

**Die transkriptionelle Regulation des Gens der
Orotidin-5'-monophosphat-Decarboxylase (*URA3*)**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Andreas Jochem Pätzold
aus Castrop-Rauxel

A.D. 2000

Berichterstatter: Prof. Dr. Helmut W. Klein
Prof. Dr. Benno Müller-Hill

Tag der mündlichen Prüfung: 2. November 2000

I. Inhaltsverzeichnis

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	II-III
1. EINLEITUNG	1-13
1.1 DER HOLOENZYMKOMPLEX DER POLYMERASE II	2
1.2 DIE SUBKOMPLEXE DES POLYMERASE II-HOLOENZYMS	3
1.3 DIE TRANSKRIPTIONELLE REPRESSION	4
1.4 DIE AKTIVIERUNG DER TRANSKRIPTION	6
1.5 DER AKTIVATOR PPR1	7
1.6 DER PYRIMIDIN-BIOSYNTHESEWEG UND SEINE REGULATION	10
1.7 ZIEL DER ARBEIT	13
2. MATERIALIEN UND EXPERIMENTELLE METHODEN	14-30
2.1 MATERIALIEN	14
2.2 EXPERIMENTELLE METHODEN	19
3. ERGEBNISSE	31-50
3.1 EIGNUNG DES "SPLIT-UBIQUITIN-SYSTEM" ZUR SUCHE NACH TUP1-INTERAKTIONSPARTNERN	31
3.2 DER "PYRIMIDINE PATHWAY REGULATOR 1" (PPR1) INTERAGIERT MIT TUP1	32
3.2.1 <i>Die Interaktion von PPR1 und TUP1 ist direkt</i>	38
3.3 DIE INTERAKTION VON PPR1 UND TUP1 IST PHYSIOLOGISCH RELEVANT	40
3.3.1 <i>Eine Deletion von TUP1 erhöht die Transkription des URA3-Gens</i>	42
3.3.2 <i>Der Einfluß von TUP1 auf die Expression von URA3 ist direkt</i>	44
3.4 WEITERE AN DER URA3-GEN-REGULATION BETEILIGTE PROTEINE	48
4. DISKUSSION	51-61
4.1 DIE INTERAKTION VON TUP1 MIT PPR1	52
4.2 PHYSIOLOGISCHE RELEVANZ	55
4.3 VERMITTLUNG DER TUP1-REPRESSION	57
4.4 WEITERE REGULATOREN DER URA3-EXPRESSION	58
4.5 ABSCHLIEßENDE BETRACHTUNG	61
5. ZUSAMMENFASSUNG	62
6. ABSTRACT	63
7. LITERATURVERZEICHNIS	64-77
8. ANHANG	78
8.1 OLIGONUKLEOTIDE	78
8.2 KLONIERUNGEN	78
8.3 WEITERE PLASMIDE	83
8.4 LISTE DER VERWENDETEN COMPUTERPROGRAMME	84

II. Verzeichnis verwendeter Abkürzungen und Akronyme¹

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADA	Histoneacetyltransferase-Komplex ("alteration/deficiency in activation")
Amp	Ampicillin
ARS-CEN	"autonomous replication sequence-centromer"
6-AU	6-Azauracil
bp	Basenpaar(e)
BSA	"bovine serum albumine"
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C _{ub}	C-Terminus des Ubiquitins
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat (N= A, C, G oder T)
Da	Dalton (= 1,6605655 x 10 ⁻²⁷ kg)
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Dinatriummethyleneditetraacetat-Dihydrat
et al.	et alii
evtl.	eventuell
FA	Formamid
FOA	5-Fluororotsäure
FS	"fish sperm"
G	Guanin
GFP	"green fluorescent protein"
ggf.	gegebenenfalls
GTF	genereller Transkriptionsfaktor
HA	Hämagglutinin
l	Liter

¹ Hier nicht enthalten sind SI-Einheiten (mol, s, m, ...) und Präfixe (μ, m, n, ...)

M	mol/l
min.	Minute(n)
mRNA	”messenger”-RNA (Boten RNA)
nt	Nukleotid(e)
N _{ub}	N-Terminus des Ubiquitins
OAc	Acetat
OD _{Index}	optische Dichte (der Index gib Auskunft über die Meßwellenlänge)
ODCase	Orotidin-5’-monophosphat-Decarboxylase
ori	”origin of replication”
RNA	Ribonukleinsäure
SAGA	SPT/ADA/GCN5-Acetyltransferase-Komplex
SDS	”Sodiumdodecylsulfat”
SRB	”suppressor of RNA polymerase B”
Std.	Stunde
T	Thymin
TEMED	N,N,N’,N’-Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Uracil
vgl.	vergleiche
vs.	versus
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
...% (v/v)	”volume per volume” (Volumenprozent)
...% (w/v)	”weight per volume” (Gewichtsprozent)

Die Aminosäuren werden mit dem Ein-Buchstaben-Code nach Dayhoff bezeichnet (Dayhoff, 1978).

Darüber hinaus verwendete Abkürzungen werden an den entsprechenden Stellen erläutert.

1. Einleitung

Der geordnete Ablauf von Prozessen in einer Zelle ist abhängig von einer sowohl zeitlich, als auch in ihrem Ausmaß präzise regulierten Genexpression. Diese beinhaltet die Transkription, d.h. das Umschreiben der in der DNA gespeicherten genetischen Information (Avery et al., 1944) in RNA, sowie im Fall der mRNAs ("messenger" RNA) die weitere Umsetzung in die entsprechenden Proteine (Translation). Neben der Transkription und der Translation werden auch die jeweils nachgeschalteten Prozessierungen und bei Eukaryonten zusätzlich noch der RNA-Transport aus dem Zellkern in das Cytoplasma reguliert (Krug, 1993). Im Gegensatz zu Prokaryonten wird die Transkription in eukaryonten Zellen von drei verschiedenen DNA-abhängigen RNA-Polymerasen (im folgenden als Polymerase(n) bezeichnet) katalysiert (Schwartz et al., 1974; Seifart und Benecke, 1975). Ihre Klassifizierung erfolgte auf Grund ihres unterschiedlichen Verhaltens gegenüber -Amanitin, dem Haupttoxin des grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*) (Stirpe und Fiume, 1967; Wieland und Hallermayer, 1941), ihrer Lokalisation in der Zelle und ihrer Spezifität in bezug auf die verschiedener Promotortypen.

Als Promotoren werden distinkte Sequenzbereiche der Gene bezeichnet, an denen direkt oder indirekt spezifische Bindungen von regulatorischen Proteinen bzw. Proteinkomplexen erfolgen (Mitchell und Tjian, 1989), welche für die Transkription essentiell sind. Promotoren bestehen unabhängig von ihrem Typ aus zwei Bereichen: einem "core"-Promotor, der die Basaltranskription und den korrekten Transkriptionsstart bewirkt, und den modulierenden Bereichen.

Insofern ein Promotor eine TATA-Box besitzt, liegt diese im "core"-Promotor. Ihre Lage kann zwischen -120 und -30 relativ zur Transkriptionsstartstelle variieren. Sie bildet die Erkennungssequenz für den Transkriptionsfaktor TFIID (Nakajima et al., 1988). Neben der Initiationsregion (Inr) und der TATA-Box, welche den korrekten Transkriptionsstartpunkt festlegen (Breathnach und Chambon, 1981; Corden et al., 1980), sind in der Regel weitere, 5'-gelegene cis-aktive Elemente vorhanden, die an der

Bildung des Initiationskomplexes beteiligt sind. Die Transkriptionsaktivität wird ferner von sogenannten "Enhancern" oder Operatoren moduliert, die ihre Wirkung unabhängig von Position und Orientierung entfalten (Sassone-Corsi und Borrelli, 1986; Schaffner et al., 1985).

Die als Transkriptionsfaktoren bezeichneten promotorbindenden Proteine bzw. Proteinkomplexe bilden in spezifischer Interaktion mit den entsprechenden Polymerasen den Initiationskomplex und leiten die Transkription ein. Transkriptionsfaktoren stellen somit wichtige Regulatoren der Genexpression dar (Johnson und McKnight, 1989).

1.1 Der Holoenzymkomplex der Polymerase II

Erste Modelle postulierten eine aufeinanderfolgende Rekrutierung der generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs) an den Promotor (Buratowski et al., 1989; Reinberg et al., 1987). Die GTFs, zu denen TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF und TFIIH zählen, sind Proteinkomplexe mit hoher Konservierung in Eukaryonten. Zusammen mit der Polymerase II sind diese notwendig und hinreichend für eine korrekte, promotorspezifische Transkription *in vitro*. Jedoch bedarf es für die Erhöhung der Transkriptionsrate durch verschiedene Aktivatoren zusätzlicher Faktoren (Flanagan et al., 1991; Kelleher et al., 1990; White et al., 1991).

Ein zuerst aus *S. cerevisiae* isolierter und als Holoenzym bezeichneter Enzymkomplex, der neben der Polymerase II und einigen GTFs auch noch andere Faktoren enthielt, ließ in einem *in vitro* System eine solche Stimulation der Transkription zu (Koleske und Young, 1994). Ferner führte die mögliche *in vivo*-Existenz der GTFs in einem solchen Komplex zu der Hypothese, daß die GTFs nicht schrittweise, sondern in einem solchen Multiproteinkomplex an den "core"-Promotor geführt werden. Holoenzymkomplexe wurden auch aus der Spaltheefe *S. pombe* (Spahr et al., 2000), aus einer humanen Zelllinie (Maldonado et al., 1996), aus

Kalbthymus (Chao et al., 1996) und aus Rattenleber (Ossipow et al., 1995) isoliert. Abhängig von der Aufreinigung wurden in den Holoenzymkomplexen unterschiedliche Subkomplexe gefunden, so daß dessen Aufbau *in vivo* nur bedingt bekannt ist.

1.2 Die Subkomplexe des Polymerase II-Holoenzym

Von Kim et al. wurde etwa zeitgleich zum Holoenzym ein mit der C-terminalen Domäne (CTD "C-terminal repeat domain") der Polymerase II interagierender und als Mediator bezeichneter Subkomplex des Holoenzym isoliert (Kim et al., 1994). Die Präsenz dieses Mediators bewirkt die Aktivierung der Transkription in einem *in vitro* Transkription-System. Es sind verschiedene Subkomplexe des Mediators identifiziert worden (Lee und Kim, 1998). Der RGR1-Subkomplex enthält die Proteine RGR1, GAL11, SIN4, ROX3 und MED3 (HRS1) (Myer und Young, 1998). Die übrigen MED-Proteine bilden einen Subkomplex, der mit dem RGR1-Subkomplex assoziiert ist (Koh et al., 1998). Ein weiterer Mediatorsubkomplex enthält die SRB ("suppressor of RNA-polymerase B")-Proteine SRB2, SRB4, SRB5, SRB6 und SRB7 (Koh et al., 1998; Wellhausen, 1999). SRB4 nimmt in diesem eine wesentliche Rolle ein, da SRB4 essentiell ist und auch die Wirkung des Aktivators GAL4 vermittelt, mit dem es direkt interagiert (Koh et al., 1998).

Neben dem Mediatorsubkomplex wurde auch der SWI/SNF-Komplex in Holoenzympräparationen gefunden (Wilson et al., 1996). Dieser enthält unter anderem SWI2, dessen ATPase-Aktivität Grundlage für eine Nukleosomen-Umstrukturierung ist (Cote et al., 1994). Die Transkriptionsregulation, positiv wie negativ, wird der lokalen Modifikation der Chromatinstruktur durch diesen Komplex zugeschrieben (Holstege et al., 1998; Murphy et al., 1999; Peterson und Tamkun, 1995; Ryan et al., 1998; Sudarsanam et al., 2000). Ein Auseinanderbrechen der Histon-Oktamere scheint nach Boyer et al. jedoch nicht einzutreten (Boyer et al., 2000).

Ein weiterer Subkomplex des Holoenzym ist der SRB10/ 11-Komplex (Liao et al., 1995). Dieser enthält neben den namensgebenden SRB-Proteinen 10 und 11 ferner SRB8 und SRB9 und scheint vornehmlich in der negativen Regulation der Transkription involviert zu sein (Song et al., 1996). SRB11 ist ein Cyclin, während SRB10 die dazugehörige cyclinabhängige-Serin/ Threonin-Kinase (CDK) ist, welche die Polymerase II an ihrer C-terminalen Domäne phosphoryliert. Diese vor der Bildung des Initiationskomplexes erfolgende Phosphorylierung ist die Ursache des inhibitorischen Effektes dieses Subkomplexes (Hengartner et al., 1998). Für die repressive Funktion dieses Subkomplexes spricht auch, daß dieser für die volle Wirkung des SSN6/ TUP1-Repressorkomplexes notwendig ist (Kuchin und Carlson, 1998; Wahi und Johnson, 1995).

1.3 Die transkriptionelle Repression

Das Protein TUP1 ist ein genereller Repressor der Hefe. Er wurde erstmals durch spontane Mutanten charakterisiert, die in der Lage sind Desoxythymidin-6'-monophosphat in DNA einzubauen ("Thymidin Uptake Positive") (Wickner, 1974). Die Repression durch TUP1 scheint auf verschiedenen Mechanismen zu beruhen. So ist bekannt, daß TUP1 mit den Histonen H3 und H4 interagiert und die Repression durch Verhinderung der Acetylierung der Histone bewirkt (Edmondson et al., 1996). Die damit verbundene kondensierte Chromosomenstruktur verhindert den Zugang von Transkriptionsfaktoren und die Expression des Gens (Cooper et al., 1994). Eine weitere Möglichkeit der Funktionsweise ergibt sich aus der Interaktion mit Komponenten des Holoenzym. So konnten genetische Interaktionen mit dem SRB10/ 11-Subkomplex (Kuchin und Carlson, 1998) und eine physikalische Interaktion mit der MediatorKomponente MED3 (HRS1) (Papamichos-Chronakis et al., 2000) gezeigt werden. Da TUP1 die DNA nicht direkt binden kann und somit kein Repressor im engeren Sinne, sondern ein Korepressor ist, könnte der Mechanismus der Repression abhängig von der Promotorstruktur des regulierten

Gens sein. Dies umso mehr, als daß TUP1 in einem Komplex mit SSN6 (CYC8) (Williams et al., 1991) durch verschiedene promotorspezifische DNA-bindende Proteine an einen Promotor rekrutiert wird. Zu diesen Proteinen gehören z.B. MIG1 für die durch Glukose reprimierten Gene (Treitel und Carlson, 1995), ROX1 für die durch Sauerstoff regulierten Gene (Zhang et al., 1991) und der α 2/MCM1-Komplex für die Repression der α -Zell-spezifischen Gene (Keleher et al., 1992). Auch an der Regulation des Meiosegens *IME1* ist TUP1 beteiligt, was durch eine Deletionsanalyse des Promotors in Abhängigkeit vom *TUP1*-Genotyp gefunden wurde (Mizuno et al., 1998). Ferner konnte gezeigt werden, daß in dem TUP1-abhängigen Bereich des Promotors ein als YHP1 bezeichnetes Homeoboxprotein bindet. Obwohl wie α 2 ein Homeoboxprotein, interagierte es in einem "Two-Hybrid"-System nicht mit TUP1 (Kunoh et al., 2000). Damit bleibt unklar, durch welches Protein TUP1 an diesen Promotor rekrutiert wird. Das Prinzip der Rekrutierung von Korepressorkomplexen ist nicht auf TUP1 beschränkt. Auch der SIN3/RPD3-Komplex, dessen reprimierende Funktion auf der Histondeacetylase-Aktivität des RPD3 beruht (Kadosh und Struhl, 1998), wird durch das DNA bindende Protein UME6 an den Promotor gebracht (Kadosh und Struhl, 1997).

Ein anderes repressorisches Prinzip ist das Blockieren aktivierender Domänen. So wird die Aktivität von GAL4 in glukosehaltigen Medien durch die Bindung von GAL80 unterdrückt (Lue et al., 1987; Wu et al., 1996). In galaktosehaltigem Medium bindet Galaktose an GAL3. Durch dessen Bindung an GAL80 wird die Interaktion zwischen GAL4 und GAL80 modifiziert und GAL4 kann sein Aktivierungspotential entfalten (Blank et al., 1997; Platt und Reece, 1998).

Neben der lokalen Repression von einzelnen Genen wird durch den Einfluß einer Reihe von Proteinen auf die Chromatinstruktur auch eine Inaktivierung großer Bereiche des Chromosoms bewirkt (Cheng und Gartenberg, 2000). Die Begrenzung dieser Heterochromatinbereiche wird durch Insulatoren bewirkt. Diese ursprünglich in *Drosophila melanogaster* gefundenen Sequenzabschnitte (Kellum und Schedl, 1991)

wurden im Huhn (Felsenfeld et al., 1996) und auch in *S. cerevisiae* gefunden (Bi und Broach, 1999; Donze et al., 1999).

1.4 Die Aktivierung der Transkription

Experimentelle Daten lassen darauf schließen, daß auch Aktivatoren ihre Funktion sowohl über die Chromatinstruktur als auch über das Holoenzym bewirken können. So konnten Georgakopoulos und Thireos zeigen, daß für eine durch GCN4 vermittelte Aktivierung GCN5 benötigt wird (Georgakopoulos und Thireos, 1992). Letzteres ist sowohl im SAGA- als auch im ADA-Komplex zu finden (Grant et al., 1997) und ist die katalytische Untereinheit dieser Histonacetyltransferasekomplexe (Grant et al., 1999). Des Weiteren sind Interaktionen zwischen Aktivatoren und dem in einigen Holoenzympräparationen vorhandenen SWI/SNF-Komplex gefunden worden (Yudkovsky et al., 1999). Neben diesen Interaktionen, die Auswirkungen auf die lokale Chromosomenstruktur haben, wurde auch eine Interaktion zwischen GCN4 und der Holoenzym-Komponente GAL11 gefunden (Lee et al., 1999). Ferner wurden für die Holoenzym-Komponente TFIIB *in vitro* Interaktionen mit den Aktivatoren ACE1, GAL4 und GAL4-VP16 gezeigt (Lin et al., 1991; Roberts et al., 1993; Zhang et al., 2000).

Neben den bisher behandelten Holoenzym-Komponenten sind auch Nicht-Holoenzym-GTFs Ansatzpunkte für Aktivatoren. So wurden Interaktionen zwischen TFIIA und verschiedenen Aktivatoren gezeigt (Kobayashi et al., 1995; Ozer et al., 1994). Ferner sind solche Interaktionen für TAFs ("TBP associated factors"), die mit dem TATA-Box bindenden Protein (TBP) den TFIID-Komplex bilden, und mit TBP selber gezeigt worden (Chiang und Roeder, 1995; Matangkasombut et al., 2000; Wu et al., 1996).

Die Komplexität, die sich aus der gegenseitigen Beeinflussung von Aktivierung und Reprimierung auf unterschiedlichster Art ergibt, ermöglicht es der Zelle alle Prozesse aufeinander abzustimmen und ihrer Umgebung entsprechend zu optimieren.

1.5 Der Aktivator PPR1

Das durch das Gen *PPR1* ("Pyrimidin Pathway Regulator 1") kodierte Protein von 904 Aminosäuren (102,7 kDa) wurde als positiver Regulator des *URA1*- und *URA3*-Gens gefunden (Loison et al., 1980; Losson et al., 1985), kloniert (Losson und Lacroute, 1981) und 1984 weiter charakterisiert (Kammerer et al., 1984; Liljelund et al., 1984). Die aktivierende Domäne dieses Proteins befindet sich in den letzten 134 carboxyterminalen Aminosäuren (Flynn und Reece, 1999). Ein Stamm mit einer Punktmutation (L233S) in *PPR1* (*ppr1-1*) (Flynn und Reece, 1999; Loison et al., 1980), exprimiert das *URA3*-Gen konstitutiv, so daß dieser eine erhöhte Resistenz gegenüber 6-Azauracil, einem kompetitiven Inhibitor des *URA3*-Genproduktes (Handschumacher, 1960), besitzt. Ein Vergleich zwischen Nullmutante und konstitutiv aktivierender Mutante zeigte eine dreifache Aktivierung durch PPR1 (Roy et al., 1990). Verglichen mit GAL4, das bei Induktion mit Galaktose die Transkription um mehr als das 1000fache aktiviert (West, 1984), besitzt PPR1 damit ein schwaches Aktivierungspotential. Auch ist die Halbwertszeit der PPR1-mRNA mit 60 sec. sehr gering (Losson et al., 1983), was auf ein Signal im 5' nicht translatierten Bereich zurückgeführt werden konnte (Linz et al., 1997; Pierrat et al., 1993).

PPR1 gehört zu der Gruppe der DNA-bindenden Zinkproteine und zählt zu der Untergruppe der Zinkclusterproteine, die durch ein Zn_2Cys_6 -Motiv gekennzeichnet sind (Vallee et al., 1991). Die Koordination der Zinkionen im nativen PPR1 wurde durch Ball et al. (Ball et al., 1995) bestimmt und bestätigt die Röntgenstrukturanalyse von Marmorstein und Harrison (Marmorstein und Harrison, 1994) (vgl. Abb. 1.1).

