R.A.** (1987) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol*, **154**, 367-382.
- Kuo, M.H. and Allis, C.D.** (1998) Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays*, **20**, 615-626.

**Kuromori, T. and Yamamoto, M.** (1994) Cloning of cDNAs from *Arabidopsis thaliana* that encode putative protein phosphatase 2C and a human Dr1-like protein by transformation of a fission yeast mutant. *Nucleic Acids Res*, **22**, 5296-5301.

**Lavigne, A.C., Gangloff, Y.G., Carre, L., Mengus, G., Birck, C., Poch, O., Romier, C., Moras, D. and Davidson, I.** (1999) Synergistic transcriptional activation by TATA-binding protein and hTAFII28 requires specific amino acids of the hTAFII28 histone fold. *Mol Cell Biol*, **19**, 5050-5060.

**Lagrange, T., Kapanidis, A.N., Tang, H., Reinberg, D. and Ebright, R.H.** (1998) New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev*, **12**, 34-44.

**Lagrange, T., Kim, T.K., Orphanides, G., Ebright, Y.W., Ebright, R.H. and Reinberg, D.** (1996) High-resolution mapping of nucleoprotein complexes by site-specific protein-DNA photocrosslinking: organization of the human TBP-TFIIA-TFIIB-DNA quaternary complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 10620-10625.

**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. and Lis, J.T.** (1998) Transcriptional activation independent of TFIID kinase and the RNA polymerase II mediator *in vivo*. *Nature*, **393**, 389-392.

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

**Lee, T.I., Wyrick, J.J., Koh, S.S., Jennings, E.G., Gadbois, E.L. and Young, R.A.** (1998) Interplay of positive and negative regulators in transcription initiation by RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell Biol*, **18**, 4455-4462.

**Lee, T.I. and Young, R.A.** (1998) Regulation of gene expression by TBP-associated proteins. *Genes Dev*, **12**, 1398-1408.

**Lefstin, J.A. and Yamamoto, K.R.** (1998) Allosteric effects of DNA on transcriptional regulators. *Nature*, **392**, 885-888.

**Lemaire, M., Xie, J., Meisterernst, M. and Collart, M.A.** (2000) The NC2 repressor is dispensable in yeast mutated for the Sin4p component of the holoenzyme and plays roles similar to Mot1p *in vivo*. *Mol Microbiol*, **36**, 163-173.

**LeRoy, G., Orphanides, G., Lane, W.S. and Reinberg, D.** (1998) Requirement of RSF and FACT for transcription of chromatin templates *in vitro*. *Science*, **282**, 1900-1904.

- Li, Y., Bjorklund, S., Kim, Y.J. and Kornberg, R.D.** (1996) Yeast RNA polymerase II holoenzyme. *Methods Enzymol*, **273**, 172-175.
- Li, Y., Bjorklund, S., Jiang, Y.W., Kim, Y.J., Lane, W.S., Stillman, D.J. and Kornberg, R.D.** (1995) Yeast global transcriptional regulators Sin4 and Rgr1 are components of mediator complex/RNA polymerase II holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 10864-10868.
- Liao, S.M., Zhang, J., Jeffery, D.A., Koleske, A.J., Thompson, C.M., Chao, D.M., Viljoen, M., van, V.H. and Young, R.A.** (1995) A kinase-cyclin pair in the RNA polymerase II holoenzyme. *Nature*, **374**, 193-196.
- Licht, J.D., Hanna, R.W., Reddy, J.C., English, M.A., Ro, M., Grossel, M., Shaknovich, R. and Hansen, U.** (1994) Mapping and mutagenesis of the amino-terminal transcriptional repression domain of the Drosophila Kruppel protein. *Mol Cell Biol*, **14**, 4057-4066.
- Licht, J.D., Ro, M., English, M.A., Grossel, M. and Hansen, U.** (1993) Selective repression of transcriptional activators at a distance by the Drosophila Kruppel protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 11361-11365.
- 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.
- Luger, K. and Richmond, T.J.** (1998) DNA binding within the nucleosome core. *Curr Opin Struct Biol*, **8**, 33-40.
- Ma, D., Olave, I., Merino, A. and Reinberg, D.** (1996) Separation of the transcriptional coactivator and antirepression functions of transcription factor IIA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 6583-6588.
- Macatee, T., Jiang, Y.W., Stillman, D.J. and Roth, S.Y.** (1997) Global alterations in chromatin accessibility associated with loss of SIN4 function. *Nucleic Acids Res*, **25**, 1240-1247.
- Madden, S.L., Cook, D.M. and Rauscher, F.d.** (1993) A structure-function analysis of transcriptional repression mediated by the WT1, Wilms' tumor suppressor protein. *Oncogene*, **8**, 1713-1720.
- Madison, J.M. and Winston, F.** (1997) Evidence that Spt3 functionally interacts with Mot1, TFIIA, and TATA-binding protein to confer promoter-specific transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **17**, 287-295.
- Maldonado, E., Ha, I., Cortes, P., Weis, L. and Reinberg, D.** (1990) Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: role of transcription factors IIA, IID, and IIB during formation of a transcription-competent complex. *Mol Cell Biol*, **10**, 6335-6347.