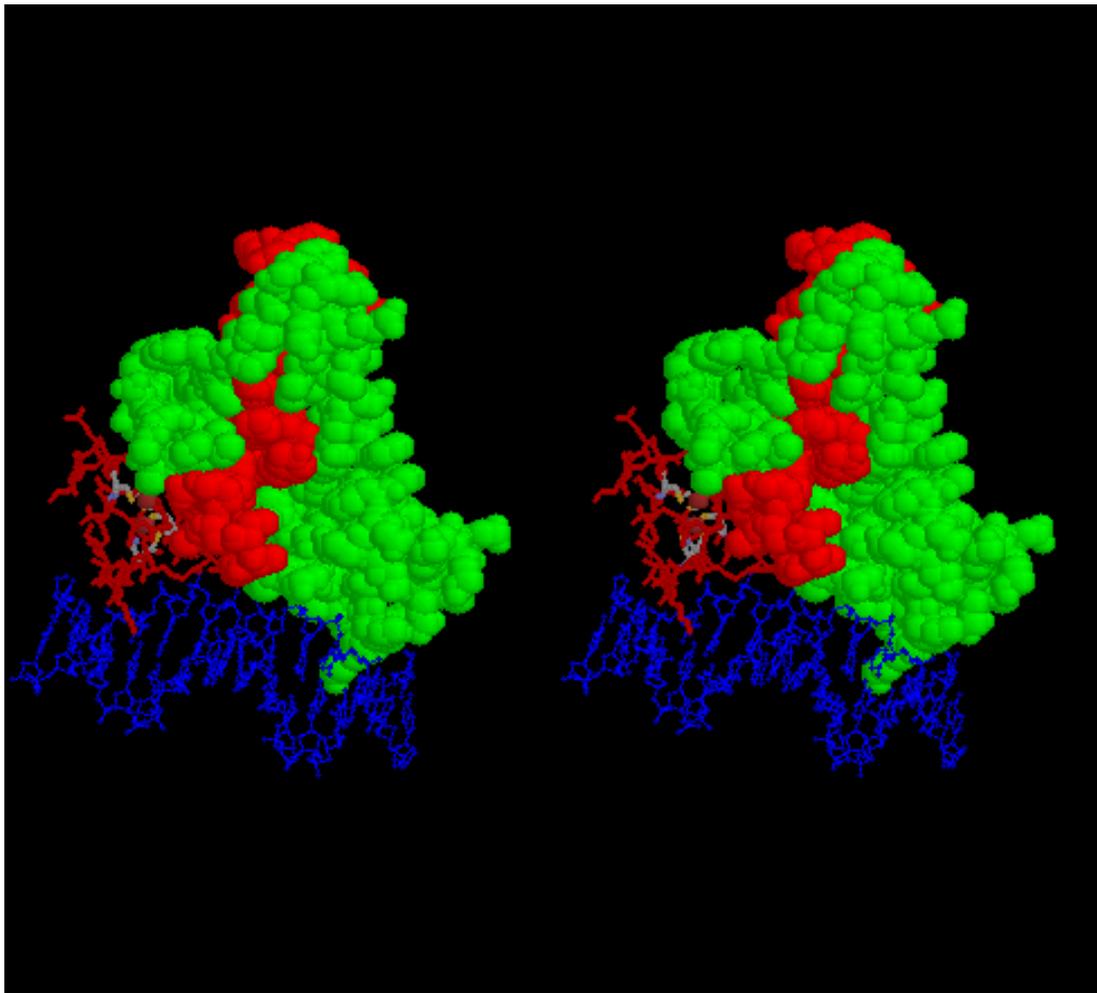


Abb. 1.1: Die Struktur eines PPR1-Dimers (Aminosäuren 29 bis 123), gebunden an DNA.

Die Abbildung wurde unter Verwendung des Programms RASMOL mit den von Marmorstein et al. (Marmorstein und Harrison, 1994) ermittelten Daten (RSCB Protein Data Bank (Berman et al., 2000); ID: 1PYI) erstellt. Die PPR1-Monomere sind grün bzw. rot dargestellt. Die Zinkclusterdomäne von einem Monomer (rot) ist als Stäbchenmodell dargestellt, so daß die Zn-Ionen (braun) sichtbar sind. Die diese komplexierenden Cysteinreste sind farbig (gelb=Schwefel).

Durch Aminosäuresequenzvergleiche wurden in *S. cerevisiae* 56 Zinkclusterproteine gefunden, die zu den Transkriptionsaktivatoren gezählt werden (Schjerling und Holmberg, 1996). Wie GAL4, einem weiteren Vertreter der Zinkclusterproteine, bindet auch PPR1 durch dieses Motiv im N-terminalen Bereich als Homodimer in der tiefen Grube der DNA (Marmorstein et al., 1992; Marmorstein und Harrison, 1994). Während die Zinkclusterdomäne selbst austauschbar ist, sind die unmittelbar C-terminal folgenden 19 Aminosäuren für die Unterscheidung der Bindungsstellen entscheidend (Reece und Ptashne, 1993). Eine Reihe von Zinkclusterproteinen binden

in den von diesen regulierten Promotoren eine UAS ("upstream activating sequence"), die sich durch die symmetrische Anordnung von CGG-Elementen auszeichnet. Der Abstand zwischen diesen Sequenzelementen und die Art ihrer Symmetrie (palindromische, invers palindromische oder direkte Anordnung) spezifizieren die Bindungsstelle für das jeweilige Protein (Hellauer et al., 1996; Marmorstein und Harrison, 1994). Abbildung 1.2 zeigt verschiedene Zinkclusterproteine mit einer von ihnen erkannten UAS.

Zinkclusterproteine und die CGG-Triplett-Symmetrie der erkannten UAS:

palindromisch

PPR1	UAS _{URA3}	<u>CGGTAA</u> TCTCCG GCCATT <u>AGAGGC</u>	(Roy et al., 1990).
GAL4	UAS _{GAL}	<u>CGGAGGAC</u> T GTCCTCCG GCCTCCTG A <u>CAGGAGGC</u>	(Marmorstein et al., 1992)

invers palindromisch

LEU3	UAS _{LEU2}	GGCCGGA <u>ACCGGCT</u> <u>CCGGCCT</u> TGGCCGT	(Hellauer et al., 1996).
------	---------------------	--	--------------------------

direkt

UME6	UAS _{IME2}	TAGCCG CCG AT <u>CGGC</u> <u>GGC</u>	(Bowdish et al., 1995).
------	---------------------	---	-------------------------

Abb. 1.2: Beispiele von Zinkclusterproteinen und den von ihnen erkannten "upstream activating sequences" (UAS).

Dargestellt sind verschiedene Zinkclusterproteine zusammen mit einem Beispiel einer von ihnen erkannten UAS. Die UAS_{LEU2} besitzt auch palindromisch angeordnete CGG-Elemente, jedoch sind diese von untergeordneter Bedeutung (Hellauer et al., 1996). Die repetitiven CGG-Elemente sind durch Unterstreichungen gekennzeichnet.

So besteht sowohl die Bindungsstelle von GAL4 als auch die von PPR1 aus palindromisch angeordneten CGG-Tripletts. Sie unterscheiden sich jedoch in den Abständen dieser Tripletts: CGG_N_xCCG mit $x=11$ für GAL4 und $x=6$ für PPR1 (Marmorstein et al., 1992). Im Fall der GAL4-Bindungsstelle wurde gezeigt, daß die Basen im Zentrum nur geringe Auswirkungen auf die Bindungsspezifität aufweisen (Liang et al., 1996).

1.6 Der Pyrimidinbiosyntheseweg und seine Regulation

PPR1 bindet im *URA1*-Promotor an eine zwischen Position -214 und -199 bzw. -183 und -168 liegende UAS ("upstream activating sequence"); im *URA3*-Promotor befindet sich diese zwischen -152 bis -141 (Roy et al., 1990). Neben der UAS sind im *URA3*-Promotor weitere Bereiche definiert worden, welche die basale und die aktivierte Transkription steuern. Allerdings ist bisher mit Ausnahme der TATA-Box nicht bekannt, welche Proteine an diese binden. Bekannt ist allerdings, daß BAS2 (GRF10/PHO2), abhängig von der Anwesenheit Adenins, in der Expression von *URA1* und *URA3* involviert ist (Denis et al., 1998). BAS2 ist ein Homeoboxprotein, das an der basalen und an der aktivierten Transkription einer Reihe von Genen beteiligt ist, die Schritte in der Histidin- und Purin-Biosynthese katalysieren (Daignan-Fornier und Fink, 1992). Dies läßt auf eine koordinierte Regulation von Purin- und Pyrimidinsynthese schließen (Denis et al., 1998). Ein weiterer Hinweis hierauf findet sich in der Homologie zu UaY, einem Transkriptionsaktivator aus *Asparagillus nidulans*, der an der Regulation von Genen beteiligt ist, die es diesem Pilz ermöglichen, Purine als Stickstoffquelle zu nutzen (Suarez et al., 1995).

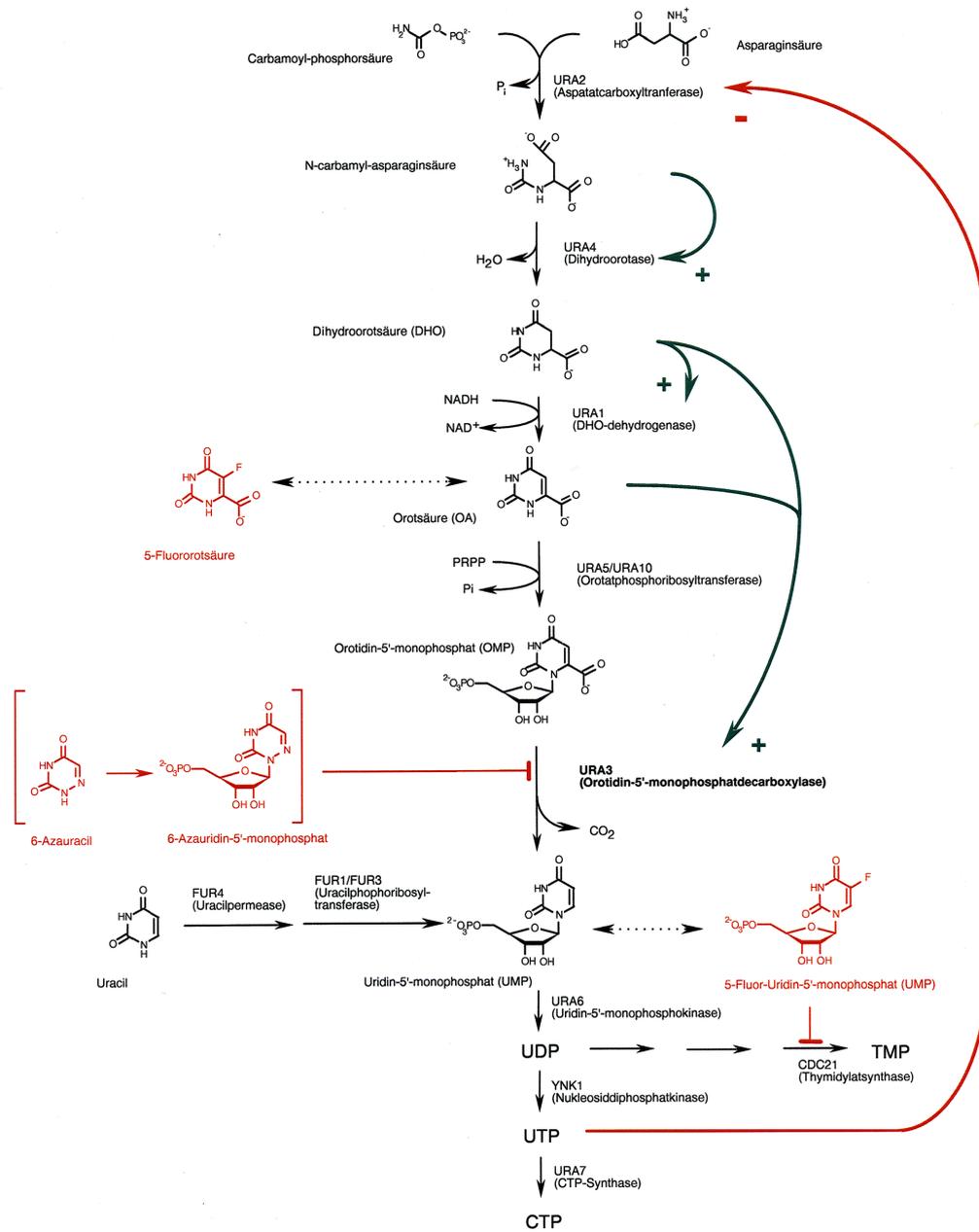


Abb. 1.3: Der Pyrimidin-Biosyntheseweg.

Die Abbildung zeigt die Schritte der *de novo* Biosynthese von UMP mit den beteiligten Enzymen nach Flynn et al. (Flynn und Reece, 1999; modifiziert) und deren Regulation (Lacroute, 1968). Ferner sind die Eintrittsstellen für Uracil, 5-Fluororotsäure und 6-Azaauracil in den Syntheseweg, so wie die Stellen der inhibitorischen Wirkung der letzten beiden Substanzen dargestellt. Stimulierende Wirkungen sind in grün, reprimierende oder inhibitorische in rot gehalten.

Das Gen *URA3* der Hefe *S. cerevisiae* kodiert für das Enzym Orotidin-5'-monophosphat-Decarboxylase (ODCase; E.C. 4.1.1.23) (Bach et al., 1979; Lacroute, 1968). Dieses katalysiert mit der Decarboxylierung am C-6 des Orotidin-5'-monophosphat (OMP) den abschließenden Schritt in der *de novo* Synthese von Uridin-5'-monophosphat (UMP) (vgl. Abb. 1.3). Die durch das Enzym katalysierte Reaktion verläuft mit einer Halbwertszeit von 18 msec (Bell und Jones, 1991). Ihre Geschwindigkeit ist damit um das $1,4 \times 10^{17}$ fache höher, als bei der nicht katalysierten Reaktion in wässriger Lösung, bei der die Halbwertszeit 78 Millionen Jahre beträgt (Radzicka und Wolfenden, 1995). Grund hierfür ist, daß im Gegensatz zu anderen Decarboxylasereaktionen ein formal intermediär gebildetes Carbanion nicht durch ein konjugiertes, elektrophiles π -System stabilisiert werden kann. Auch zeigten Untersuchungen, daß die ODCase keine Metallionen als Kofaktoren enthält, die ein solches Intermediat stabilisieren könnten (Cui et al., 1999). Auf Grund kinetischer Daten und quantenmechanischer Kalkulationen wurden unterschiedliche Modelle für den katalytischen Mechanismus erstellt (zusammengefaßt in Appleby et al., 2000). Einen Schritt zur Klärung der katalytischen Funktionsweise brachten die Kristallstrukturen der ODCase verschiedener Spezies (Feng et al., 2000; Miller et al., 2000; Wu et al., 2000). Demnach wird nun ein Mechanismus postuliert, in dem das Substrat einem "elektrostatischen Streß" ausgesetzt wird. Dieser ergibt sich aus einer vielfachen Verankerung des Substrates an seiner Phosphatgruppe und seiner Ribosylgruppe. Damit erfolgt eine Positionierung der Carboxylgruppe am C-6 des OMP in die unmittelbaren Nachbarschaft der γ -Carboxylgruppe der Asparaginsäure 91. Durch deren Ladung wird eine Polarisierung der π -Bindung zwischen dem Carboxylkohlenstoff und C-6 des Pyrimidinrings bewirkt. Gleichzeitig erfolgt eine Stabilisierung und Protonierung durch eine nahe dem C-6 gelegene protonierte ϵ -Aminogruppe des Lysins 93. Ein solcher Prozeß wurde von Jencks als Circe-Effekt beschrieben (Jencks, 1975). Die Orotidin-5'-monophosphat-Decarboxylase ist somit sowohl im Hinblick auf ihre Leistungsfähigkeit, als auch auf Grund ihres Mechanismus und der Kontrolle ihrer Expression ein interessantes Enzym.

1.7 Ziel der Arbeit

TUP1 ist als genereller Repressor der Hefe *S. cerevisiae* bekannt. Um weitere Einblicke in die Details der Funktionsweise von TUP1 zu erhalten, wurde von N. Lehming mit dem "Split-Ubiquitin-System" nach möglichen Interaktionspartnern von TUP1 gesucht. Einer der Klone enthielt die Aminosäuren 97 bis 208 des Aktivatorproteins "Pyrimidin Pathway Regulator 1" (PPR1). In dieser Arbeit sollte zunächst dieses Ergebnis reproduziert werden. Danach sollte gezeigt werden, daß auch das gesamte PPR1 mit TUP1 interagiert. Um zu klären, ob die Interaktion direkt ist, sollte getestet werden, ob sie auch mit gereinigtem PPR1 und TUP1 *in vitro* stattfindet. Abschließend war die Frage der biologischen Relevanz zu beantworten. Hierzu sollte untersucht werden, ob TUP1 tatsächlich an der transkriptionellen Regulation des *URA3*-Gens beteiligt ist. Außer des Effektes der Deletion von TUP1 auf die Expression des *URA3*-Gens, sollten auch die Auswirkungen der Deletionen von den Transkriptionsfaktoren SRB8, SRB11, TFG3 und NHP6A/B festgestellt werden.

2. Materialien und experimentelle Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und Kits wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham (Braunschweig), BIOMOL Feinchemikalien GmbH (Hamburg), Boehringer GmbH/ Roche (Mannheim), Life Technologies GmbH (Eggenstein), MBI Fermentas (St.-Leon-Rot), Merck KGaA (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Promega GmbH (Mannheim), Qiagen GmbH (Hilden), Roth GmbH (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen), Wak-Chemie (Bad Homburg),

2.1.2 Enzyme

Die verwendeten Enzyme stammten von den Firmen Boehringer GmbH/ Roche (Mannheim), Life Technologies (Eggenstein), MBI Fermentas (St.-Leon-Rot), New England Biolabs (Schwalbach) und Promega GmbH (Mannheim).

2.1.3 Antikörper

Es wurden folgende Antikörper verwendet:

- HA: BAbCO, Berkeley, USA (für Western-Blots 1:10000 verdünnt)
- GST: BAbCO, Berkeley, USA (für Western-Blots 1:10000 verdünnt)
- mouse: BIO-RAD, Hercules, USA (für Western-Blots 1:2000 verdünnt)

2.1.4 Oligonukleotide

Oligonukleotide für PCR-Reaktionen und DNA-Sequenzanalysen wurden von den Firmen Life Technologies (Eggenstein), Metabion (Martinsried) und MWG (Ebersberg) bezogen. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Anhang 7.1 angegeben.

2.1.5 Medien und Platten

Es wurden gängige Platten und Medien verwendet:

LB-Medium (Bertani, 1951; ohne Glucose), ggf. mit 200 mg/ l Ampicillin bzw. 3,4 g/ l Chloramphenicol

YPDA-Medium (Sherman, 1991)

SC-Mangelmedium (Sherman, 1991); ggf. mit 0,5 g FOA pro Liter Medium. Dieses wurde separat gelöst und sterilfiltriert (Boeke et al., 1984; Boeke et al., 1987).

Analog wurde im Fall von Medien verfahren, die 6-Azauracil enthielten. Die Stammlösung war in diesem Fall eine ammoniakalische Lösung (1 %ig) mit einer Konzentration von 4 mg 6-Azauracil pro Milliliter.

2.1.6 Puffer und Lösungen

Die Herstellung der verwendeten Puffer und Lösungen entsprach den Angaben in den Referenzen der jeweiligen Methoden. Die abweichenden Verfahren und Besonderheiten sind entsprechend vermerkt.

2.1.7 Bakterien- und Hefestämme

Es wurden folgende Stämme verwendet:

Bakterien:

E. coli BL21 (DE3) LysS (Stratagene, Amsterdam; pLysS: Novagen, Madison, USA): *F⁻ompT[lon] hsdSB (r_B⁻m_B⁻)* für die Präparation von GST-Fusionsproteinen.

E. coli DH5 (Clontech): *deoR, endA1, gyrA96, hsdR17(r_k⁻m_k⁻), recA1, relA1, supE44, thi-1, Δ (lacZYA-argFV169), f80lacZΔM15, F*

E. coli XL1 blue (Stratagene, Amsterdam): *recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F⁻ proAB, lacI^qZΔM15, Tn10(tet^r)]*

S. cerevisiae:

S. cerevisiae JD52a und JD53a (Dohmen et al., 1995) : *MATa bzw. MATa ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801 trp1Δ63*

S. cerevisiae JD52a und JD53 *ade2* (diese Arbeit; vgl. 2.2): *MATa bzw. MATα ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801 trp1Δ63 ade2::hisG*

S. cerevisiae JD52a und JD53 *TUP1* (N. Lehming): *MATa bzw. MATα ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801 trp1Δ63 ade2::hisG tup1::ADE2*

S. cerevisiae JD52a und JD53 *SRB8* (J. Schüller): *MATa bzw. MATα ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801 trp1Δ63 ade2::hisG srb8::hisG*

S. cerevisiae JD52a und JD53 *SRB11* (J. Schüller): *MATa bzw. MATα ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801 trp1Δ63 ade2::hisG srb11::ADE2*

S. cerevisiae JD52a und JD53 *TFG3* (N. Lehming): *MATa bzw. MATα ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801 trp1Δ63 ade2::hisG tfg3::hisG*

S. cerevisiae JD52a und JD53 *NHP6* (N. Lehming): *MATa bzw. MATα ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801 trp1Δ63 ade2::hisG nhp6A::hisG nhp6B::hisG*

S. cerevisiae JD52a und JD53 *PPR1* (N. Lehming): *MATa bzw. MATα ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801 trp1Δ63 ade2::hisG ppr1::HIS3*

2.1.8 Vektoren und Plasmide

Bei den Hefevektoren sind die jeweiligen auxotrophen Markergene in Klammern angegeben.