- Maldonado, E., Hampsey, M. and Reinberg, D.** (1999) Repression: targeting the heart of the matter. *Cell*, **99**, 455-458.
- Maldonado, E., Shiekhatar, R., Sheldon, M., Cho, H., Drapkin, R., Rickert, P., Lees, E., Anderson, C.W., Linn, S. and Reinberg, D.** (1996) A human RNA polymerase II complex associated with SRB and DNA-repair proteins *Nature*, **381**, 86-89.
- Malik, S. and Roeder, R.G.** (2000) Transcriptional regulation through Mediator-like coactivators in yeast and metazoan cells. *Trends Biochem Sci*, **25**, 277-283.
- Maity, S.N. and de, C.B.** (1998) Role of the CCAAT-binding protein CBF/NF-Y in transcription. *Trends Biochem Sci*, **23**, 174-178.
- Marshall, N.F., Peng, J., Xie, Z. and Price, D.H.** (1996) Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase. *J Biol Chem*, **271**, 27176-27183.
- Martinez, E., Chiang, C.M., Ge, H. and Roeder, R.G.** (1994) TATA-binding protein-associated factor(s) in TFIID function through the initiator to direct basal transcription from a TATA-less class II promoter. *EMBO J*, **13**, 3115-3126.
- Matsui, T., Segall, J., Weil, P.A. and Roeder, R.G.** (1980) Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II. *J Biol Chem*, **255**, 11992-11996.
- Meisterernst, M., Horikoshi, M. and Roeder, R.G.** (1990) Recombinant yeast TFIID, a general transcription factor, mediates activation by the gene-specific factor USF in a chromatin assembly assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 9153-9157.
- Meisterernst, M. and Roeder, R.G.** (1991) Family of proteins that interact with TFIID and regulate promoter activity. *Cell*, **67**, 557-567.
- Meisterernst, M., Roy, A.L., Lieu, H.M. and Roeder, R.G.** (1991) Activation of class II gene transcription by regulatory factors is potentiated by a novel activity. *Cell*, **66**, 981-993.
- Merino, A., Madden, K.R., Lane, W.S., Champoux, J.J. and Reinberg, D.** (1993) DNA topoisomerase I is involved in both repression and activation of transcription. *Nature*, **365**, 227-232.
- Mermelstein, F., Yeung, K., Cao, J., Inostroza, J.A., Erdjument, B.H., Egelson, K., Landsman, D., Levitt, P., Tempst, P. and Reinberg, D.** (1996) Requirement of a corepressor for Dr1-mediated repression of transcription. *Genes Dev*, **10**, 1033-1048.