E. coli-Vektoren

Name	Datenbank-Nr. (Genbank)	Hersteller	Verwendung
pSL1180	U13865	Pharmacia (Freiburg)	Klonierung des Plasmids pade2-KO
pGEX5X-1	U13856	Pharmacia (Freiburg)	Expression und Gewinnung von GST- Fusionsproteinen
pET11a	ohne	Novagen Inc., (Madison)	Expression und Gewinnung von Proteinen mit H ₆ -HA- Epitop

Hefektoren

Name	Datenbank-Nr. (Genbank)	Hersteller	Verwendung
pADNS	U33753	N. Lehming	Expression von N _{ub} - Fusionsproteinen
pRS304	ohne	(Sikorski, 1989)	Integration des Derivates P _{CUP1} C _{ub} Rura304 in den <i>TRP1</i> Lokus
pRS314	ohne	(Sikorski, 1989)	Extrachromosomale Expression von P _{CUP1} C _{ub} Rura314
pRS313	ohne	(Sikorski, 1989)	Extrachromosomale Expression von P _{CUP1} C _{ub} Rgfp313

Die in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen und die Plasmidkarten von den verwendeten Plasmiden Yact1 (von N. Johnsson zur Verfügung gestellt) und "spacing template" (N. Lehming) sind im Anhang 7.4 beschrieben.

2.2 Experimentelle Methoden

2.2.1 Transformationen

Die Transformation von Plasmid-DNA in *E.coli* wurde nach der Methode der Hitzeinduktion (Hanahan, 1983) durchgeführt. Die Transformation von Hefe, sowohl mit linearisierter, als auch mit Plasmid-DNA, erfolgte nach der Lithium-Acetat-Methode von Gietz et al. (Gietz, 1992).

2.1.2 Einführung einer auxotrophen Mutation in das *ADE2*-Gen ($\Delta ade2$):

Die im Rahmen dieser Arbeit verwandte auxotrophe *ade2* Mutante wurde unter Verwendung des Plasmides *pade2-KO* gewonnen. Das Plasmid *pade2-KO* (vgl. Anhang 7.2) wurde mit *XhoI* und *EcoRI* geschnitten und in die entsprechenden Stämme transformiert. Zellen die das *hisG-URA3-hisG*-Fragment durch homologe Rekombination in ihr Chromosom integriert haben, sind nicht mehr auxotroph in bezug auf den Uracilsyntheseweg und können durch Wachstum auf Uracilmangelmedium selektiert werden (vgl. Abb. 2.1 A und B). Ob die homologe Rekombination in den *ADE2*-Locus erfolgte oder eine illegale Rekombination zum *Ura⁺* Phänotyp führte, ließ sich durch Nichtwachstum auf Adeninmangelmedium feststellen.

Die erhaltenen Positivkandidaten wurden auf YPDA-Platten ausgestrichen und von diesen in Vollmedium überimpft. Diese Verfahrensweise erhöht die Wahrscheinlichkeit der intrachromosomalen Rekombination im Bereich der repetitiven *hisG*-Sequenzen (vgl. Abb. 2.1 C und D). Durch diesen Vorgang werden die Zellen wiederum auxotroph in bezug auf Uracil. Die Selektion auf eine

erfolgreiche intrachromosomale Rekombination erfolgte durch Wachstum auf Medium mit FOA. In *URA3* exprimierenden Zellen wirkt dieses toxisch.

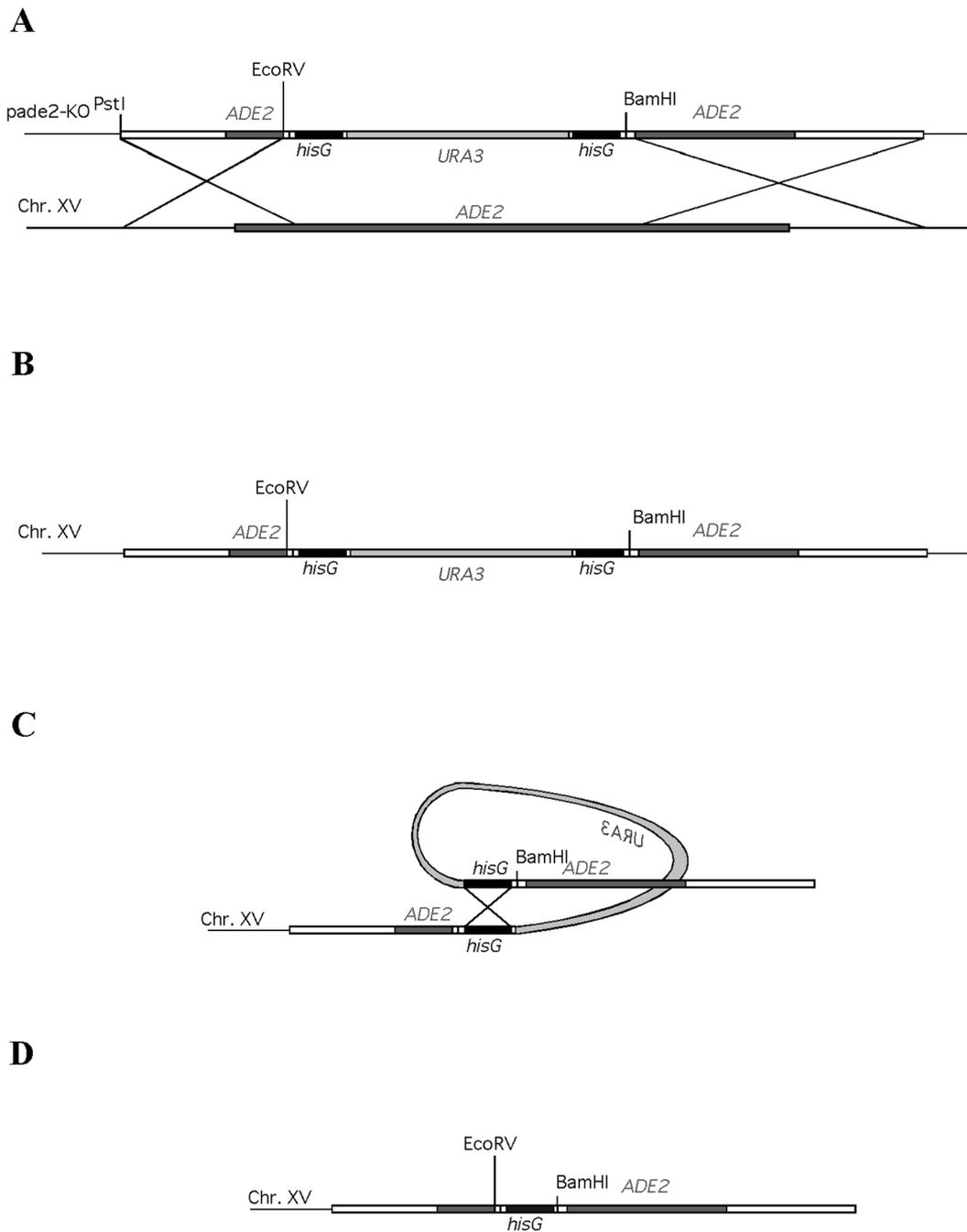


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Mutation des *ADE2*-Locus.

Der Teil A zeigt das Prinzip der interchromosomalen homologen Rekombination in den *ADE2*-Locus. Dies führt zum Austausch von 643 nt des *ADE2*-Gens durch die *hisG-URA3-hisG*-Kassette (B). Die chromosomale Situation nach erfolgter intrachromosomaler Rekombination (C) ist in (D) dargestellt.

2.2.3 Plasmid-Präparationen aus *E. coli*:

Die Gewinnung geringer Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mittels "Wizard Minipreps DNA Purification System" (Promega, Heidelberg) aus 1,5 ml Kultur. In Abwandlung zu den Herstellerangaben wurde das neutralisierte Lysat mit dem 0,5fachen Volumen 2-Propanol gefällt, abzentrifugiert und mit 75 %igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die DNA im Vakuumrotationsverdampfer getrocknet und in 50 µl Wasser gelöst.

2.2.4 DNA-Präparationen aus *S. cerevisiae*

Die Präparationen von genomischer DNA aus *S. cerevisiae* erfolgte nach Ausubel (Ausubel et al., 1998) aus 10 ml Kulturen, die über Nacht inkubiert wurden.

2.2.5 PCR

Die PCR-Reaktionen nach Mullis (Mullis, 1986) wurden unter Verwendung des "Expand High Fidelity PCR Systems" von Boehringer GmbH/ Roche (Mannheim) durchgeführt. Die Anzahl der Zyklen betrug bei genomischer DNA als Matrize 35, bei Plasmid-DNA 25. Die theoretische Hybridisierungstemperatur berechnet sich aus der Nukleotidzusammensetzung der Oligonukleotide wie folgt:

$$T_{\text{ann.}}(^{\circ}\text{C})=[4* (\text{Guanin- und Cytosinbasen})+2* (\text{Adenosin- und Thymidinbasen})]-5.$$

Die Elongationszeit betrug eineinhalb Minuten pro zu amplifizierender Kilobase.

2.2.6 Enzymatische Manipulation von DNA

Die Ligationen (10 µl-Ansatz) und Restriktionen (100 µl-Ansatz) wurden nach Angaben des jeweiligen Herstellers durchgeführt.

2.2.7 Aufreinigung von DNA

PCR-Reaktionen wurden mit dem "High Pure PCR Product Purification Kit" (Boehringer GmbH/ Roche, Mannheim) aufgereinigt.

Für die Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde der Bereich ausgeschnitten, der das gewünschte DNA-Fragment enthielt, pro 100 mg Gel 300 µl QX1-Puffer des "QIAEXII Gel Extraction Kit" (Qiagen, Hilden) zugesetzt und bei 50 °C aufgeschmolzen. Der weitere Ablauf erfolgte unter Verwendung und dem Protokoll des "High Pure PCR Product Purification Kit" (Boehringer GmbH/ Roche, Mannheim).

2.2.8 Radioaktive Markierung von DNA

Aufgereinigte PCR-Amplifikate oder elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente wurden unter Verwendung von Klenow-Enzym und Zufalls-Hexanukleotiden (beide Boehringer GmbH/ Roche, Mannheim) als Primer mit ^{32}P -dCTP radioaktiv markiert (Feinberg und Vogelstein, 1984).

2.2.9 Northern-Blot-Analyse

Die RNA-Präparation erfolgte nach Ausubel et al. (Ausubel et al., 1998) aus 10 ml Kulturen mit einer $OD_{600nm}=1$ der entsprechenden Stämme.

Zehn Mikrogramm der RNA wurden in MEN-Puffer unter Zusatz von 15 % (v/v) Formaldehyd und 50 % (v/v) Formamid 2 min. bei 65 °C denaturiert. Die Auftrennung der RNA erfolgte durch ein 0,8 %iges denaturierendes Agarosegel (0,8 % Agarose in MEN-Puffer + 5 % (v/v) Formaldehyd). Der Transfer auf eine Nylonmembran (Hybond N⁺; Amersham, Braunschweig) erfolgte mit 0,05 M NaOH als Puffer für mindestens 5 Std. durch aufsteigenden Kapillartransfer. Die anschließende Vorhybridisierung erfolgte bei 42 °C für mindestens 3 Std. in Hybridisierlösung. Nach Zugabe der radioaktiv markierten Sonde erfolgte die Hybridisierung über Nacht unter den gleichen Bedingungen wie die Vorhybridisierung. Die Membran wurde in SSC (1x) mit 0,1 % SDS (w/v) bei 65 °C für 20 min. gewaschen. Die Auswertung erfolgte autoradiographisch unter Verwendung einer Verstärkerfolie bei -80 °C oder quantitativ mittels PhosphoImager und dem Programm ImageQuant (beides Molecular Dynamics GmbH, Krefeld).

MEN:	20 mM MOPS, 5 mM NaOAc, 1 mM EDTA, pH7,0
Hybridisierlösung:	0,25 M NaH ₂ PO ₄ , 0,25 M NaCl, 7 % SDS, 1 mM EDTA, 10 mg/l FS-DNA, 5 % (w/v) PEG 6000, 25 % (v/v) Formamid.
SSC (20x):	3 M NaCl, 0,3 M Na ₃ -Citrat·2H ₂ O

2.2.10 Southern-Blot-Analyse (Southern, 1975)

Zur Auftrennung der DNA diente ein 1 %iges Agarosegel. Die Denaturierung der DNA erfolgte durch Behandlung mit 0,25 M HCl bis zum Farbumschlag der Probenpuffer-Farbstoffe (Bromphenolblau bzw. Xylencyanol) in ca. 45 min. Anschließend erfolgte die Neutralisation mit 0,4 M NaOH. Die DNA wurde innerhalb von 3 Std. unter Verwendung von 0,4 M NaOH auf eine positiv geladene

Nylonmembran (Hybond N⁺; Amersham, Braunschweig) transferiert. Diese wurde bei 65 °C für mindestens 3 Std. in APH vorhybridisiert. In diesem Puffer erfolgte auch die anschließende Hybridisierung mit einer DNA-Sonde über Nacht bei 65 °C. Die hybridisierte Membran wurde zweimal mit SSC (2x)/ SDS (0,1 %) und zweimal mit SSC (0,2x)/ SDS (0,1 %) gewaschen. Die Auswertung erfolgte durch Autoradiographie unter Verwendung einer Verstärkerfolie bei -80 °C.

Denhardtslösung (50x): 5 % (w/ v) Ficoll 400, 5 % (w/ v) Polyvinylpyrrolidone,
5 % (w/ v) BSA.

APH: 5x SSC, 5x Denhardtslösung und 100 µg/ ml FS-DNA

2.2.11 DNA-Sequenzanalyse

Die Analyse der DNA Sequenzen erfolgte durch die institutseigene Sequenzierabteilung, Automatic DNA Isolation and Sequencing Group (ADIS), nach dem Prinzip des Didesoxy-Kettenabbruches (Sanger et al., 1977).

2.2.12 Protein-Präparationen

Die kodierende Sequenz der gewünschten Gene wurden unter Berücksichtigung der Leseraster in den Expressionsvektor pGEX5X-1 (Pharmacia, Freiburg) kloniert und in Bakterien des Stammes BL21 (DE3) LysS transformiert. Die Aufreinigung der GST-Fusionsproteine erfolgte unter Verwendung einer Glutathion-Sepharose-Matrix nach Angaben des Herstellers (Pharmacia, Freiburg), wobei die Lyse durch das wiederholte Einfrieren und Auftauen der Bakterien erfolgte. Ferner wurde dem Lysat vor der weiteren Aufreinigung DNaseI (Endkonzentration 1 µg/ ml) zugesetzt und 5 min. inkubiert.

Bei Proteinen, die mit einem His₆-HA-Epitop versehen wurden, erfolgte die Klonierung in den Expressionsvektor pET11a (Invitrogen, Carlsbad). Die Lyse der

mit diesen Plasmiden transformierten *E. coli* (BL21 (DE3) LysS) erfolgte analog der Aufreinigung der GST-Fusionsproteine. Die erhaltenen Bakterienextrakte wurden mittels Ni²⁺-Säulen ("His Trap"; Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.2.13 Analyse von *in vitro*-Proteininteraktionen

Die GST-Fusionsproteine wurden an eine Glutathion-Sepharose-Matrix (Pharmacia, Freiburg) gebunden und im Anschluß an ihre Aufreinigung nicht von dieser eluiert. Nach Zugabe des rekombinanten, in *E. coli* exprimierten und aufgereinigten His₆-HA-TUP1-Protein, wurde für eine Stunde bei 4 °C in PBS inkubiert. Anschließend wurde viermal mit PBS gewaschen. Die Matrix mit den gebundenen Proteinen wurden mit SDS-Ladepuffer (2x) versetzt, hitzedenaturiert und mittels SDS-PAGE in einem 8 %igen Gel aufgetrennt. Die Analyse erfolgte durch einen Western-Blot unter Verwendung eines -HA-Antikörpers.

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄·7H₂O,
1,4 mM KH₂PO₄

SDS-Ladepuffer (2x): 20 % (v/v) Glycerol, 2 % (w/v) SDS, 125,5 mM Tris-HCl (pH6,8), Bromphenolblau

2.2.14 Western-Blot-Analyse

Die Durchführung der Western-Blots erfolgte nach dem Protokoll von Sambrook (Sambrook, 1989) unter Verwendung des "Semi dry"-Verfahrens, für 1 Std. bei 1 bis 1,5 mA pro cm² Gel. Anschließend erfolgte eine Behandlung der Nitrozellulosemembran mit Blockierpuffer für 1 Std., wobei unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt wurden. Die danach folgende Inkubation der Membran mit der primären Antikörperlösung wurde bei

Raumtemperatur für mindestens 3 Std. durchgeführt. Erfolgte diese Inkubation über Nacht, so geschah dies bei 4 °C. Anschließend wurde zweimal für 30 min. mit 1 % (w/ v) Magermilchpulver in TBS-T gewaschen und analog zum primären Antikörper mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Nach zweimaligem Waschen für je 30 min. mit TBS-T erfolgte die Detektion unter Verwendung des “ECL Western Blotting-Detection”-Systems von Amersham (Braunschweig) nach Angaben des Herstellers.

Blockierpuffer:	5 % (w/ v) Magermilchpulver in 10 mM Tris-HCl (pH7,4)
TBS-T:	20 mM Tris-HCl (pH7,4), 154 mM NaCl, 0,03 % (v/ v) Tween-20
Antikörperlösung:	5 % (w/ v) Magermilch in TBS-T

2.2.15 *In vivo* Protein-Protein-Interaktionen

Zur Untersuchung von *in vivo* Protein-Protein-Interaktionen wurde das Split-Ubiquitin-System (Wittke et al., 1999) verwendet. Diesem liegt der “Ubiquitin-based split-protein sensor” USPS (Johnsson und Varshavsky, 1994) zugrunde. Dieser ist aus Erkenntnissen über das Ubiquitin-System (zusammengefasst in: Hershko und Ciechanover, 1998; Varshavsky, 1997) entwickelt worden, wonach die Ubiquitinierung von Proteinen ein Degradationssignal darstellt. Das Split-Ubiquitin-System basiert auf der funktionellen Rekonstitution der Tertiärstruktur des in seine Subdomänen geteilten Ubiquitins, ähnlich der eines Aktivators im “Two-Hybrid-System”. Die Auswertung erfolgt im Gegensatz zu diesem nicht durch die transkriptionelle Aktivierung eines Reporters, sondern durch die Erkennung und Abspaltung eines Reporterproteins durch Ubiquitin C-terminale Hydrolasen (UCHs) (Pickart und Rose, 1985) und Ubiquitin-spezifische Proteasen (UBPs) (Baker et al., 1992; Tobias und Varshavsky, 1991).

Durch den N-terminalen Aminosäurerest läßt sich die Stabilität des Reporterproteins beeinflussen (“N-end rule”) (Varshavsky, 1997; Varshavsky, 1996). Zusammen mit

einem proteinintern gelegenen Lysin bildet dieser das “N-degron” genannte Degradationssignal. Dieses bedingt die Proteolyse des Reporterproteins durch das 26S Proteosom (Ferrell et al., 2000). Bei dem in dieser Arbeit verwendeten System ist die erste Aminosäure des Reporterproteins durch die Aminosäure Arginin (R) ersetzt. Dies führt zu einem raschen Abbau des Reporterprotein (Levy et al., 1996), was für die Sensitivität der Interaktionsanalyse wichtig ist. Die Analyse kann durch die Bestimmung des Verhältnisses Fusionsprotein zu abgespaltenen Reporterprotein ausgewertet werden. In dieser Arbeit wurde zur Auswertung die Funktionalität des Reporterproteins genutzt.

Als Reporterprotein wurde das “Green Fluorescent Protein” (GFP) und die vom *URA3*-Gen kodierte ODCase verwendet. Mit letzterem läßt sich eine Auswertung durch Selektion auf Vorhandensein der ODCase-Aktivität (Uracilmangel-Medium) oder durch Gegenselektion, auf Abwesenheit der ODCase-Aktivität (FOA-haltiges Medium) vornehmen. Die Toxizität von FOA basiert auf dessen Umsetzung zu 5-Fluor-dUMP, welches die Thymidylatsynthase irreversibel hemmt (Bisson und Thorner, 1981). Das GFP ließ sich durch Anregung mit UV-Licht von 475 nm sichtbar machen.

Das Prinzip des verwendeten Systems ist in Abb. 2.2 dargestellt. Die deubiquitinierenden Proteasen erkennen den C-terminalen Teil (C_{ub}) des Ubiquitins nicht als Substrat. Wird der N-terminale Teil (N_{ub}) koexprimiert, rekonstituiert sich hingegen vereinzelt ein “Ubiquitin”, das erkannt und dessen Reporterprotein abgespalten wird (vgl. Abb. 2.2 A). Werden Fusionen von nicht interagierenden Proteinen und diesen Ubiquitinsubdomänen exprimiert, erfolgt ebenfalls nur vereinzelt eine Abspaltung und die Zellen weisen weiterhin einen Ura^+ / FOA^S -Phänotyp auf (Teil B der Abb. 2.2) bzw. zeigen im Fall des GFP als Reporter eine grüne Fluoreszenz. Eine Fusion von zwei interagierenden Proteinen an diese Subdomänen erhöht die lokalen Konzentrationen dieser Subdomänen relativ zueinander. Es resultiert eine verstärkte Abspaltung des Reporterproteins, welche mit der Stärke der Interaktion korreliert. Der Abbau durch das 26S Proteosom bedingt,

daß die Zellen nun einen Ura⁻/FOA^R-Phänotyp aufweisen (Abb. 2.2 C). Im Fall des GFP-Reporters sinkt die Anzahl der Zellen, die Fluoreszenzsignale zeigen.

Der N-Terminus des Ubiquitins (Aminosäuren 1-36) wurde in die Vektoren pADNX/ pACNX (N. Lehming) kloniert (vgl. Anhang 7.2). Die mit diesen Vektoren transformierten Zellen haben einen LEU2⁺ Phänotyp, und die im gleichen Leseraster carboxyterminal klonierte DNA wird als N_{ub}-Fusionsprotein unter der Kontrolle des ADH1-Promotors exprimiert. Die klonierten DNA-Sequenzen waren entweder PCR-Amplifikate oder Fragmente genomischer DNA, die partiell mit Sau3AI verdaut worden waren.

Der C-Terminus des Ubiquitins (Aminosäuren 35-76) befand sich in dem Vektor pRS304 fusioniert an die kodierende Sequenz des *URA3*-Gens. Die aminoterminal von C_{ub} im gleichen Leseraster klonierte DNA wird unter der Kontrolle des induzierbaren *CUPI*-Promotor exprimiert (N. Johnsson). Im Fall der Verwendung von GFP als Reporter befand sich, ebenfalls unter der Kontrolle des *CUPI*-Promotors, die C_{ub}-GFP-Fusion in dem Vektor pRS313 (N. Lehming). Die entsprechenden Plasmide mit den N_{ub}- und C_{ub}-Konstrukten wurden in JD52 *ade* (vgl. 2.2.) transformiert und durch Wachstum auf Leu/ Trp- Mangelmediumsplatten selektiert. Die so erhaltenen Zellen wurden in Flüssigmedium kultiviert, abzentrifugiert und mit sterilem Wasser gewaschen. Nach Resuspension in TE (pH7,5) sind diese in Verdünnungen von einer Zehnerpotenz auf Leu/ Trp-, Uracil/ Leu/ Trp- und FOA/ Leu/ Trp-Mangelmediumsplatten getropft worden, wobei die beiden letzteren 0, 10 oder 100 µM CuSO₄ enthielten. Durch CuSO₄ wurde die Menge an C_{ub}-Fusionsproteinen reguliert, da deren Transkription unter der Kontrolle des kupferinduzierbaren Promotors des *CUPI*-Gen steht. Die Leu/ Trp-Mangelmediumsplatten dienten zur Transformationskontrolle. Interaktionen zwischen den Proteinen zeigten sich in einem Nichtwachstum auf Uracil/ Leu/ Trp-

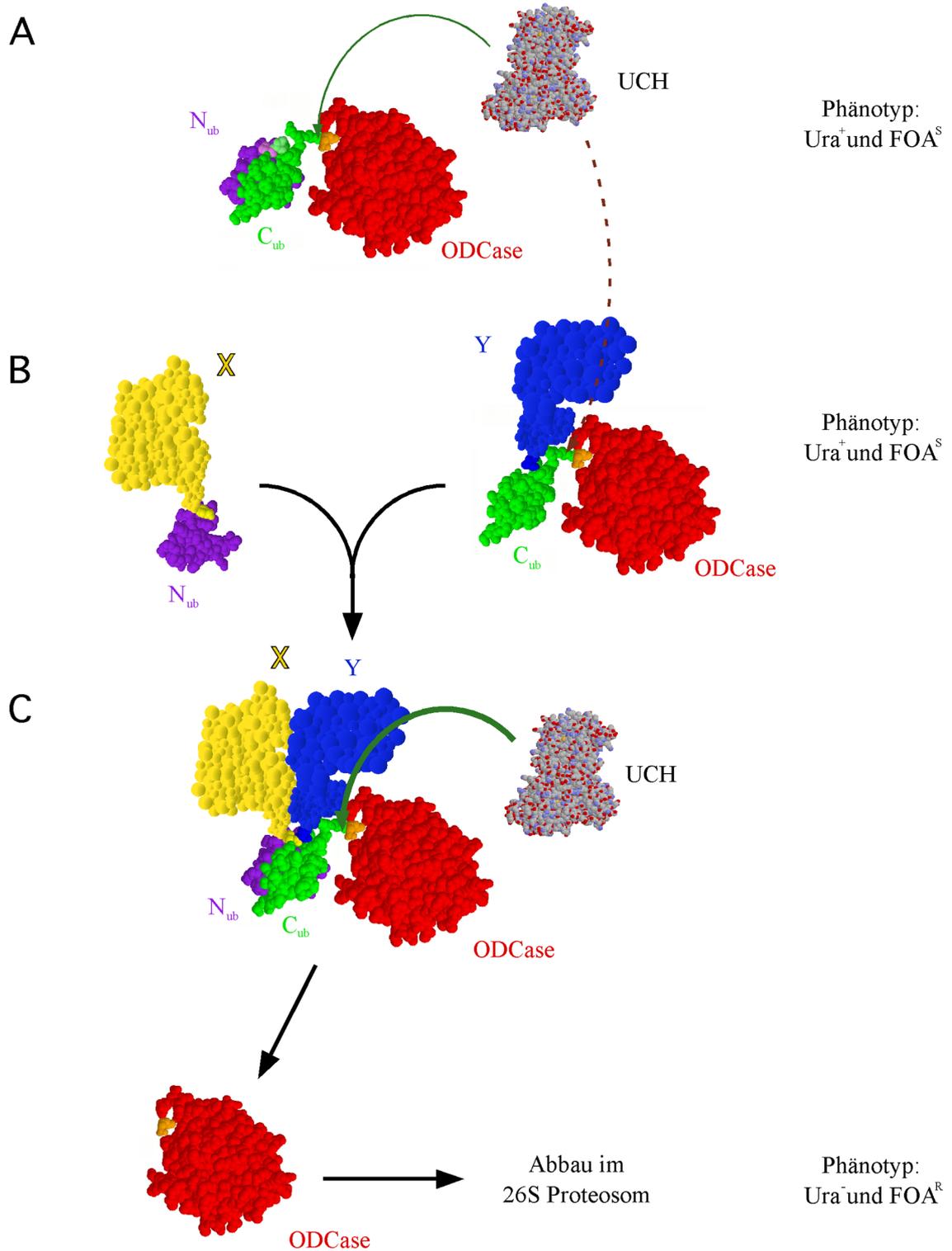


Abb. 2.2: Das "Split-Ubiquitin-System"

Die Abbildung zeigt das Prinzip des "Split-Ubiquitin-System" mit der Orotidin-5'-monophosphat-Decarboxylase (ODCase) als Reporterprotein (rot; der destabilisierende Argininrest orange). Die N-terminale Ubiquitin-domäne ist in violett, die C-terminale in grün dargestellt. Ubiquitin, ODCase und UCH sind in ihrer publizierten Kristallstruktur wiedergegeben (RSCB Protein Data Bank (Berman et al., 2000); ID: 1UBQ (Ubiquitin), 1DQW (ODCase) und 1UCH (UCH)).

Mangelmediumsplatten bzw. in einem Wachstum auf FOA/ Leu/ Trp-Mangelmediumsplatten.

In Experimenten mit GFP als Reporterprotein wurde nach der Transformation auf Leu/ His-Mangelmediumsplatten selektiert und mit 300 μM CuSO_4 induziert. Die Zellen sind anschließend direkt von den Platten genommen und mikroskopisch analysiert worden.

3. Ergebnisse

In *S. cerevisiae* ist TUP1 als genereller Repressor der Transkription bekannt. Zur weiteren Aufklärung der Funktionsweise wurde *in vivo* nach interagierenden Proteinen gesucht (N. Lehming). Im allgemeinen wird dafür das “Two-Hybrid-System” eingesetzt. Der Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, daß es auf der Erhöhung der Transkriptionsrate eines Reportergenes basiert und die repressorischen Eigenschaften von TUP1 mit dieser interferieren kann. Dadurch könnten schwache Protein-Protein-Interaktionen zu einem falsch-negativem Resultat führen. Daher wurde zur Suche nach interagierenden Proteinen das “Split-Ubiquitin-System” verwendet, welches auf der Funktionalität eines Reporterproteins basiert.

3.1 Eignung des “Split-Ubiquitin-System” zur Suche nach TUP1-Interaktionspartnern

Die Abbildung 3.1 zeigt anhand der bereits bekannten Interaktion von TUP1 und seinem Komplexpartner SSN6 die prinzipielle Möglichkeit, mit diesem System nach Interaktionspartnern von TUP1 zu suchen.

Die Interaktion von SSN6 und TUP1 führt zu einer Degradation der ODCase, die als Reporterprotein verwendet wurde. Dies hat zur Folge, daß die Stämme auxotroph in Bezug auf Uracil werden und auf Uracilmangelmedium nicht wachsen können (vgl. Abb. 3.1 B). Ferner kann in diesen Stämmen 5-Fluororotsäure nicht zu 5-Fluoruracil umgesetzt werden, womit die Stämme resistent gegen FOA werden und auf Medien wachsen können, die diese enthalten (vgl. Abb. 3.1 C). N_{ub} selber bedingte keinen Abbau des Reporterproteins.

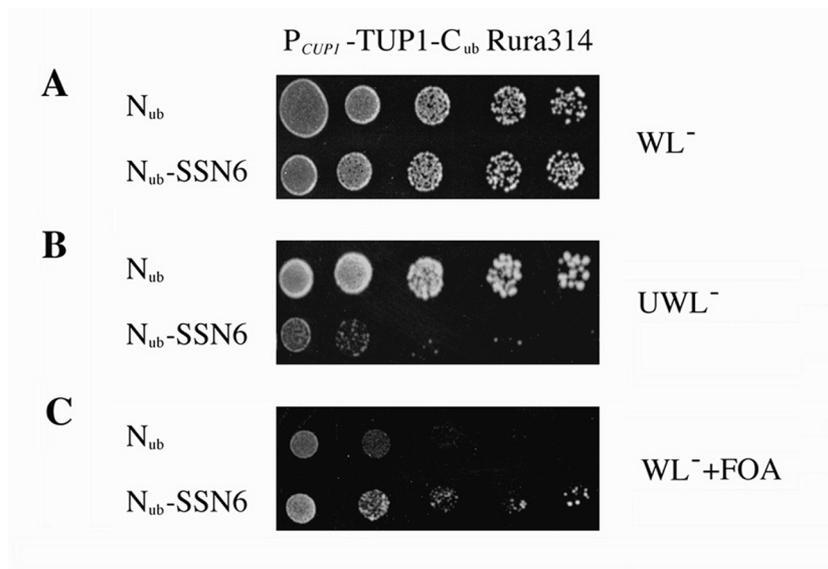


Abb. 3.1: Das “Split-Ubiquitin-System” als Möglichkeit zur Suche nach Interaktionspartnern von TUP1.

Dargestellt ist eine Analyse zur Untersuchung der bekannten Interaktion von SSN6 und TUP1 mittels des “Split-Ubiquitin-Systems”. Der Stamm JD52 *ade2* wurde mit für N_{ub} - und C_{ub} -Fusionen kodierenden Plasmiden (J. Schüller) transformiert. Die N_{ub} bzw. N_{ub} -SSN6 exprimierenden Plasmide waren pACNX-Derivate mit einem ARS-CEN-“ori” (=“single copy”). Die jeweiligen Stämme wurden in 1:10 Verdünnungen aufgetropft. Zusätzliches $CuSO_4$ wurde keiner der Mediumsplatten zugesetzt, d.h. der *CUPI*-Promotor wurde nicht induziert. (A) Tryptophan/ Leucin-Mangelmedium-Platte zur Kontrolle der Transformationseffizienz. (B) Die Interaktion von SSN6 mit TUP1 führt zur Uraciluxotrophie und einem Nichtwachstum auf Uracilmangelmedium bzw. (C) zu Resistenz und Wachstum auf FOA-haltigen Platten.

3.2 Der “Pyrimidine Pathway Regulator 1” (PPR1) interagiert mit TUP1

Bei der Suche nach TUP1-Interaktionspartnern mit dem “Split-Ubiquitin-System” wurde von N. Lehming unter anderem ein Klon gefunden, der für ein an N_{ub} fusioniertes Fragment des Aktivatorproteins PPR1 (Aminosäuren 97 bis 208) kodiert. Zur Überprüfung, ob die FOA-Resistenz tatsächlich auf diesen Klon zurückzuführen ist, wurde versucht das Ergebnis zu verifizieren. Die gefundene Interaktion konnte reproduziert werden, wie aus Abbildung 3.2 (1. Verdünnungsreihe) ersichtlich.

Eine Interaktion der beiden Proteine ist insofern interessant, als daß PPR1 nur ein extrem schwaches Aktivierungspotential besitzt und eine Interaktion mit dem Repressor TUP1 eine Erklärung hierfür geben könnte.

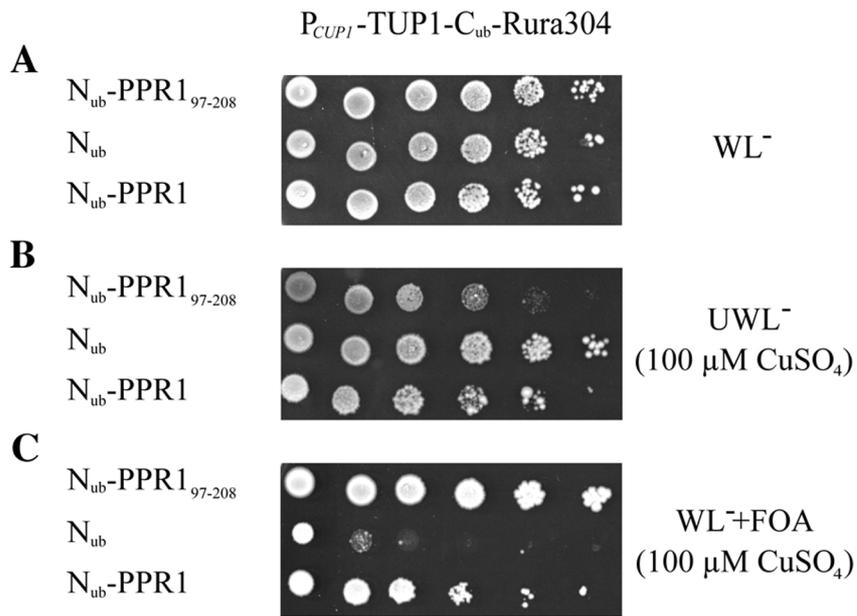


Abb. 3.2: Interaktion des “Pyrimidine Pathway Regulator 1” mit TUP1 im “Split-Ubiquitin-System”.

Dargestellt ist eine Analyse zur Untersuchung der Interaktion von PPR1 (Aminosäure 97-208 und Aminosäure 1-904) und TUP1 unter Verwendung des “Split-Ubiquitin-Systems”. Der verwendete Stamm (JD52 *ade2*) besaß eine Integration des Plasmides zur Expression des C_{ub} -Fusionsproduktes im *TRP1*-Locus. In diesen wurde die für die N_{ub} -Fusionen kodierenden Plasmide transformiert. Die N_{ub} bzw. N_{ub} -PPR1/ N_{ub} -PPR1₉₇₋₂₀₈ exprimierenden Plasmide waren pADNX-Derivate mit einem 2μ m-“ori” (=“multi copy”). Die jeweiligen Stämme wurden in 1:10 Verdünnungen aufgetropft. (A) Tryptophan/ Leucin-Mangelmedium-Platte zur Kontrolle der Transformationseffizienz. (B) Die Interaktion der gefundenen PPR1-Domäne (Aminosäure 97-208) und von PPR1 mit TUP1 führt zur Uraciluxotrophie und einem Nichtwachstum auf Uracilmangelmedium bzw. (C) zu Resistenz und Wachstum auf FOA-haltigen Platten.

Die Aminosäuren 97 bis 208 schließen sich direkt an einen Bereich an, in dem eine vorhergesagte “coiled-coil”-Struktur (Reece und Ptashne, 1993) von Marmorstein und Harrison (Marmorstein und Harrison, 1994) gezeigt wurde (vgl. Abb. 3.3 C). In Abb. 3.3A sind die Lage des interagierenden Bereiches und die der bisher bekannten Domänen schematisch dargestellt. Teil B der Abb. 3.3 zeigt dies anhand der Röntgenstruktur des Proteins, soweit sich diese in dem durch Marmorstein und Harrison (Marmorstein und Harrison, 1994) analysierten Fragment befinden:

Eine Analyse der Sequenz der interagierenden Aminosäuren mittels des GCG-Teilprogramms MOTIFS ergab keine bekannten Sequenzmerkmale. Weiterhin zeigte ein Vergleich mit verschiedenen Proteindatenbanken durch das Programm BLASTP 2.0.13 am National Center for Biotechnology Information (NCBI) des NIH in Bethesda, MD (Altschul et al., 1997) keine relevanten Homologien zu anderen Proteinen. Nach einem Sequenzvergleich (vgl. Reece und Ptashne, 1993 und Abb. 3.3 C) entspricht die Dimerisierungsdomäne von GAL4 (Aminosäure 50 bis 100) dem Bereich von Aminosäure 73 bis 123 in PPR1. Die räumliche Lage der Aminosäuren 97 bis 208 im nativem Protein läßt sich aus der Röntgenstrukturanalyse nur bedingt bestimmen, da es nur teilweise analysiert wurde (vgl. Abb. 3.3 B). Ihr ist aber zu entnehmen, daß diese mit dem Zinkcluster, der Dimerisierungsdomäne und der "Linker"-Domäne des Dimerpartners interagiert (vgl. Einleitung, Abb. 1.1 und Abb. 3.3 B).

Um auszuschließen, daß bedingt durch die Tertiärstruktur des Gesamtproteins dieser Bereich für eine Interaktion nicht zugänglich ist, wurde die Interaktion von TUP1 mit dem gesamten PPR1 überprüft. Mit dem Konstrukt pADNX-N_{ub}IBC3-PPR1 ließ sich PPR1 als N_{ub}-Fusionsprotein exprimieren und im "Split-Ubiquitin-System" einsetzen (vgl. hierzu auch Abb. 3.6). Wie Abbildung 3.2 zeigt, ist das vollständige PPR1 in der Lage mit TUP1 zu interagieren, wenn auch schwächer als das bei der Suche gefundene Fragment.

Eine Deletion des interagierenden Bereiches sollte dazu führen, daß eine Interaktion nicht mehr stattfindet. Zur Verifizierung der Interaktion wurde daher analog zu pADNX-N_{ub}IBC3-PPR1 ein Konstrukt kloniert, bei dem durch eine interne Deletion die Aminosäuren 124 bis 208 im Protein fehlten (vgl. Anhang 7.2). Die Deletion wurde bewußt kleiner gewählt als die gefundene, interagierende Domäne, um eine Beeinflussung der Dimerisierung und/ oder der Bindungsspezifität dieser Mutante zu vermeiden.

Die mutierte Version des PPR1-Proteins (PPR1₁₋₁₂₃₊₂₀₉₋₉₀₄) zeigt keine Interaktion mit TUP1 (vgl. Abb. 3.4).

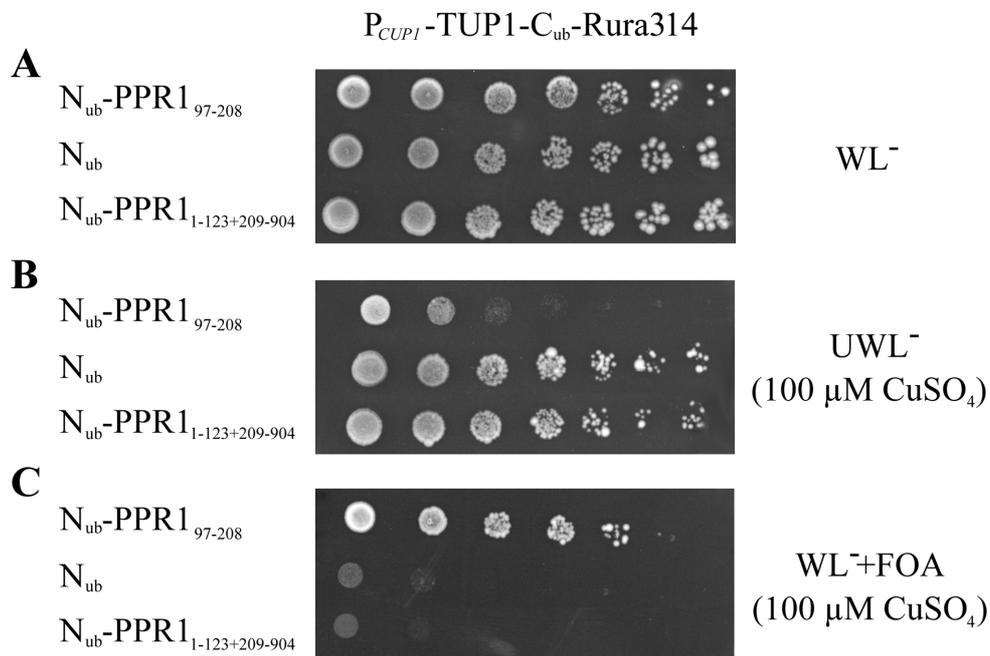


Abb. 3.4: Eine interne Domäne in PPR1 bedingt die Interaktion mit TUP1.