- Mermelstein, F., Yeung, K., Cao, J., Inostroza, J.A., Erdjument, B.H., Eagelson, K., Landsman, D., Levitt, P., Tempst, P. and Reinberg, D.** (1996) Requirement of a corepressor for Dr1-mediated repression of transcription. *Genes Dev*, **10**, 1033-1048.
- Mishra, R.K. and Chatterji, D.** (1993) Mechanism of initiation of transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase on supercoiled template. *Mol Microbiol*, **8**, 507-515.
- Mizzen, C.A., Yang, X.J., Kokubo, T., Brownell, J.E., Bannister, A.J., Owen, H.T., Workman, J., Wang, L., Berger, S.L., Kouzarides, T., Nakatani, Y. and Allis, C.D.** (1996) The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell*, **87**, 1261-1270.
- Moreau, P., Hen, R., Wasyluk, B., Everett, R., Gaub, M.P. and Chambon, P.** (1981) The SV40 72 base repair repeat has a striking effect on gene expression both in SV40 and other chimeric recombinants. *Nucleic Acids Res*, **9**, 6047-6068.
- Moudrianakis, E.N. and Arents, G.** (1993) Structure of the histone octamer core of the nucleosome and its potential interactions with DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **58**, 273-279.
- Muldrow, T.A., Campbell, A.M., Weil, P.A. and Auble, D.T.** (1999) MOT1 can activate basal transcription *in vitro* by regulating the distribution of TATA binding protein between promoter and nonpromoter sites. *Mol Cell Biol*, **19**, 2835-2845.
- Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N. and Bird, A.** (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, **393**, 386-389.
- Nikolov, D.B. and Burley, S.K.** (1994) 2.1 Å resolution refined structure of a TATA box-binding protein (TBP). *Nat Struct Biol*, **1**, 621-637.
- Nikolov, D.B., Chen, H., Halay, E.D., Usheva, A.A., Hisatake, K., Lee, D.K., Roeder, R.G. and Burley, S.K.** (1995) Crystal structure of a TFIIB-TBP-TATA-element ternary complex. *Nature*, **377**, 119-128.
- Nonet, M., Scafe, C., Sexton, J. and Young, R.** (1987) Eucaryotic RNA polymerase conditional mutant that rapidly ceases mRNA synthesis. *Mol Cell Biol*, **7**, 1602-1611.
- Novina, C.D. and Roy, A.L.** (1996) Core promoters and transcriptional control. *Trends Genet*, **12**, 351-355.
- Oberholzer, U. and Collart, M.A.** (1998) Characterization of NOT5 that encodes a new component of the Not protein complex. *Gene*, **207**, 61-69.

- O'Brien, T., Hardin, S., Greenleaf, A. and Lis, J.T.** (1994) Phosphorylation of RNA polymerase II C-terminal domain and transcriptional elongation. *Nature*, **370**, 75-77.
- Ogryzko, V.V., Kotani, T., Zhang, X., Schlitz, R.L., Howard, T., Yang, X.J., Howard, B.H., Qin, J. and Nakatani, Y.** (1998) Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex. *Cell*, **94**, 35-44.
- Ogryzko, V.V., Schlitz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H. and Nakatani, Y.** (1996) The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, **87**, 953-959.
- Olave, I., Reinberg, D. and Vales, L.D.** (1998) The mammalian transcriptional repressor RBP (CBF1) targets TFIID and TFIIA to prevent activated transcription. *Genes Dev*, **12**, 1621-1637.
- Orphanides, G., LeRoy, G., Chang, C.H., Luse, D.S. and Reinberg, D.** (1998) FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell*, **92**, 105-116.
- Orphanides, G., Wu, W.H., Lane, W.S., Hampsey, M. and Reinberg, D.** (1999) The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins. *Nature*, **400**, 284-288.
- Orphanides, G., Lagrange, T. and Reinberg, D.** (1996) The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev*, **10**, 2657-2683.
- Ozer, J., Lezina, L.E., Ewing, J., Audi, S. and Lieberman, P.M.** (1998a) Association of transcription factor IIA with TATA binding protein is required for transcriptional activation of a subset of promoters and cell cycle progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **18**, 2559-2570.
- Ozer, J., Mitsouras, K., Zerby, D., Carey, M. and Lieberman, P.M.** (1998b) Transcription factor IIA derepresses TATA-binding protein (TBP)-associated factor inhibition of TBP-DNA binding. *J Biol Chem*, **273**, 14293-14300.
- Ozer, J., Moore, P.A., Bolden, A.H., Lee, A., Rosen, C.A. and Lieberman, P.M.** (1994) Molecular cloning of the small (gamma) subunit of human TFIIA reveals functions critical for activated transcription. *Genes Dev*, **8**, 2324-2335.
- Papavassiliou, A.G.** (1994) 1,10-Phenanthroline-copper ion nuclease footprinting of DNA-protein complexes in situ following mobility-shift electrophoresis assays. Chapter 5, *Methods Mol. Biol.* **30**, 43-77.
- Parvin, J.D. and Young, R.A.** (1998) Regulatory targets in the RNA polymerase II holoenzyme. *Curr Opin Genet Dev*, **8**, 565-570.