Die dargestellte Analyse zeigt den Verlust der Interaktion durch die Deletion der internen PPR1-Domäne von Aminosäure 124 bis 208. Die jeweiligen Stämme wurden in 1:10 Verdünnungen aufgetropft. Die Effizienz der Transformation der N_{ub} - bzw. C_{ub} -Fusionsproteine kodierenden Plasmide in JD52 *ade2* wurde durch Wachstum auf einer Tryptophan/ Leucin-Mangelmedium-Platte kontrolliert (A). Die N_{ub} -Fusionen exprimierenden Plasmide waren pADNX-Derivate mit einem 2 μ m-ori". Die Untersuchung zur Uracilauxotrophie (B) zeigt abhängig von der Stärke der Interaktion zwischen den Fusionsproteinen ein reduziertes Wachstum. Der Effekt ist für N_{ub} -PPR1₉₇₋₂₀₈ zu beobachten, während N_{ub} -PPR1₁₋₁₂₃₊₂₀₉₋₉₀₄ etwa dem N_{ub} -Hintergrund entspricht. Dem Wachstum auf Uracilmangelmedium komplementär ist das auf FOA-haltigem Medium (C), bei dem durch die funktionelle ODCase toxisches 5-Fluor-UMP synthetisiert wird.

In einem unabhängigen Experiment, in dem das "Green Fluorescent Protein" (GFP) als Reporterprotein des "Split-Ubiquitin-System" fungierte, wurden die Ergebnisse bestätigt. In diesem zeigte die Koexpression von TUP1- C_{ub} -Rgfp313 (N. Lehming) und N_{ub} -PPR1₁₋₁₂₃₊₂₀₉₋₉₀₄ mit etwa 10% ein von der Größenordnung ähnlich hohes Niveau von fluoreszierenden Zellen wie im Fall der Koexpression der N-terminalen Domäne von Ubiquitin (ca. 20% der Zellen). In Zellen, die N_{ub} -PPR1 exprimierten, wurde durch die Interaktion der N_{ub} - und C_{ub} -Fusionsproteine das GFP abgebaut, so daß höchstens 1% der Zellen eine Fluoreszenz aufwiesen. Abbildung 3.5 zeigt für die drei Fälle exemplarische Aufnahmen von Zellen. In ihnen ist auch deutlich eine

Lokalisation von TUP1-C_{ub}-Rgfp zu erkennen, die für ein Repressorprotein wie TUP1 im Nukleus erwartet wird.

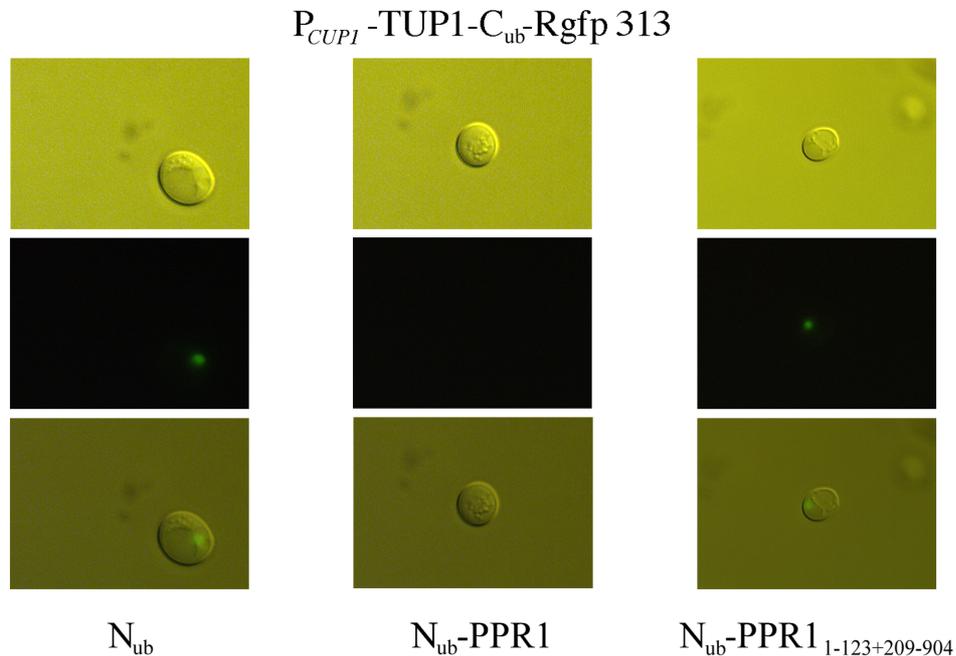


Abb. 3.5: Die Interaktion von PPR1 mit TUP1 im “Split-Ubiquitin-System” mit GFP als Reporterprotein.

Die Abbildungen der unteren Reihe sind durch das Programm Adobe Photoshop generierte Überlagerung der Aufnahmen der oberen (Phasenkontrastaufnahmen) und die mittleren (Fluoreszenzaufnahmen) Reihe mit einer Transparenz von 50%. Der linke Teil zeigt das Kontrollexperiment, in dem N_{ub} von einem 2 μ m-Plasmid exprimiert wurde. Deutlich erkennbar ist eine klare Lokalisation des GFP-Fusionsproteins. Die Fusion des gesamten PPR1 an N_{ub} führt durch die Interaktion mit TUP1 zum Abbau des GFP (Mitte). Im Fall der Expression des interaktionsdefizienten N_{ub} -PPR1₁₋₁₂₃₊₂₀₈₋₉₀₄ bleibt das GFP funktionell und kann durch UV-Licht angeregt werden (rechts).

Eine Western-Blot-Analyse, dessen Ergebnis in Abb. 3.6 gezeigt ist, bestätigte, daß beide in den Analysen verwendeten N_{ub} -PPR1-Versionen unter der Kontrolle des Promotors des *ADHI*-Genes in Hefe exprimiert werden. Somit läßt sich das Fehlen einer Interaktion nicht auf den Abbau bzw. einer nicht korrekten Expression dieser Fusionsproteine zurückführen.

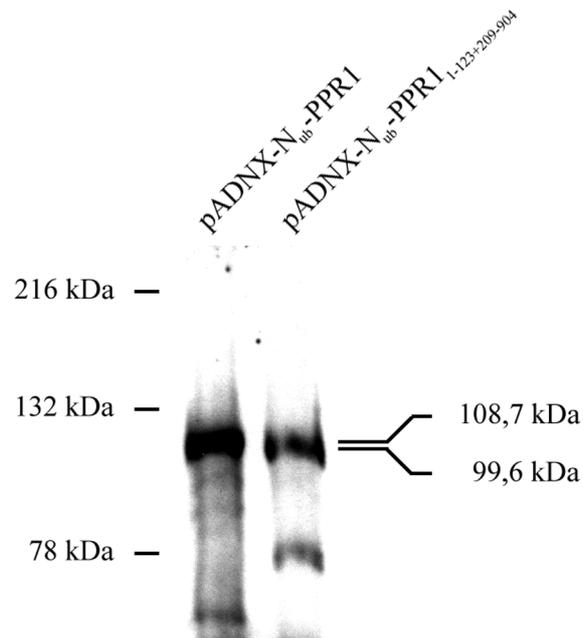


Abb. 3.6: Western-Blot-Analyse der N_{ub} -Fusionproteine.

Die Abbildung zeigt die korrekte Expression der in dem "Split-Ubiquitin-System" involvierten Fusionen N_{ub} -PPR1 und N_{ub} -PPR1₁₋₁₂₃₊₂₀₉₋₉₀₄. Die mit den jeweiligen Konstrukten transformierten Hefen (JD52 *ade2*) wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen, hitzedenaturiert und auf einem 8 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit -HA-Antikörpern.

3.1.1 Die Interaktion von PPR1 und TUP1 ist direkt

Der Hefestamm, in dem die Interaktion zwischen TUP1 und PPR1 beobachtet wurde, exprimiert SSN6, das zweite Protein im TUP1/ SSN6-Komplex. Somit stellt sich die Frage, ob die Interaktion direkt ist oder ob sie durch SSN6 vermittelt wird, wie es bei anderen SSN6/ TUP1 rekrutierenden DNA-bindenden Proteinen der Fall ist.

Um eine mögliche direkte Interaktion zu prüfen, wurden PPR1 und die Deletionsmutante PPR1₁₋₁₂₃₊₂₀₉₋₉₀₄ als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert. Hierzu wurden die mittels PCR amplifizierten Fragmente in den Vektor pGEX-5X-1 kloniert (vgl. Anhang 7.2). Die Expression der vollständigen Fusionsproteine wurde durch eine Western-Blot-Analyse überprüft, dessen Resultat in Abb. 3.7 A gezeigt ist. Wie unter 2.2 beschrieben, wurde *in vitro* eine Analyse der Interaktion von

diesen mit dem, ebenfalls in *E. coli* exprimierten, H₆-HA-TUP1-Protein durchgeführt. Das Ergebnis zeigt Abb. 3.7 B.

Wie aus der Abbildung 3.7 B ersichtlich, ist GST-PPR1 in der Lage, auch *in vitro* mit TUP1 zu interagieren, so daß dieses mit der Glutathion-Sepharosematrix kopräzipitiert und durch sein HA-Epitop in der Western-Blot-Analyse nachgewiesen

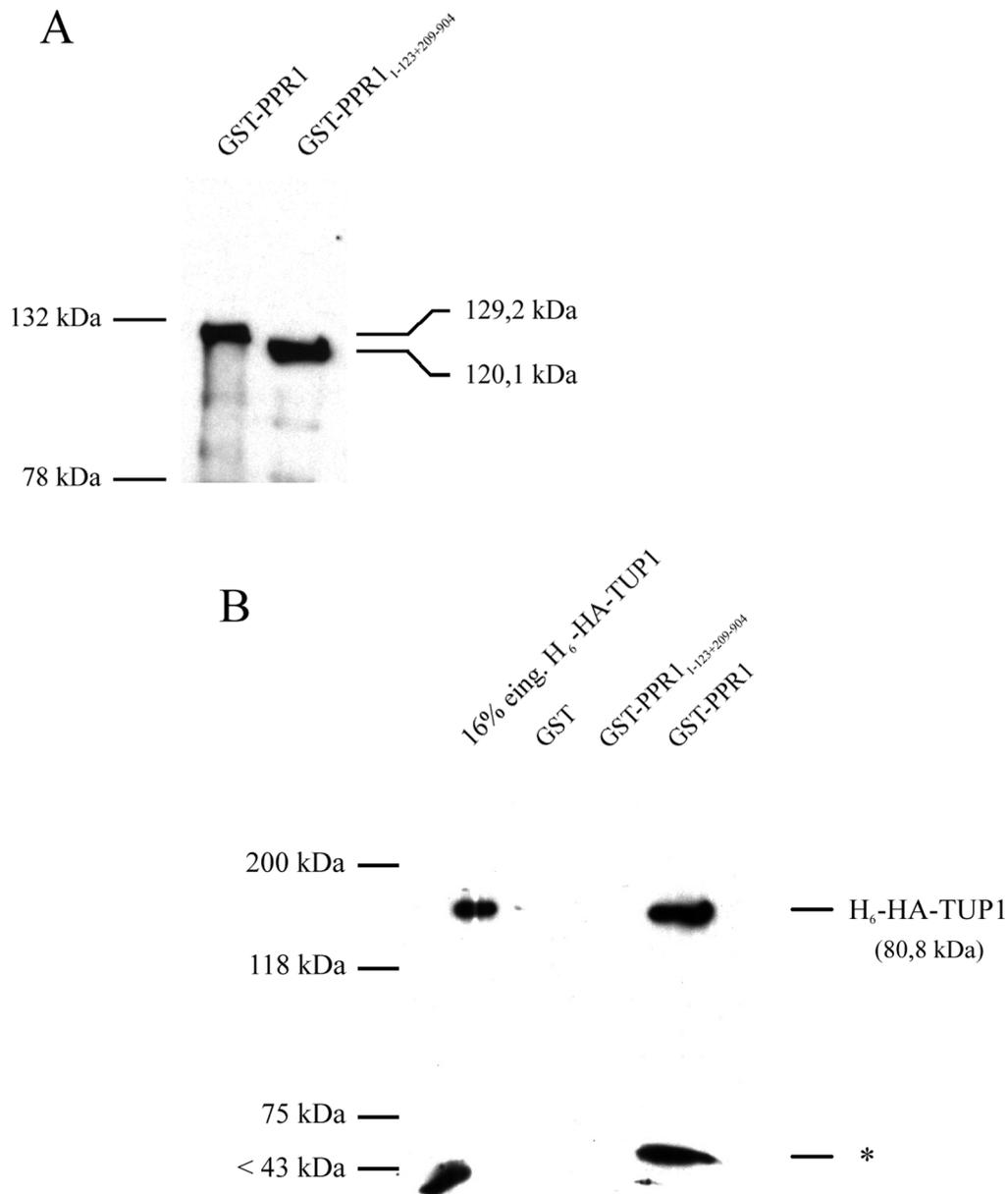


Abb. 3.7: PPR1 und TUP1 interagieren *in vitro* direkt.

(A) zeigt die Western-Blot-Analyse von an Glutathion-Sepharose gebundenen GST-Fusionsproteinen zur Bestätigung ihrer Expression in *E. coli*. Die Detektion erfolgte mit α -GST-Antikörpern. In (B) ist das Ergebnis einer Kopräzipitation von GST-PPR1 mit H₆-HA-TUP1 (S. Heck) gezeigt. H₆-HA-TUP1 wurde auf Grund seines HA-Epitopes durch α -HA-Antikörper identifiziert. Das mit einem Stern gekennzeichnete Signal stammt von einem nicht vollständig transkribierten und/ oder translatiertem H₆-HA-TUP1 oder einem Degradationsprodukt.

werden konnte (vgl. Spur 1 mit 4 in Abb. 3.7 B). Ferner konnte für die Deletionsmutante PPR1₁₋₁₂₃₊₂₀₉₋₉₀₄ auch in diesem Experiment keine Interaktion nachgewiesen werden (vgl. Spur 1 mit 3 in Abb. 3.7 B).

Damit lassen die *in vitro* und *in vivo* Daten auf eine direkte Interaktion von PPR1 und TUP1 schließen. Es konnte gezeigt werden, daß die Aminosäuren 124 bis 208 notwendig, und die Aminosäuren 97 bis 208 hinreichend für diese Interaktion sind.

3.3 Die Interaktion von PPR1 und TUP1 ist physiologisch relevant

Nachdem festgestellt wurde, daß PPR1 und TUP1 miteinander interagieren, ergibt sich die Frage, ob diese Interaktion im Kontext der Transkriptionskontrolle eine Rolle spielt. Das schwache Aktivationspotential von PPR1 in bezug auf die Expression des *URA3*-Gens mag dieses reflektieren. In diesem Fall wäre zu erwarten, daß eine Hefemutante mit einer Deletion des *TUP1*-Gens eine erhöhte Expression des *URA3*-Gens aufweist.

Die verfügbaren Hefestämme wiesen alle einen *ura3-52* Genotyp auf, d.h. in ihnen war das *URA3*-Gen nicht funktionell, da sie ein insertiertes Ty-Element tragen (Rose und Winston, 1984).

Um die Expression des *URA3*-Gens zu untersuchen, wurde sowohl in einem Wildtypstamm, als auch in einer TUP1-Deletionsmutante (N. Lehming) die Ty-Insertion aus dem *URA3*-Locus entfernt. Dies erfolgte, wie in Abb. 3.8 schematisch dargestellt, durch homologe Rekombination des *URA3*-Gens, welches als BglII/ SacI-Fragment dem Plasmid "spacing template" entnommen wurde, in den *URA3*-Locus. Die Rekonstruktion des *URA3*-Gens wurde durch eine Southern-Blot-Analyse überprüft. So wurde sichergestellt, daß keine illegitime Rekombination des verwendeten Fragmentes eingetreten ist und der Promotor des Gens nicht mehrmals im Genom vorliegt. Damit wurde ausgeschlossen, daß limitierte Transkriptionsfaktoren durch den Promotor des nichtfunktionellen Gens abgefangen

und die weiteren Analysen beeinflusst werden könnten. Das Ergebnis der Southern-Blot-Analyse ist in Abb. 3.8 dargestellt:

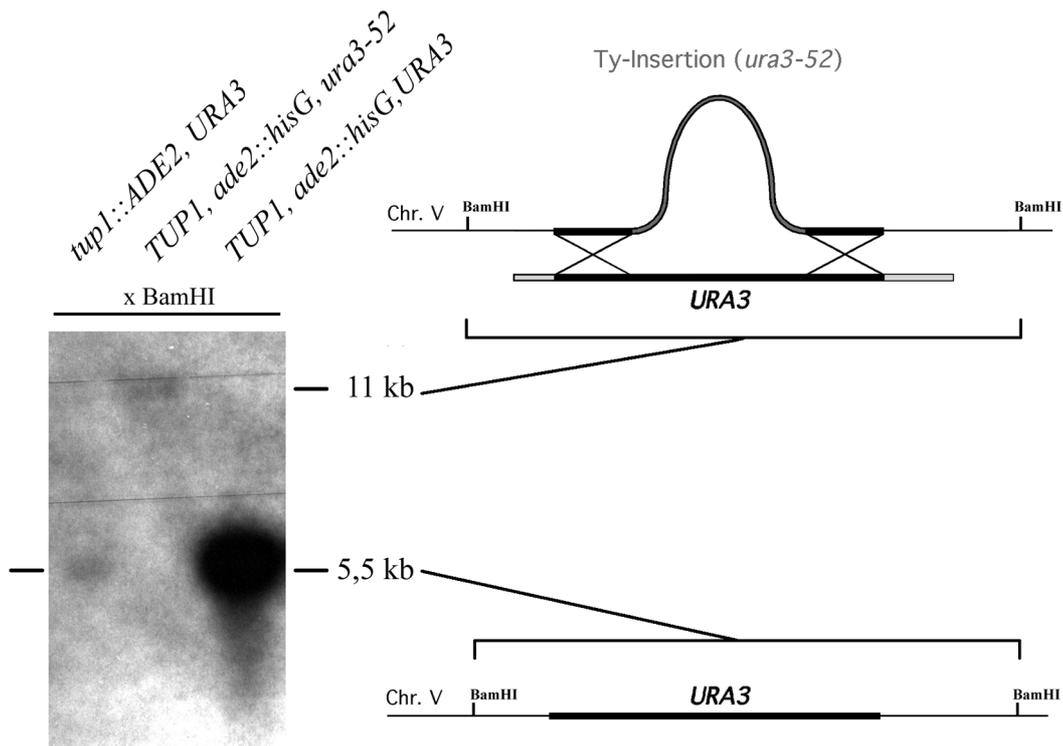


Abb. 3.8: Southern-Blot-Analyse zur Rekonstruktion des funktionellen *URA3*-Gens.

Der rechte Teil der Abbildung zeigt schematisch die unterschiedlichen Situationen der *ura3-52* und *URA3* Genotypen, sowie das Prinzip der homologen Rekombination, die zur Rekonstruktion des funktionellen *URA3*-Gens führte. Ebenfalls dargestellt sind die verwendeten *BamHI*-Restriktionsschnittstellen, anhand derer die beiden unterschiedlichen Genotypen durch eine Southern-Blot-Analyse charakterisiert wurden, die im linken Teil dargestellt ist (vgl. Rose und Winston, 1984). Die erste Spur zeigt die Rekonstruktion in einem *TUP1*-Deletionsstamm, die dritte Spur die in einem Wildtypstamm JD52 *ade2*, während die mittlere die Kontrolle des Ausgangsstammes zeigt.

3.1.1 Eine Deletion von TUP1 erhöht die Transkription des *URA3*-Gens

Die Höhe der Expression des *URA3*-Gens dieser beiden Stämme wurde durch eine Northern-Blot-Analyse ermittelt. Hierbei wurden RNA-Präparationen aus den in unterschiedlichen Medien kultivierten Stämmen gewonnen. Wie Abb. 3.9 zeigt, exprimiert die TUP1-Deletionsmutante unabhängig von dem Medium, in dem der Stamm kultiviert wurde, das *URA3*-Gen auf hohem Niveau (Spuren 2, 4 und 6 in Abb. 3.9). Der Wildtypstamm zeigt eine geringere Expression, die durch Uracilmangel induziert werden konnte (vgl. Abb. 3.9 Spur 3 vs. Spur 1).