- 
- Payne, J.M. and Dahmus, M.E.** (1993) Partial purification and characterization of two distinct protein kinases that differentially phosphorylate the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase subunit IIa. *J Biol Chem*, **268**, 80-87.
- Peng, J., Marshall, N.F. and Price, D.H.** (1998) Identification of a cyclin subunit required for the function of Drosophila P-TEFb. *J Biol Chem*, **273**, 13855-13860.
- Pitulle, C., Kleinedam, R.G., Sproat, B. and Krupp, G.** (1992) Initiator oligonucleotides for the combination of chemical and enzymatic RNA synthesis. *Gene*, **112**, 101-105.
- Prelich, G.** (1997) *Saccharomyces cerevisiae* BUR6 encodes a DRAP1/NC2alpha homolog that has both positive and negative roles in transcription *in vivo*. *Mol Cell Biol*, **17**, 2057-2065.
- Pruss, D., Hayes, J.J. and Wolffe, A.P.** (1995) Nucleosomal anatomy-where are the histones? *Bioessays*, **17**, 161-170.
- Pugh, B.F. and Tjian, R.** (1990) Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators. *Cell*, **61**, 1187-1197.
- Ranish, J.A. and Hahn, S.** (1991) The yeast general transcription factor TFIIA is composed of two polypeptide subunits. *J Biol Chem*, **266**, 19320-19327.
- Ranish, J.A., Lane, W.S. and Hahn, S.** (1992) Isolation of two genes that encode subunits of the yeast transcription factor IIA. *Science*, **255**, 1127-1129.
- Roeder, R.G.** (1996) The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci*, **21**, 327-335.
- 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.
- Rosenberg, A.H., Lade, B.N., Chui, D., Lin, S., Dunn, J.J. and Studier, F.W.** (1987) Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene*, **56**, 125-135.
- Sauer, F. and Tjian, R.** (1997) Mechanisms of transcriptional activation: differences and similarities between yeast, *Drosophila*, and man. *Curr Opin Genet Dev*, **7**, 176-181.
- Schiestl, R.H. and Gietz, R.D.** (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet*, **16**, 339-346.

- 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.
- Sinha, S., Kim, I.S., Sohn, K.Y., de, C.B. and Maity, S.N.** (1996) Three classes of mutations in the A subunit of the CCAAT-binding factor CBF delineate functional domains involved in the three-step assembly of the CBF-DNA complex. *Mol Cell Biol*, **16**, 328-337.
- Sinha, S., Maity, S.N., Lu, J. and de, C.B.** (1995) Recombinant rat CBF-C, the third subunit of CBF/NFY, allows formation of a protein-DNA complex with CBF-A and CBF-B and with yeast HAP2 and HAP3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 1624-1628.
- Stargell, L.A. and Struhl, K.** (1995) The TBP-TFIIA interaction in the response to acidic activators *in vivo*. *Science*, **269**, 75-78.
- Stargell, L.A. and Struhl, K.** (1996) Mechanisms of transcriptional activation *in vivo*: two steps forward. *Trends Genet*, **12**, 311-315.
- Starr, D.B., Hoopes, B.C. and Hawley, D.K.** (1995) DNA bending is an important component of site-specific recognition by the TATA binding protein. *J Mol Biol*, **250**, 434-446.
- Stelzer, G., Goppelt, A., Lottspeich, F. and Meisterernst, M.** (1994) Repression of basal transcription by HMG2 is counteracted by TFIIH-associated factors in an ATP-dependent process. *Mol Cell Biol*, **14**, 4712-4721.
- 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.
- Studier, F.W. and Moffatt, B.A.** (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, **189**, 113-130.
- Tan, S., Hunziker, Y., Sargent, D.F. and Richmond, T.J.** (1996) Crystal structure of a yeast TFIIA/TBP/DNA complex. *Nature*, **381**, 127-151.
- Taunton, J., Hassig, C.A. and Schreiber, S.L.** (1996) A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science*, **272**, 408-411.
- Timmers, H.T., Meyers, R.E. and Sharp, P.A.** (1992) Composition of transcription factor B-TFIID. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 8140-8144.