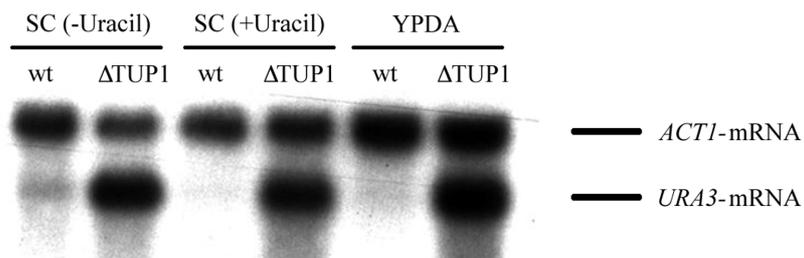


Abb. 3.9: Northern-Blot-Analyse der Gesamt-RNA von Wildtyp- und TUP1-Deletionsstämmen.

Die Gesamt-RNA der in den angegebenen Medien kultivierten Wildtyp- und TUP1-Deletionsstämmen wurde auf einem 1 %igen denaturierenden Agarosegel aufgetrennt. Die Analyse der Nylonmembran, auf die die RNA anschließend transferiert wurde, erfolgte zeitgleich mit radioaktiv markierten *ACT1*- und *URA3*-DNA-Sonden.

Die Northern-Blot-Analyse wurde mittels PhosphoImager und den Programmen ImageQuant und Excel quantitativ ausgewertet. Diese Auswertung ist graphisch in Abb. 3.10 dargestellt.

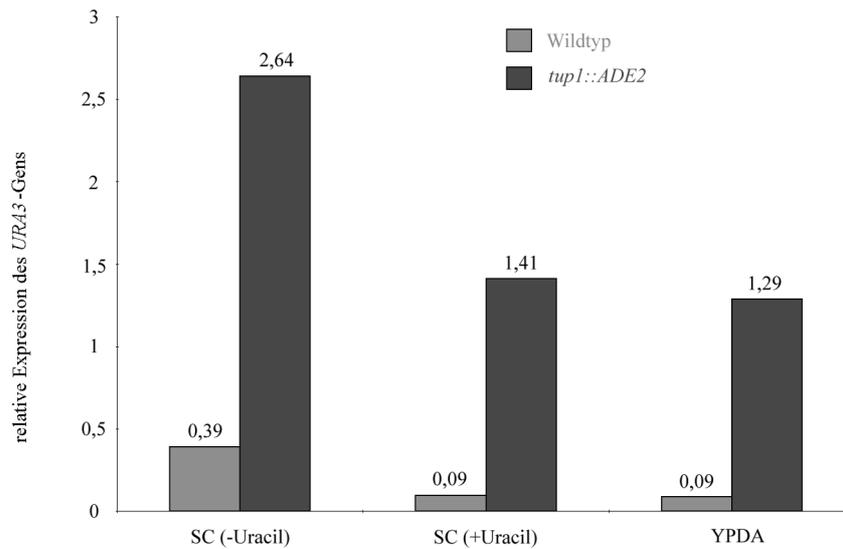


Abb. 3.10: Quantitative Auswertung der *URA3*-Expression in Wildtyp- und *TUP1*-Deletionsstämmen.

Die Auswertung der in Abbildung 8 gezeigten Northern-Blot-Analyse erfolgte mittels PhosphoImager, ImageQuant und Excel. Die Werte sind auf die *ACT1*-Signale normiert. Das mit Excel erstellte Diagramm wurde hinsichtlich der Beschriftung mit Adobe Photoshop 4.0 nachbearbeitet.

Ein Vergleich zeigt, daß die Expression des *URA3*-Gens unter nicht induzierten Bedingungen, d.h. in Vollmedium (YPDA) und in synthetischem Medium (SC+Uracil), in einem *TUP1*-Deletionsstamm um den Faktor 13 bis 14 höher ausfällt als im Wildtypstamm. Unter induzierenden Bedingungen ist die Expression der Mutante um etwa das 7fache erhöht. Ferner zeigte sich, daß im Wildtypstamm, wie von Roy et al. (Roy et al., 1990) beschrieben, durch Uracil eine Induktion um etwa den Faktor 4 erfolgt.

Eine mit der konstitutiven Aktivierung durch die *PPR1*-Mutante *ppr1-1* einhergehende erhöhte Expression von *URA3* führt bei gleichzeitiger Abwesenheit von Uracil zu einer Resistenz gegenüber 6-Azauracil (Exinger und Lacroute, 1992; Loison et al., 1980). Die in Abb. 3.9 und 3.10 gezeigte Erhöhung der Expression durch die Deletion von *TUP1* sollte zu einem vergleichbaren Effekt führen. Um dies zu testen wurden die Stämme in verschiedenen Verdünnungen auf 6-Azauracil-

haltige Uracilmangelmediumsplatten getropft. Das Ergebnis bestätigt die Annahme und ist in Abb. 3.11 dargestellt.

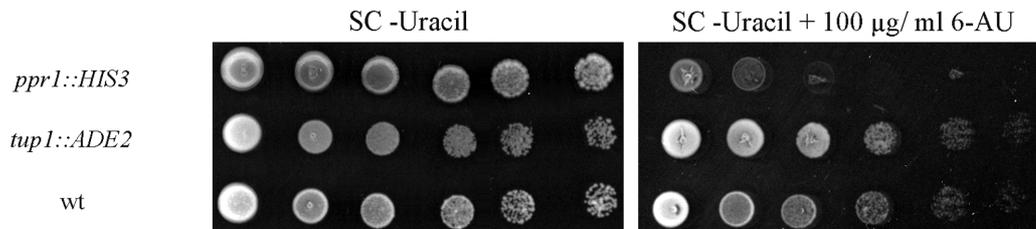


Abb. 3.11: Höhere Resistenz der TUP1-Deletionsmutante gegenüber dem Wildtypstamm.

Die Teilabbildungen zeigen jeweils eine Uracilmangelmediumsplatte ohne oder mit 100 µg/ml 6-Azauracil. Alle Stämme hatten einen rekonstruierten *URA3*-Locus. Die relevanten Genotypunterschiede der in 1:10 Verdünnungen aufgebrauchten Stämme sind links angegeben.

TUP1 scheint in der Tat an der negativen Regulation der *URA3*-Expression beteiligt zu sein. Allerdings lassen die bisherigen Experimente keine Aussage darüber zu, ob die beobachteten Effekte direkter oder indirekter Natur sind.

3.1.2 Der Einfluß von TUP1 auf die Expression von *URA3* ist direkt

Um zu zeigen, daß TUP1 in der Expressionskontrolle von *URA3* direkt involviert ist und um eine Korrelation zur Interaktion zwischen TUP1 und PPR1 herzustellen, wurden PPR1 und die interaktionsdefiziente Mutante PPR1₁₋₁₂₃₊₂₀₉₋₉₄₆ als N_{ub}-Fusionproteine in Wildtypstämmen und PPR1-Deletionsmutanten exprimiert.

Das Ergebnis der Southern-Blot-Analyse in Abb. 3.11 (A) beweist die erfolgreiche Deletion des proteinkodierenden Bereiches des *PPR1*-Gens durch N. Lehming, wobei die letzten, den C-Terminus kodierenden, 66 Aminosäure (=196 nt) im chromosomalen Locus verblieben. Teil B der Abb. 3.11 zeigt die erfolgreiche Rekonstruktion des *URA3*-Gens in diesem Stamm, der ursprünglich einen *ura3-52*

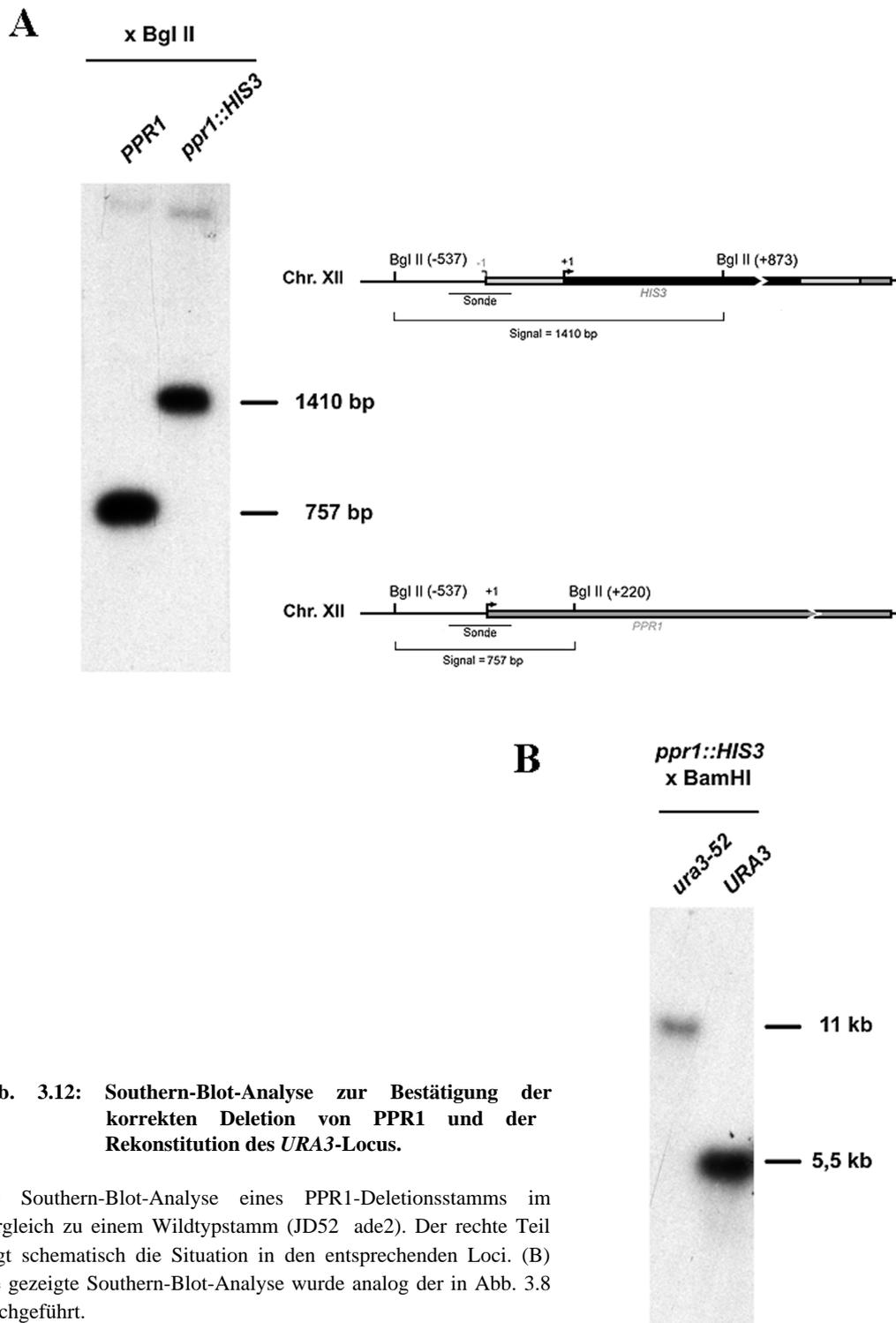


Abb. 3.12: Southern-Blot-Analyse zur Bestätigung der korrekten Deletion von *PPR1* und der Rekonstitution des *URA3*-Locus.

(A) Southern-Blot-Analyse eines *PPR1*-Deletionsstamms im Vergleich zu einem Wildtypstamm (JD52 *ade2*). Der rechte Teil zeigt schematisch die Situation in den entsprechenden Loci. (B) Die gezeigte Southern-Blot-Analyse wurde analog der in Abb. 3.8 durchgeführt.

Genotyp besaß. Die PPR1-Deletionsmutante zeigte wie in Abbildung 3.11 zu sehen nur eine Basalexpression des *URA3*-Gens und ist sensitiver gegenüber 6-Azauracil als der Wildtyp.

Die Expression von N_{ub} in diesem Stamm verändert die Sensitivität gegenüber dem Inhibitor 6-Azauracil nicht (Abb. 3.13, vgl. 3. und 4. Verdünnungsreihe). Die Expression von N_{ub} -PPR1 und N_{ub} -PPR1₁₋₁₂₃₊₂₀₉₋₉₄₆ komplementiert hingegen diesen Effekt (5. und 6. Verdünnungsreihe im Vergleich zur 1.). Die Fusionsproteine sind

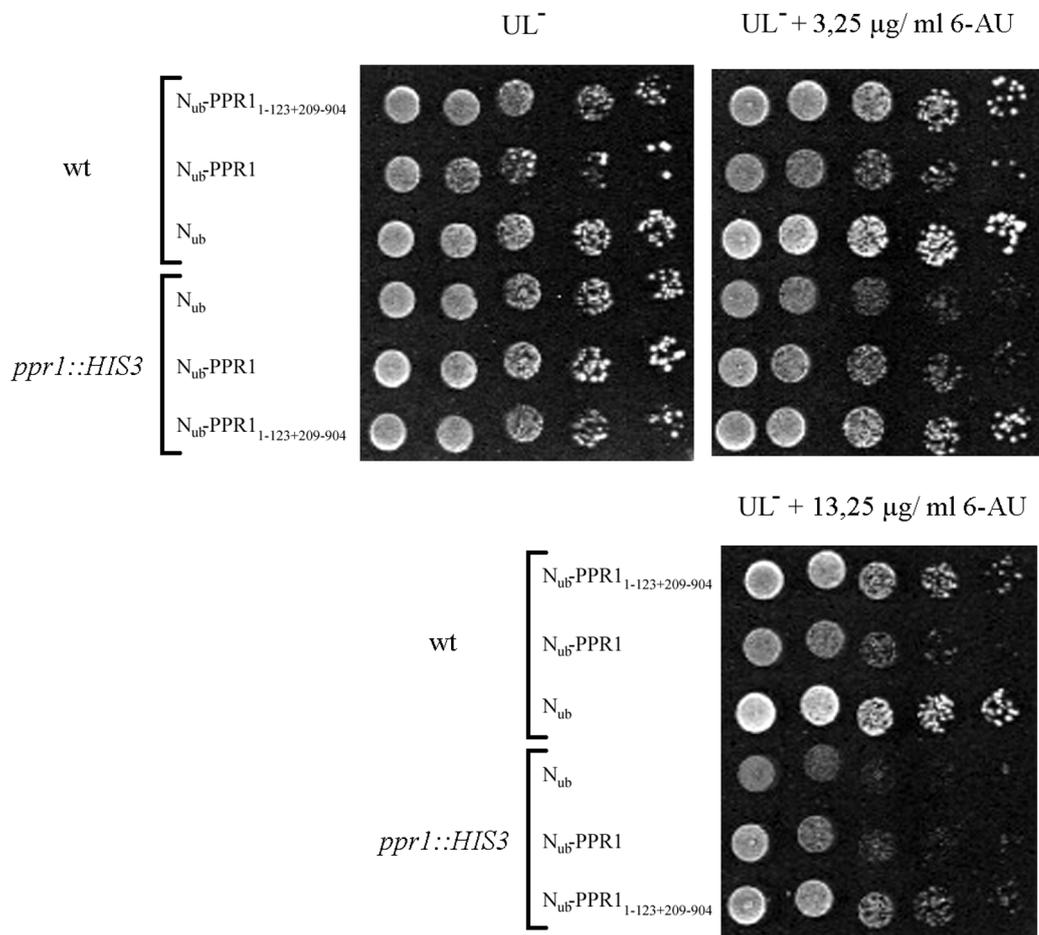


Abb. 3.13: Komplementation einer PPR1-Deletion mit PPR1 und PPR1₁₋₁₂₃₊₂₀₉₋₉₀₄

Die Abbildung zeigt die Komplementation mit den angegebenen N_{ub} -Fusionen, die von einem ARS-CEN-Plasmid (pACNX) exprimiert wurden. Die oberen drei Verdünnungsreihen zeigen das Wachstumsverhalten im *PPR1* Genotyp, die drei darunterliegenden das im *ppr1* Genotyp. Die Teilabbildungen zeigen die Transformationskontrolle (links oben), sowie das Wachstumsverhalten bei Anwesenheit von 3,25 µg (rechts oben) und 13,25 µg (unten) 6-Azauracil pro Milliliter Medium.

also in der Lage, die PPR1-Deletion zu komplementieren. Darüber hinaus scheint der N-terminale Teil des Ubiquitins keinen oder nur einen geringen Einfluß auf die Bindung der Proteine an die UAS_{URA3} zu haben. Ferner zeigte sich, daß die Komplementation durch N_{ub} -PPR1₁₋₁₂₃₊₂₀₉₋₉₄₆ eine höhere Resistenz gegenüber 6-Azauracil aufwies (vgl. 5. und 6. Verdünnungsreihe in Abb. 3.13), was auf die fehlende Interaktion mit TUP1 zurückzuführen sein könnte. Die gleichen, wenn auch geringeren, Effekte sind auch in dem Fall zu beobachten, in dem N_{ub} -PPR1 und N_{ub} -PPR1₁₋₁₂₃₊₂₀₉₋₉₄₆ in einem Wildtypstamm exprimiert werden.

Eine Sensitivität gegenüber 6-Azauracil kann jedoch auch von einer Inhibierung der Inosin-5'-monophosphat-Dehydrogenase und einer damit einhergehenden Senkung des zellulären GTP-Spiegels herrühren (Exinger und Lacroute, 1992). Um den in Abb. 3.13 gezeigten Effekt der Regulation des *URA3*-Gens zuzuordnen, ist ein Vergleich der Expression dieses Gens in den verschiedenen Stämmen notwendig. Hierzu wurde eine Northern-Blot-Analyse der Gesamt-RNA aus den entsprechenden

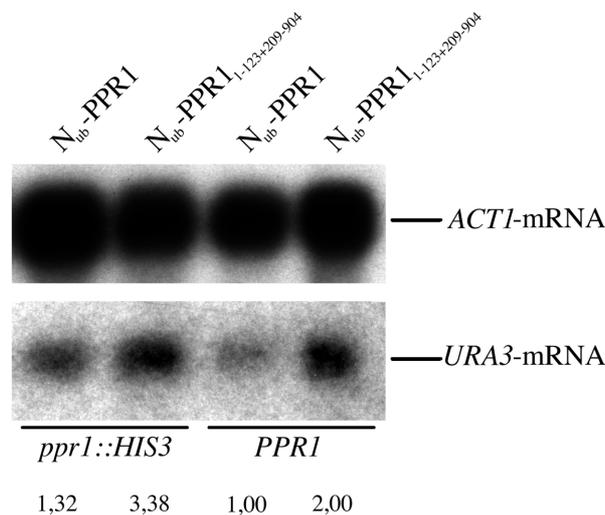


Abb. 3.14: Expression des *URA3*-Gens unter komplementativen Bedingungen.

Gesamt-RNA aus PPR1-Wildtyp und -Deletionsstämmen, die mit den angegebenen Plasmiden transformiert und in Uracil-/ Leucinmangelmedium kultiviert worden sind, wurde durch Northern-Blot-Analyse auf ihren Gehalt an *URA3*-mRNA untersucht. Die für die N_{ub} -Fusionen kodierenden Plasmide trugen ein ARS-CEN-“ori” und waren somit “single-copy”-Plasmide. Zur Quantifizierung und Normierung der RNA-Mengen dienten die Analysensignale, die mit einer *ACT1*-Sonde erhalten wurden (oberer Teil der Abbildung). Die Auswertung der relativen *URA3*-mRNA-Mengen erfolgte durch einen PhosphoImager und den Programmen ImageQuant und Excel. Das Ergebnis ist unter den jeweiligen Signalen angegeben.

Stämmen durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 3.14 gezeigt. Die Expression des *URA3*-Gens ist in dem Stämmen, welche N_{ub} -PPR1₁₋₁₂₃₊₂₀₉₋₉₄₆ exprimiert, in der Tat höher als in denen, die N_{ub} -PPR1 exprimierten.

Der *URA3*-Promotor wird damit in Abhängigkeit der Aminosäuren 124 bis 208 durch PPR1 reguliert. Fehlen diese, ist PPR1 in der Lage stärker zu aktivieren. Da in dieser Domäne auch die Interaktion mit TUP1 stattfindet, kann darauf geschlossen werden, daß TUP1 direkt an der Regulation von *URA3* beteiligt ist.

3.4 Weitere an der *URA3*-Gen-Regulation beteiligte Proteine

Um weitere Details über die Regulation des *URA3*-Gens zu gewinnen, wurde in verschiedenen Mutanten der *URA3*-Locus rekonstruiert. In diesen Mutanten waren folgende Proteine deletiert:

- TFG3, die kleinste Untereinheit von TFIIF, die auch als Komponente des SWI/ SNF-Komplexes beschrieben wurde und zugleich ein TAF ist,
- SRB11, von dem bekannt ist, daß es im Fall der durch TUP1 vermittelten Repression Zelltyp-spezifischer Gene als Bestandteil des SRB10/ 11-Komplex für die volle Repression notwendig ist (Wahi und Johnson, 1995),
- SRB8, als weiterer Vertreter des Polymerase II-Holoenzymkomplexes, von dem angenommen wird, daß er überwiegend an der negativen Regulation beteiligt ist, und
- NHP6A und NHP6B, welchen in Hinblick auf ihre Funktion in der Transkriptionsregulation sowohl eine aktivierende, als auch eine reprimierende Funktion zugeordnet wird und denen ebenfalls überlappende Funktionen mit dem SWI/ SNF-Komplex zugesprochen werden (Yu et al., 2000).

von SRB8 und TFG3. Hingegen zeigte eine Doppeldeletion der beiden nahezu identischen HMG-Box-Proteinen NHP6A und NHP6B eine hohe Sensitivität gegenüber 6-Azauracil, die sich bereits bei einer Konzentration von 10µg 6-Azauracil pro Milliliter Medium zeigt (vgl. Abb. 3.15 B). Im Vergleich zu der TFG3-Deletionsmutante ist dieser Stamm mehr als eine Zehnerpotenz sensitiver. Die Sensitivität ist sogar stärker als die durch eine PPR1-Deletion bedingte. Das heißt, in diesem Fall liegt die Expression unter der Basalrate, die durch die PPR1-Deletionsmutante gegeben ist.

4. Diskussion

TUP1 ist bekannt als globaler Repressor, d.h. er ist in universaler Weise an der Repression von Genen mit ganz verschiedenen Funktionen beteiligt (Smith und Johnson, 2000). Er liegt mit SSN6 als $(SSN6)_1-(TUP1)_4$ -Komplex vor (Redd et al., 1997; Varanasi et al., 1996). Dabei wird TUP1 das repressorische Potential zugeschrieben, während SSN6 als Adapterprotein für die Bindung an die verschiedenen DNA-bindenden Proteine zuständig ist (Tzamarias und Struhl, 1994).

Die Fähigkeit von TUP1 als ein derart vielfältig agierender Repressor zu wirken, basiert im wesentlichen auf zwei Eigenschaften:

Zum einen bindet TUP1 nicht direkt an den Promotor, sondern wird durch unterschiedliche Transkriptionfaktoren rekrutiert. Diese binden spezifisch die von ihnen regulierten Promotoren; dabei sind alle Klassen von DNA-bindenden Motiven vertreten. So sind es im Fall von ROX1 die HMG-Boxen (Balasubramanian et al., 1993; Deckert et al., 1995; Di Flumeri et al., 1996). Bei λ 2 erfolgt die Bindung über die Homeobox und TUP1 entfaltet seine repressorische Wirkung in Komplexen mit MCM1 bzw. α 1 (Keleher et al., 1992; Mukai et al., 1991). Auch DNA-bindende Zinkfingerproteine wie MIG1 und NRG2 rekrutieren TUP1 (Park et al., 1999; Treitel und Carlson, 1995) an die von ihnen regulierten Gene.

Zum anderen lassen experimentelle Daten darauf schließen, daß TUP1 durch unterschiedliche Mechanismen seine repressive Wirkung entfaltet. So sind direkte Interaktionen mit der Holoenzymkomponente HRS1 gezeigt worden, und auch die Komplementation von SRB8-Mutationen durch die Überexpression von TUP1 gibt indirekt Hinweise auf eine Wechselwirkung mit dem Holoenzym (Papamichos-Chronakis et al., 2000; Wahi et al., 1998). Dies wird gestützt durch Erkenntnisse, daß der SRB10/ 11-Komplex, der in einigen Holoenzympräparationen gefunden wurde, für die volle Repression von *MFA2* durch λ 2 (Wahi et al., 1998) und in einem artifiziellen Promotorkontext (Kuchin und Carlson, 1998) notwendig ist. Des

weiteren hat TUP1 einen Einfluß auf die Chromosomenstruktur bzw. die Nukleosomenpositionierung (Cooper et al., 1994; Shimizu et al., 1991), was möglicherweise durch die Acetylierung der Histone vermittelt wird (Edmondson et al., 1996).

4.1 Die Interaktion von TUP1 mit PPR1

Eine auf dem "Split-Ubiquitin-System" basierende Suche durch N. Lehming nach weiteren Proteinen, die mit dem Repressor TUP1 interagieren, lieferte einen Hinweis darauf, daß ein möglicher Interaktionspartner der Aktivator PPR1 ist (vgl. auch Abb. 3.2). Dies ist in zweierlei Hinsicht interessant: Erstens, weil den bisher charakterisierten Interaktionspartnern von TUP1 nur repressorische, jedoch keine aktivierenden Eigenschaften zugesprochen wurden, und eine Interaktion mit einem Aktivator damit das Spektrum der Möglichkeiten der durch TUP1 vermittelten Repression erweitert. Zweitens, da eine solche Interaktion das sehr schwache aktivierende Potential von PPR1 erklären würde.

Die Interaktion von PPR1 und TUP1 stützt sich auf unterschiedliche Experimente. Sie konnte *in vivo* durch "Split-Ubiquitin-System"-Analysen unabhängig mit zwei unterschiedlichen Reporterkonstrukten nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.2 und Abb. 3.3). Allerdings war GFP als Reporterprotein noch nicht vollständig etabliert, so daß mit 20% fluoreszierender Zellen ein niedriger Ausgangswert vorlag und die Sensibilität gering war. Durch Experimente von N. Lehming ergab sich, daß sich die Anzahl der Zellen die das Reporterprotein exprimieren auf nahezu 100% steigern läßt, wenn die Zellen einer Flüssigkultur nur kurz (6 Std.) mit CuSO₄ induziert wurden, statt die Zellen auf CuSO₄-haltigen Mediumsplatten zu kultivieren. Für zukünftige Experimente bietet ein GFP-Reporter ferner den Vorteil zeitabhängige Prozesse untersuchen zu können. So wird MIG1 durch das Vorhandensein von Glukose dephosphoryliert und in den Nukleus importiert (De Vit et al., 1997). An die Promotoren der Gal-Gene gebunden, rekrutiert es TUP1/SSN6-

Repressorkomplex. Auf Grund der Lokalisation des TUP1-C_{ub}-Rgfp Reporterproteins im Nukleus könnte man z.B. die Dynamik dieses, als Glukoserepression bezeichneten Prozesses, mit dem "Split-Ubiquitin-System" untersuchen.

Die GST-Präzipitations-Analyse zeigte eine direkte, nicht durch SSN6 vermittelte Interaktion der beiden Proteine *in vitro*, wobei etwa 30 % des eingesetzten TUP1 von PPR1 gebunden wurde (vgl. Abb. 3.7). Da die Art der Bindung nicht bekannt ist und diese möglicherweise ionischer Natur ist, kann die Ionenstärke des verwendeten Puffers einen Einfluß auf die Stärke der Bindung haben. Des weiteren ist bei der Interpretation dieses Ergebnisses zu berücksichtigen, daß die Proteine aus einem heterologen System stammten. Die Bindung ist jedoch nicht unspezifisch, sondern läßt sich lokalisieren, wie die Resultate der Interaktionsanalysen des Derivates mit der internen Deletion (PPR1₁₋₁₂₃₊₂₀₉₋₉₀₄) sowohl *in vivo* als auch *in vitro* bestätigen.

Diese Version des Proteins enthielt die 87 carboxyterminalen Aminosäuren von den ursprünglich 112 Aminosäuren der interagierenden Domäne. Damit ist die Interaktionsdomäne auf die Aminosäuren 124 bis 208 eingeeengt worden. Die Aminosäuren von 100 bis 112, die bei Betrachtung der Struktur von PPR1 mit der Zinkfingerdomäne, dem "Linker" und der Dimerisierungsdomäne interagieren, sind in der Deletionsmutante vorhanden. Ferner ist die Deletion weiter carboxyterminal zu der von Reece und Ptashne (Reece und Ptashne, 1993) beschriebenen Dimerisierungsdomäne gelegen (vgl. Abb. 3.3). Damit ist die Wahrscheinlichkeit verringert worden, daß durch die Deletion Bereiche des Proteins verändert sind, die DNA-Bindung, deren Spezifität und/ oder die Dimerisierung betreffen.

Ferner ist herauszustellen, daß die Deletion nicht in einem Bereich erfolgte, für den eine intramolekulare Interaktion mit der Aktivierungsdomäne im Zusammenhang mit der Aktivierung durch Orot- bzw. Dihydroorotsäure postuliert wurde (Flynn und Reece, 1999). Ob die Deletionsmutante in der Lage ist, abhängig von der Präsenz dieser Induktoren die Transkription zu aktivieren, bleibt an dieser Stelle ungeklärt. Es ist möglich, daß die Struktur von PPR1 derart verändert ist, daß die Aktivierungsdomäne keine intramolekulare Interaktion mehr eingehen kann und konstitutiv aktiviert. Bedingt durch die Größe und der damit einhergehenden Distanz

zur Deletionsstelle (696 Aminosäuren) erscheint eine derartige Änderung der Struktur jedoch unwahrscheinlich.

Auf Grund der *in vivo* und *in vitro* Experimente ist eine Interaktion zwischen TUP1 und PPR1 sehr wahrscheinlich. Ob diese Interaktion, wie die zu 2 (Komachi et al., 1994), durch die WD40-Motive des TUP1 vermittelt wird ist unklar. Die Präsenz eines Signals in dem *in vitro* Interaktionsexperiment (vgl. Abb. 3.7 und Daten zur Aufreinigung von S. Heck - nicht gezeigt) läßt den Schluß zu, daß der interagierende Bereich N-terminal liegt, d.h. die Aminosäure 1 bis etwa 300 umfaßt. Damit befinden sich vermutlich keine der WD40-„Repeats“ in diesem rudimentären TUP1. Die Interaktion scheint nicht sehr stark zu sein, da N_{ub}-PPR1 von einem „high copy“-Plasmid exprimiert werden mußte, um eine Interaktion im „Split-Ubiquitin-System“ zu beobachten (vgl. Abb. 3.2).

Die geringeren Unterschiede der *URA3*-Genexpression in der Komplementationsanalyse im Vergleich zu der Northern-Blot-Analyse scheinen dies zu bestätigen (vgl. Abb. 3.9/ 3.10 mit Abb. 3.14). Allerdings sind diesbezüglich folgende Punkte zu berücksichtigen:

So ist nicht auszuschließen, daß TUP1 noch teilweise an PPR1 bindet. Dies läßt sich von einer leichten Differenz im Wachstum des Stammes, der das N_{ub}-Deletionskonstrukt exprimiert im Vergleich zu der N_{ub}-Kontrolle im „Split-Ubiquitin-System“ schließen. Dies kann jedoch auch an den unterschiedlichen Größen der Plasmide und der von ihnen kodierten Proteinen liegen kann. Ferner war in der Komplementationsanalyse endogenes TUP1 zugegen, so daß nicht ausgeschlossen werden kann, daß dieses an andere Transkriptionsfaktoren gebunden sein repressives Potential entfaltet. In diesem Zusammenhang muß in zukünftigen Betrachtungen auch PHO2/ BAS2 mit einbezogen werden. Von diesem ist durch eine Proteomanalyse bekannt, daß es in der Transkription von *URA3* und *URA1* beteiligt ist, wenn auch in Abhängigkeit von Adenin (Denis et al., 1998). Letzterem muß ein Einfluß auf die hier gezeigten Ergebnis insofern zugestanden werden, als daß das *ADE2*-Gen im Gegensatz zum Wildtypstamm in den PPR1-Deletionsmutanten nicht funktionell

war. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, daß eine Analyse des *URA3*-Promotors mit dem auf der TRANSFAC-Datenbank basierendem Analyseprogramm MatInspector (Quandt et al., 1995) eine putative Homeoboxprotein-Bindungsstelle zwischen Position -73 und -64 aufführte. Jedoch könnte auch eine gewisse Redundanz des PPR1-Proteins eine weitere Ursache für den geringen Unterschied der *URA3*-Expression bei der Komplementation mit PPR1 und PPR1₁₋₁₂₃₊₂₀₈₋₉₀₄ (Abb. 3.9 und 3.10 versus 3.14) sein. Einen Hinweis gab die MatInspector-Analyse, die eine weitere mögliche Zinkfingerprotein-Bindungsstelle zwischen Position -119 und -114 im *URA3*-Promotor ergab. Bei einem Vergleich der unterschiedlichen Experimente ist auch zu berücksichtigen, daß die Expressionen in dieser Arbeit nicht unter statistischen Gesichtspunkten betrachtet wurden. Um gesicherte Erkenntnisse zu erlangen sind Versuchsreihen durchzuführen, deren Ergebnisse statistisch gemittelt werden müssen.

Unter Berücksichtigung der gezeigten Daten ist von einer Interaktion von TUP1 und PPR1 auszugehen. Die für diese Interaktion entscheidene Domäne von PPR1 befindet sich zwischen den Aminosäuren 124 und 208.

4.2 Physiologische Relevanz

Ausgehend von der Interaktion zwischen TUP1 und PPR1 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß neben den bereits bekannten Genen auch das für die Orotidin-5'-monophosphat-Decarboxylase (*URA3*), durch TUP1 reguliert bzw. mitreguliert wird (vgl. Abb. 3.9, 3.10 und 3.11). Bisherige Untersuchungen mögen nicht in Betracht gezogen haben, daß TUP1 dieses Gen reguliert, da in einer DNA-Microarray-Analyse die Deletion von TUP1 die Expression von *URA3* nur um das 1,71fache erhöhte (DeRisi et al., 1997). Derartige Effekte werden im Rahmen solcher Analysen meist nicht beachtet, da die Grenze für relevante Unterschiede bei einer mindestens zweifachen Änderung der Expression gezogen wird. Zu bedenken ist aber, daß in diesen Untersuchungen *ura3-52* Stämme verwandt wurden. Diese tragen im offenen

Leseraster des Gens ein Ty-Element, von dem nicht bekannt ist welchen Einfluß es auf die Regulation der Expression bzw. auf das Signal in der DNA-Microarray-Analyse hat.

Auf Grund der Ergebnisse der Komplementation einer PPR1-Deletion durch ein mit TUP1 interagierendes Derivat bzw. durch ein nicht mit TUP1 interagierendes Derivat von PPR1 (vgl. Abb. 3.13) kann auf einen direkten Einfluß von TUP1 auf den natürlichen, von PPR1 regulierten, *URA3*-Promotor geschlossen werden.

Damit stellt sich die Frage unter welchen physiologischen Bedingungen die *URA3*-Expression Werte erreicht, wie sie im Fall der TUP1-Deletion bzw. der Deletion der Aminosäure 124 bis 208 von PPR1 zu beobachten sind. Möglich wäre zum Beispiel eine Regulation in Abhängigkeit vom Zellzyklus. Obwohl nach DNA-Array-Analysen *TUP1* in der G₂-Phase verstärkt exprimiert zu werden scheint, zeigen diese Analysen für die *URA3*-Expression keine signifikante Regulation (Cho et al., 1998). Allerdings ist nicht publiziert worden, welchen Genotyp die verwendeten Stämme hatte. Sollte es sich bei diesem ebenfalls um einen *ura3-52*-Genotyp handeln, ist die Zellzyklusabhängigkeit näher zu untersuchen.

Auf Grund der hohen Leistungsfähigkeit der Orotidin-5'-monophosphat-Decarboxylase ist auch eine Erklärung aus evolutionärer Sicht möglich. Es könnte sein, daß archaische, nicht so leistungsfähige Formen der ODCase durch einen starken Aktivator in wesentlich höheren Mengen exprimiert werden mußten, um den UMP-Bedarf der Zelle sicherzustellen. Dafür würde sprechen, daß die ODCase in den meisten Prokaryonten als Dimer vorkommt (Appleby et al., 2000). Mit dem Erreichen der hohen Leistungsfähigkeit des Enzyms erscheint es in Hinblick auf die Ökonomie der Zelle sinnvoll die Expression zu senken, was in diesem Fall durch die Insertion einer TUP1-bindenden Domäne geschehen ist.

4.3 Vermittlung der TUP1-Repression

Abgesehen von DNA-Microarray-Analysen werden die Auswirkungen von Mutationen auf die *URA3*-Expression selten in Arbeiten betrachtet, da dieses Gen gängigerweise zum Selektieren von Transformanten verwendet wird. So wurde zwar von Woodage et al. eine 6-Azauracilresistenz in CHD1-Deletionsmutanten beschrieben, aber auch der in diesen Untersuchungen verwendete Stamm hatte einen *ura3-52* Genotyp (Woodage et al., 1997).

Um zu klären, ob in Bezug auf den Promotor des *URA3*-Gens ein durch CHD1 vermittelter Repressionsmechanismus von TUP1 vorliegen könnte, wurde von N. Lehming eine *URA3*-Promotor-*lacZ*-Fusion in den *URA3*-Locus von einem Wildtyp- und einem CHD1-Deletionsstamm integriert. Die Ergebnisse zeigten eine Derepression des *URA3*-Reporters in dem Deletionsstamm (persönl. Mitteilung von N. Lehming).

Angesichts einer ebenfalls gefundenen Interaktion von CHD1 und TUP1 im "Split-Ubiquitin-System" (persönl. Mitteilung von N. Lehming) scheint es, daß TUP1 seine repressiven Eigenschaften durch das chromatinmodulierende CHD1 vermittelt, weshalb die Deletion von CHD1 zu einer Erhöhung der *URA3*-Expression führt.

Damit ergibt sich ein Modell der Situation wie in Abbildung 4.1 dargestellt. Wobei auf Grund der Eigenschaften von CHD1, welches eine Chromo-("chromatin organization modifier")-domäne, eine ATPase/ Helicaseaktivität (verwandt mit der von SWI2) und eine DNA-Bindungsdomäne enthält, davon ausgegangen werden kann, daß die Repression durch Änderung der chromosomalen Struktur bedingt ist (Tran et al., 2000; Woodage et al., 1997).

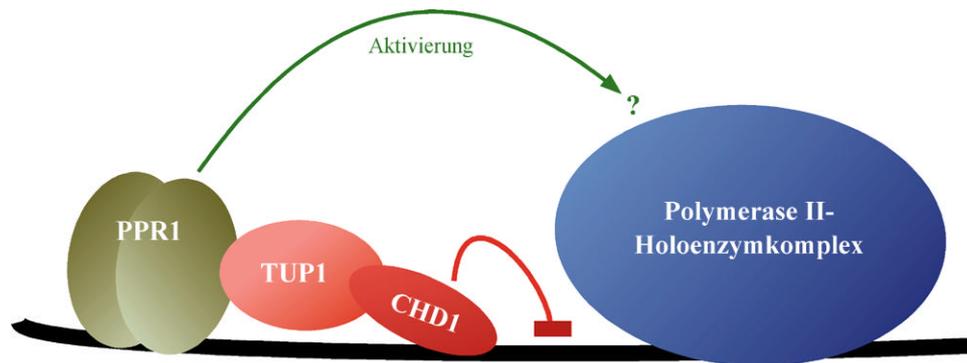


Abb. 4.1: Modell der transkriptionellen Regulation des URA3-Promotors.

4.4 Weitere Regulatoren der *URA3*-Expression

Neben CHD1 sind andere Proteine und Proteinkomplexe bekannt, die über die Änderung der Chromatinstruktur die Genexpression regulieren. So wird CHD1 eine teilweise überlappende Funktion mit dem SWI/ SNF-Komplex zugeschrieben (Tran et al., 2000). Von letzterem ist bekannt, daß er die Nukleosomenstruktur in einer ATP-abhängigen Weise moduliert und somit sowohl die Aktivierung, als auch die Repression vermitteln kann (Bazett-Jones et al., 1999; Sudarsanam et al., 2000). Allerdings zeigte eine Deletion von TFG3, der kleinen Untereinheit des Transkriptionsfaktors TFIIF, der auch eine Komponente des SWI/ SNF-Komplexes ist, keine erhöhte 6-Azauracil-Resistenz, sondern eine Sensitivität, wie sie auch für die Deletion von SRB11 zu beobachten ist (vgl. Abb. 3.15).

SRB11 ist ein Cyclin (Liao et al., 1995), jedoch zeigt wie bereits erwähnt eine DNA-Array-Analyse keine Regulation von *URA3* während des Zellzyklusses (Cho et al., 1998). Auf Grund der Sensitivität von SRB11-Deletionsmutanten gegenüber 6-Azauracil (vgl. Abb. 3.15) kann allerdings geschlossen werden, daß TUP1 im Fall des *URA3*-Gen seine Repressoreigenschaften wahrscheinlich nicht wie im Fall des β über den SRB10/ 11-Subkomplex des Holoenzymkomplexes entfaltet. Vielmehr weist die in

Abbildung 3.15 zeigte Steigerung der 6-Azauracil-Sensitivität für diese Holoenzymkomponente auf einen Beitrag an der transkriptionellen Aktivierung hin.

In Hinblick auf die überlappenden Funktionen von CHD1 mit dem SWI/ SNF-Komplex sind weiterhin Untersuchungen von Yu et al. interessant, die darauf schließen lassen, daß NHP6 ebenfalls ähnliche oder überlappende Funktionen mit dem SWI/ SNF-Komplex aufweist (Yu et al., 2000).