- Timmers, H.T. and Sharp, P.A.** (1991) The mammalian TFIID protein is present in two functionally distinct complexes. *Genes Dev*, **5**, 1946-1956.
- Tsai, F.T. and Sigler, P.B.** (2000) Structural basis of preinitiation complex assembly on human pol II promoters. *EMBO J*, **19**, 25-36.
- Tsukiyama, T. and Wu, C.** (1995) Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Cell*, **83**, 1011-1020.
- Van, D.M., Roeder, R.G. and Sawadogo, M.** (1988) Physical analysis of transcription preinitiation complex assembly on a class II gene promoter. *Science*, **241**, 1335-1338.
- Verrijzer, C.P. and Tjian, R.** (1996) TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. *Trends Biochem Sci*, **21**, 338-342.
- Verrijzer, C.P., Yokomori, K., Chen, J.L. and Tjian, R.** (1994) *Drosophila* TAFII150: similarity to yeast gene TSM-1 and specific binding to core promoter DNA. *Science*, **264**, 933-941.
- Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Watanabe, D. and Handa, H.** (1998) Evidence that P-TEFb alleviates the negative effect of DSIF on RNA polymerase II-dependent transcription *in vitro*. *EMBO J*, **17**, 7395-7403.
- Wade, P.A., Jones, P.L., Vermaak, D. and Wolffe, A.P.** (1998) A multiple subunit Mi-2 histone deacetylase from *Xenopus laevis* cofractionates with an associated Snf2 superfamily ATPase. *Curr Biol*, **8**, 843-846.
- Watanabe, Y., Kawakami, K., Hirayama, Y. and Nagano, K.** (1993) Transcription factors positively and negatively regulating the Na,K-ATPase alpha 1 subunit gene. *J Biochem.*, **114**, 849-855.
- Watts, G.S., Pieper, R.O., Costello, J.F., Peng, Y.M., Dalton, W.S. and Futscher, B.W.** (1997) Methylation of discrete regions of the O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) CpG island is associated with heterochromatinization of the MGMT transcription start site and silencing of the gene. *Mol Cell Biol*, **17**, 5612-5619.
- 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**, 199-109.
- Werner, W.M., Braun, E., Johnston, G.C. and Singer, R.A.** (1993) Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*, **57**, 383-401.
- White, R.J., Khoo, B.C., Inostroza, J.A., Reinberg, D. and Jackson, S.P.** (1994) Differential regulation of RNA polymerases I, II, and III by the TBP-binding repressor Dr1. *Science*, **266**, 448-450.

**Wolffe, A.P.** (1994) Transcription: in tune with the histones. *Cell*, **77**, 13-16.

**Wolffe, A.P.** (1998) Packaging principle: how DNA methylation and histone acetylation control the transcriptional activity of chromatin. *J Exp Zool*, **282**, 239-244.

**Wolffe, A.P. and Guschin, D.** (2000) Review: chromatin structural features and targets that regulate transcription. *J Struct Biol*, **129**, 102-122.

**Wolf, K., Dujon, B. and Slonimski, P.P.** (1973) Mitochondrial genetics. V. Multifactorial mitochondrial crosses involving a mutation conferring paromomycin-resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, **125**, 53-90.

**Woychik, N.A. and Young, R.A.** (1993) RNA polymerase II subunit RPB10 is essential for yeast cell viability. *J Biol Chem*, **268**, 12230.

**Woychik, N.A., McKune, K., Lane, W.S. and Wu, H.M. and Crothers, D.M.** (1984) The locus of sequence-directed and protein-induced DNA bending. *Nature*, **308**, 509-513.

**Woychik, N.A., and Young, R.A.** (1994) Exploring RNA polymerase II structure and function. p. 227-242. In R. C. Conaway and J. W. Conaway (ed.). Transcription: mechanisms and regulation. Raven Press, New York. N. Y.

**Wu, H.M. and Crothers, D.M.** (1984) The locus of sequence-directed and protein-induced DNA bending. *Nature*, **308**, 509-513.

**Xie, J., Collart, M., Lemaire, M., Stelzer, G. and Meisterernst, M.** (2000) A single point mutation in TFIIA suppresses NC2 requirement *in vivo*. *EMBO J*, **19**, 672-682.

**Xie, X., Kokubo, T., Cohen, S.L., Mirza, U.A., Hoffmann, A., Chait, B.T., Roeder, R.G., Nakatani, Y. and Burley, S.K.** (1996) Structural similarity between TAFs and the heterotetrameric core of the histone octamer. *Nature*, **380**, 316-322.

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

**Yeung, K., Kim, S. and Reinberg, D.** (1997) Functional dissection of a human Dr1-DRAP1 repressor complex. *Mol Cell Biol*, **17**, 36-45.

**Yeung, K.C., Inostroza, J.A., Mermelstein, F.H., Kannabiran, C. and Reinberg, D.** (1994) Structure-function analysis of the TBP-binding protein Dr1 reveals a mechanism for repression of class II gene transcription. *Genes Dev*, **8**, 2097-2109.

- 
- Yokomori, K., Admon, A., Goodrich, J.A., Chen, J.L. and Tjian, R.** (1993) *Drosophila* TFIIA-L is processed into two subunits that are associated with the TBP/TAF complex. *Genes Dev*, **7**, 2235-2245.
- Yokomori, K., Zeidler, M.P., Chen, J.L., Verrijzer, C.P., Mlodzik, M. and Tjian, R.** (1994) *Drosophila* TFIIA directs cooperative DNA binding with TBP and mediates transcriptional activation. *Genes Dev*, **8**, 2313-2323.
- Young, L.S., Rivier, D.H. and Sprague, K.U.** (1991) Sequences far downstream from the classical tRNA promoter elements bind RNA polymerase III transcription factors. *Mol Cell Biol*, **11**, 1382-1392.
- Young, R.A.** (1991) RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem*, **60**, 689-715.
- Young, R.A.** (1993) Yeast RNA polymerase II subunit RPB11 is related to a subunit shared by RNA polymerase I and III. *Gene Expr*, **3**, 77-82.
- Zawel, L. and Reinberg, D.** (1995) Common themes in assembly and function of eukaryotic transcription complexes. *Annu Rev Biochem*, **64**, 533-561.
- Zehring, W.A., Lee, J.M., Weeks, J.R., Jokerst, R.S. and Greenleaf, A.L.** (1988) The C-terminal repeat domain of RNA polymerase II largest subunit is essential *in vivo* but is not required for accurate transcription initiation *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 3698-3702.
- Zhang, Y., LeRoy, G., Seelig, H.P., Lane, W.S. and Reinberg, D.** (1998) The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell*, **95**, 279-289.

## Lebenslauf

Name: Jun Xie  
Geburtsdatum: 09. Dez. 1967  
Geburtsort: Beijing, VR China  
Familienstand: verheiratet

### Schulische sowie Akademische Ausbildung in China

1975 - 1980 Grundschole in Beijing  
1980 - 1986 Gymnasium in Beijing  
Abitur und Staatsexamen: 07. 1986

1986 - 1990 Studium an der Peking Universität  
Vertiefungsrichtung: Umweltbiologie und  
Umweltokologie

Diplomarbeit: "The Dynamics of Carboxylesterases of  
*Drosophila*" (Note: sehr gut)

### Akademische Ausbildung in Deutschland

1990 - 1991 Deutschkurs am Studienkolleg an der Universität  
Karlsruhe (TH) und Abschluß mit der Sprachprüfung  
PNdS (Prüfung zum Nachweis deutscher  
Sprachkenntnis)

1991 - 1996 Studium der Biologie an der Universität Karlsruhe (TH)

1992 Diplom-Vorprüfung

1995 Diplom-Hauptprüfung

1995 - 1996 Diplomarbeit unter der Anleitung von Prof. Dr. W.  
Zumft  
am Institut für Mikrobiologie, Uni. Karlsruhe  
Thema: Makrorestriktionsanalyse von  
Denitrifikationsgenen bei der Gattung *Pseudomonas*

1997 - 2000 Anfertigung der Dissertation unter der Anleitung von  
PD. Dr. M. Meisterernst am Genzentrum der Ludwig-  
Maximilians-Universität München  
Thema: Charakterisierung des negativen Cofaktors 2  
der Klasse II-Transkription *in vivo* und *in vitro*