Wie in Abbildung 3.15 gezeigt, führt die Doppeldeletion der NHP6-Loci A und B zu einer extremen Sensitivität gegenüber 6-Azauracil. Dadurch ließ sich erklären, warum in einer Northern-Blot-Analyse der Gesamt-RNA dieser Stämme kein Signal der *URA3*-mRNA erhalten werden konnte (nicht gezeigt). Zudem entspricht dies dem Ergebnis einer DNA-Microarray-Analyse, wonach in der Doppelmutante die Expression des *URA3*-Gens um das 3,18fache sinkt (persönl. Mitteilung von K. Kerkmann) und Untersuchungen von Paull et al. (Paull et al., 1996), nach denen die Expression in diesen Stämmen um den Faktor 2 sinkt. Es ist aber zu bedenken, daß Vergleiche dieser experimentellen Daten nur qualitativer Natur sein können, da in den unterschiedlichen Experimenten unterschiedliche Bedingungen vorlagen. Der von K. Kerkmann verwendete Stamm hatte einen *ura3-52* Genotyp, bei dem wiederum das Problem auftritt, daß der Einfluß des Ty-Element unklar ist. Ferner verliefen die Experimente unter repressiven Bedingungen (Vollmedium; YPDA) und nicht unter induzierenden, wie die in dieser Arbeit zeigten. Damit besteht die Möglichkeit, daß die NHP6-Proteine an der Aktivierung der Transkription von *URA3* beteiligt sind und der im Array gezeigte Effekt lediglich die Basaltranskription widerspiegelt.

In dem von Paull et al. publizierten Untersuchungen enthielten die verwendeten Stämme eine unterschiedliche Anzahl von Kopien des *URA3*-Gens. Der von ihnen verwendete Wildtypstamm enthielt zwei *URA3*-Promotoren. Einer befand sich auf dem Plasmid pLG -312 (Guarente und Mason, 1983), auf das selektiert wurde, und ein zweiter im *ura3-52*-Locus. Stämme vom *ura3-52*-Genotyp besitzen zwar einen *URA*⁻-Phänotyp, jedoch einen Promotor und mindestens 120 Nukleotide der

kodierenden Region. Der von Paull et al. verwendete Primer für die Primerextensions-Analyse, die zur Bestimmung der *URA3*-Expression herangezogen wurde, hybridisierte in diesem kodierenden Bereich (+105 bis +121) und detektiert daher sowohl die Expression des funktionellen Gens auf dem Plasmid als auch die des nichtfunktionellen im Chromosom.

Die Situation in der verwendeten Deletionsmutante (*nhp6A/B*) ist durch die Präsenz von drei *URA3*-Promotoren gekennzeichnet. Neben den unter dem Wildtyp beschriebenen Kopien des *URA3*-Gens trägt dieser Stamm eine weitere im *NHP6A*-Locus. Diese scheint durch eine undefinierte Mutation nicht funktionell, d.h. der Stamm ist FOA-resistent und hat einen URA^- -Phänotyp. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß die zur FOA-Resistenz führende Mutation eine Punktmutation ist, die zum Abbruch der Translation führt, durch die aber die Transkription nicht beeinflußt wird. Eine Analyse in der Art und Weise, wie sie von Paull et al. durchgeführt wurde, würde auch die Expression dieser Kopie mit einbeziehen. Darüber hinaus ist anzumerken, daß das Plasmid pLG -312 vom "high copy"-Typ (2μ m) ist (Guarente und Ptashne, 1981).

Es kann daher durchaus sein, daß die NHP6-Proteine an der Expression von *URA3* stärker beteiligt sind, als dies die Untersuchungen von Paull et al. vermuten lassen.

Daß die NHP6-Proteine, entgegen der von H. Laser gefundenen reprimierenden Funktion auf die Expression des *GALI*-Gens (Laser, 2000), einen Part bei der Aktivierung des *URA3*-Promotors einzunehmen scheint, stellt keinen Widerspruch dar. Für verschiedene HMG-Proteine wurde gezeigt, daß sie einen Knick in der DNA-Struktur bewirken und bevorzugt irreguläre, nicht linear strukturierte DNA binden (Ferrari et al., 1992; Giese et al., 1992). Diese Struktur mag beim Promotor des *URA3*-Gens den Zugang für Transkriptionsfaktoren ermöglichen. Da bei der Suche nach TUP1-Interaktionspartnern mit dem "Split-Ubiquitin-System" auch NHP6B gefunden wurde, besteht eine weitere Möglichkeit darin, daß durch die Deletion der NHP6-Proteine TUP1 einen stärkeren Einfluß auf den Promotor hat und ein höheres repressorisches Potential ausüben kann, womit der *URA3*-Promotor stillgelegt wird.

4.5 Abschließende Betrachtung

Die Regulation des *URA3*-Gens basiert auf der Balance einer Repression durch TUP1 und CHD1 einerseits und einer Aktivierung durch PPR1 andererseits. Die Feinabstimmung dieser Repression ist gekennzeichnet durch die hohe Flexibilität der beteiligten Faktoren. Dabei dürfte auch eine gewisse Redundanz eine Rolle spielen. So sind teilweise überlappende Funktionen von TUP mit dem SWI/ SNF-Komplex (Smith und Johnson, 2000), von NHP6 mit dem SWI/ SNF-Komplex (Yu et al., 2000) und von dem SWI/ SNF-Komplex mit CHD (Tran et al., 2000) beschrieben worden.

Die hohe 6-Azauracil-Sensitivität und das Ergebnis einer DNA-Microarray-Analyse (K. Kerkmann) lassen den Schluß zu, daß NHP6A und/ oder B auch an der Basaltranskription von *URA3* involviert ist. Eine Aktivierung erfolgt durch Orot- oder Dihydroorotsäure, die veranlassen, daß PPR1 eine aktive Konfiguration einnimmt (Flynn und Reece, 1999). Mit welchen Komponenten der Transkriptionsmaschinerie die Aktivierungsdomäne von PPR1 interagiert bleibt noch aufzuklären. In diesem Zusammenhang sollte jedoch berücksichtigt werden, daß eine Interaktion zwischen der Aktivierungsdomäne von GAL4 und dem HMG1-Protein NHP6B gefunden wurde (Laser, 2000) und NHP6A/ B für die Expression von *URA3* erforderlich ist. Da auch Interaktionen zwischen Homeobox- und HMG1-Proteinen gezeigt worden sind (Zappavigna et al., 1996), sollte außerdem der Einfluß des Homeoboxproteins PHO2/ BAS2 mit einbezogen werden.

Ferner sollte auf Grund der 6-Azauracil-Phänotypen der TFG3- und SRB11-Deletionsmutanten auch eine Interaktion der Aktivierungsdomäne mit Holoenzymkomponenten in Betracht gezogen werden.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß der globale Repressor TUP1 *in vivo* und *in vitro* mit PPR1, dem Aktivator des *URA3*-Gens, interagiert. Es konnte ferner gezeigt werden, daß diese Interaktion physiologisch relevant ist. Damit konnte das Spektrum der Möglichkeiten der TUP1-vermittelten Repression erweitert werden.

Die DNA-bindenden Proteine, für die vor dieser Arbeit eine Interaktion mit TUP1 gezeigt werden konnte, sind alle Repressoren der Transkription. Bei PPR1 handelt es sich hingegen um einen transkriptionellen Aktivator. Alle mit TUP1 interagierenden Proteine zeigen eine stringente Regulation ihrer Präsenz an den jeweiligen Promotoren. Im Fall von ROX1 und 2 erfolgt dies durch rasche Proteolyse und im Fall von MIG1 durch den Export aus dem Kern. Auch bei PPR1 erfolgt wahrscheinlich eine Regulation der Präsenz am Promotor und zwar auf Grund der kurzen Halbwertszeit der PPR1-mRNA. Damit sind nun neben Repressoren auch Aktivatoren als Interaktionspartner von TUP1 in Betracht zu ziehen.

Neben den repressiven Einflüssen von TUP1 auf den *URA3*-Promotor konnte auch gezeigt werden, daß SRB11, TFG3 und NHP6A/B einen Beitrag zur transkriptionellen Aktivierung des *URA3*-Gens leisten.

6. Abstract

The global repressor TUP1 was shown to interact with PPR1, the activator of the *URA3* gene, *in vitro* as well as *in vivo*. Furthermore, the physiological relevance of this interaction could be demonstrated, thus extending the possibilities of TUP1-mediated repression.

Previously characterised DNA binding proteins, which interact with TUP1, were found to be exclusively repressors. However, in contrast to this, PPR1 is a transcriptional activator. Common to all TUP1 interacting proteins is the stringent regulation of their presence at the respective promoters. In the case of ROX1 and 2 this is due to a rapid proteolysis. In regard to MIG1, the presence of the protein is regulated by its export out of the nucleus. Because of the short half-life of the PPR1-mRNA, the presence of the protein at the *URA3* promoter may also be stringently regulated.

Activators should therefore be considered in addition to repressors in the context of possible interacting partners of TUP1.

Besides the repressive influences of TUP1 on the *URA3* promoter, it was also possible to demonstrate that SRB11, TFG3 and NHP6A/B participate in transcriptional activation of the gene.

7. Literaturverzeichnis

Alani, E., Cao, L., and Kleckner, N. (1987). A method for gene disruption that allows repeated use of URA3 selection in the construction of multiply disrupted yeast strains. *Genetics* 116, 541-5.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-402.

Appleby, T. C., Kinsland, C., Begley, T. P., and Ealick, S. E. (2000). The crystal structure and mechanism of orotidine 5'-monophosphate decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 2005-10.

Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1998). *Current protocols in molecular biology*, V. B. Chanda, ed.: John Wiley & Sons, Inc., New York, USA).

Avery, O. T., MacLeod, C. M., and McCarty, M. (1944). Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types. Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated From Pneumococcus Type III. *J. Exp. Med.* 79, 13-158.

Bach, M. L., Lacroute, F., and Botstein, D. (1979). Evidence for transcriptional regulation of orotidine-5'-phosphate decarboxylase in yeast by hybridization of mRNA to the yeast structural gene cloned in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 386-90.

Baker, R. T., Tobias, J. W., and Varshavsky, A. (1992). Ubiquitin-specific proteases of *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning of UBP2 and UBP3, and functional analysis of the UBP gene family. *J. Biol. Chem.* 267, 23364-75.

Balasubramanian, B., Lowry, C. V., and Zitomer, R. S. (1993). The Rox1 repressor of the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic genes is a specific DNA-binding protein with a high-mobility-group motif. *Mol. Cell. Biol.* 13, 6071-8.

Ball, L. J., Diakun, G. P., Gadhavi, P. L., Young, N. A., Armstrong, E. M., Garner, C. D., and Laue, E. D. (1995). Zinc co-ordination in the DNA-binding domain of the yeast transcriptional activator PPR1. *FEBS Lett.* 358, 278-82.

Bazett-Jones, D. P., Cote, J., Landel, C. C., Peterson, C. L., and Workman, J. L. (1999). The SWI/SNF complex creates loop domains in DNA and polynucleosome arrays and can disrupt DNA-histone contacts within these domains. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1470-8.

- Bell, J. B., and Jones, M. E. (1991). Purification and characterization of yeast orotidine 5'-monophosphate decarboxylase overexpressed from plasmid PGU2. *J. Biol. Chem.* 266, 12662-7.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., and Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acides Res.* 28, 235-42.
- Bertani, G. (1951). Studies of Lysogenesis. *J. Bacteriol.*, 293.
- Bi, X., and Broach, J. R. (1999). UASrpg can function as a heterochromatin boundary element in yeast. *Genes Dev.* 13, 1089-101.
- Bisson, L. F., and Thorner, J. (1981). Thymidylate synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and enzymic properties. *J. Biol. Chem.* 256, 12456-62 UBP1 of *Saccharomyces cerevisiae*.
- Blank, T. E., Woods, M. P., Lebo, C. M., Xin, P., and Hopper, J. E. (1997). Novel Gal3 proteins showing altered Gal80p binding cause constitutive transcription of Gal4p-activated genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2566-75.
- Boeke, J. D., LaCroute, 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, 345-6.
- Boeke, J. D., Trueheart, J., Natsoulis, G., and Fink, G. R. (1987). 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics, *Meth. Enzymol.*, Volume 154.
- Bowdish, K. S., Yuan, H. E., and Mitchell, A. P. (1995). Positive control of yeast meiotic genes by the negative regulator UME6. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2955-61.
- Boyer, L. A., Shao, X., Ebright, R. H., and Peterson, C. L. (2000). Roles of the histone H2A-H2B dimers and the (H3-H4)(2) tetramer in nucleosome remodeling by the SWI-SNF complex. *J. Biol. Chem.* 275, 11545-52.
- Breathnach, R., and Chambon, P. (1981). Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 349-83.
- Buratowski, S., Hahn, S., Guarente, L., and Sharp, P. A. (1989). Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell* 56, 549-61.
- 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, 82-5.
- Cheng, T. H., and Gartenberg, M. R. (2000). Yeast heterochromatin is a dynamic structure that requires silencers continuously. *Genes Dev.* 14, 452-63.

- Chiang, C. M., and Roeder, R. G. (1995). Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators. *Science* 267, 531-6.
- Cho, R. J., Campbell, M. J., Winzeler, E. A., Steinmetz, L., Conway, A., Wodicka, L., Wolfsberg, T. G., Gabrielian, A. E., Landsman, D., Lockhart, D. J., and Davis, R. W. (1998). A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Mol. Cell* 2, 65-73.
- Colicelli, J., Birchmeier, C., Michaeli, T., O'Neill, K., Riggs, M., and Wigler, M. (1989). Isolation and characterization of a mammalian gene encoding a high-affinity cAMP phosphodiesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 3599-603.
- 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, 1400-10.
- Corden, J., Wasylyk, B., Buchwalder, A., Sassone-Corsi, P., Kedinger, C., and Chambon, P. (1980). Promoter sequences of eukaryotic protein-coding genes. *Science* 209, 1406-14.
- Cote, J., Quinn, J., Workman, J. L., and Peterson, C. L. (1994). Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* 265, 53-60.
- Cui, W., DeWitt, J. G., Miller, S. M., and Wu, W. (1999). No metal cofactor in orotidine 5'-monophosphate decarboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259, 133-5.
- Daignan-Fornier, B., and Fink, G. R. (1992). Coregulation of purine and histidine biosynthesis by the transcriptional activators BAS1 and BAS2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 6746-50.
- Dayhoff, M. O. (1978). *Atlas of Protein Structure, Volume 5 Suppl. 3* (Washington D.C.: J. National Biomedical Research Foundation).
- De Vit, M. J., Waddle, J. A., and Johnston, M. (1997). Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol. Biol. Cell.* 8, 1603-18.
- Deckert, J., Rodriguez Torres, A. M., Simon, J. T., and Zitomer, R. S. (1995). Mutational analysis of Rox1, a DNA-bending repressor of hypoxic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 15, 6109-17.
- Denis, V., Boucherie, H., Monribot, C., and Daignan-Fornier, B. (1998). Role of the myb-like protein bas1p in *Saccharomyces cerevisiae*: a proteome analysis. *Mol. Microbiol.* 30, 557-66.

- DeRisi, J. L., Iyer, V. R., and Brown, P. O. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278, 680-6.
- Di Flumeri, C., Liston, P., Acheson, N. H., and Keng, T. (1996). The HMG domain of the ROX1 protein mediates repression of HEM13 through overlapping DNA binding and oligomerization functions. *Nucleic Acides Res.* 24, 808-15.
- Dohmen, R. J., Stappen, R., McGrath, J. P., Forrova, H., Kolarov, J., Goffeau, A., and Varshavsky, A. (1995). An essential yeast gene encoding a homolog of ubiquitin-activating enzyme. *J. Biol. Chem.* 270, 18099-109.
- Donze, D., Adams, C. R., Rine, J., and Kamakaka, R. T. (1999). The boundaries of the silenced HMR domain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 13, 698-708.
- Edmondson, D. G., Smith, M. M., and Roth, S. Y. (1996). Repression domain of the yeast global repressor Tup1 interacts directly with histones H3 and H4. *Genes Dev.* 10, 1247-59.
- Exinger, F., and Lacroute, F. (1992). 6-Azauracil inhibition of GTP biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 22, 9-11.
- Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1984). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal. Biochem.* 137, 266-7.
- Felsenfeld, G., Boyes, J., Chung, J., Clark, D., and Studitsky, V. (1996). Chromatin structure and gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 9384-8.
- Feng, W. Y., Austin, T. J., Chew, F., Gronert, S., and Wu, W. (2000). The mechanism of orotidine 5'-monophosphate decarboxylase: catalysis by destabilization of the substrate. *Biochemistry* 39, 1778-83.
- Ferrari, S., Harley, V. R., Pontiggia, A., Goodfellow, P. N., Lovell-Badge, R., and Bianchi, M. E. (1992). SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. *Embo J.* 11, 4497-506.
- Ferrell, K., Wilkinson, C. R., Dubiel, W., and Gordon, C. (2000). Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. *Trends Biochem. Sci.* 25, 83-8.
- Flanagan, P. M., Kelleher, R. J. d., Sayre, M. H., Tschochner, H., and Kornberg, R. D. (1991). A mediator required for activation of RNA polymerase II transcription in vitro. *Nature* 350, 436-8.
- Flynn, P. J., and Reece, R. J. (1999). Activation of transcription by metabolic intermediates of the pyrimidine biosynthetic pathway. *Mol. Cell. Biol.* 19, 882-8.

- Georgakopoulos, T., and Thireos, G. (1992). Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the GCN5 protein to promote normal levels of transcription. *Embo J.* *11*, 4145-52.
- Giese, K., Cox, J., and Grosschedl, R. (1992). The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell* *69*, 185-95.
- Gietz, D., and St. Jean, A., Woods, R. A., and Schiestl, R. H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* *20*, 1425.
- Grant, P. A., Duggan, L., Cote, J., Roberts, S. M., Brownell, J. E., Candau, R., Ohba, R., Owen-Hughes, T., Allis, C. D., Winston, F., Berger, S. L., and Workman, J. L. (1997). Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev.* *11*, 1640-50.
- 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*, 5895-900.
- Guarente, L., and Mason, T. (1983). Heme regulates transcription of the CYC1 gene of *S. cerevisiae* via an upstream activation site. *Cell* *32*, 1279-86.
- Guarente, L., and Ptashne, M. (1981). Fusion of *Escherichia coli* lacZ to the cytochrome c gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *78*, 2199-203.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* *166*, 557-80.
- Handschumacher, R. E. (1960). Orotidylic Acid Decarboxylase: Inhibition Studies with Azauridine 5'-Phosphate. *J. Biol. Chem.* *235*, 2917-9.
- Hellauer, K., Rochon, M. H., and Turcotte, B. (1996). A novel DNA binding motif for yeast zinc cluster proteins: the Leu3p and Pdr3p transcriptional activators recognize everted repeats. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 6096-102.
- 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.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* *67*, 425-79.

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, 717-28.

Jencks, W. P. (1975). Binding energy, specificity, and enzymic catalysis: the circe effect. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 43, 219-410.

Johnson, P. F., and McKnight, S. L. (1989). Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 799-839.

Johnsson, N., and Varshavsky, A. (1994). Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 10340-4.

Kadosh, D., and Struhl, K. (1997). Repression by Ume6 involves recruitment of a complex containing Sin3 corepressor and Rpd3 histone deacetylase to target promoters. *Cell* 89, 365-71.

Kadosh, D., and Struhl, K. (1998). Targeted recruitment of the Sin3-Rpd3 histone deacetylase complex generates a highly localized domain of repressed chromatin in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 18, 5121-7.

Kammerer, B., Guyonvarch, A., and Hubert, J. C. (1984). Yeast regulatory gene PPR1. I. Nucleotide sequence, restriction map and codon usage. *J. Mol. Biol.* 180, 239-50.

Keleher, C. A., Redd, M. J., Schultz, J., Carlson, M., and Johnson, A. D. (1992). Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. *Cell* 68, 709-19.

Kelleher, R. J. d., Flanagan, P. M., and Kornberg, R. D. (1990). A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus. *Cell* 61, 1209-15.

Kellum, R., and Schedl, P. (1991). A position-effect assay for boundaries of higher order chromosomal domains. *Cell* 64, 941-50.

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.

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, 6465-73.

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, 466-9.
- Komachi, K., Redd, M. J., and Johnson, A. D. (1994). The WD repeats of Tup1 interact with the homeo domain protein alpha 2. *Genes Dev.* 8, 2857-2867.
- Krug, R. M. (1993). The regulation of export of mRNA from nucleus to cytoplasm. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 5, 944-9.
- Kuchin, S., and Carlson, M. (1998). Functional relationships of Srb10-Srb11 kinase, carboxy-terminal domain kinase CTDK-I, and transcriptional corepressor Ssn6-Tup1. *Mol. Cell. Biol.* 18, 1163-71.
- Kunoh, T., Kaneko, Y., and Harashima, S. (2000). YHP1 encodes a new homeoprotein that binds to the IME1 promoter in *saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 16, 439-49.
- Lacroute, F. (1968). Regulation of pyrimidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 95, 824-32.
- Laser, H. (2000). Das HMG1-Protein NHP6B aus *S. cerevisiae* als neues regulatorisches Protein des GAL1-Promotors. Math.-Nat. Fakultät (Universität zu Köln).
- Lee, Y. C., and Kim, Y. J. (1998). Requirement for a functional interaction between mediator components Med6 and Srb4 in RNA polymerase II transcription. *Mol. Cell. Biol.* 18, 5364-70.
- Lee, Y. C., Park, J. M., Min, S., Han, S. J., and Kim, Y. J. (1999). An activator binding module of yeast RNA polymerase II holoenzyme. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2967-76.
- Levy, F., Johnsson, N., Rumenapf, T., and Varshavsky, A. (1996). Using ubiquitin to follow the metabolic fate of a protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 4907-12.
- Liang, S. D., Marmorstein, R., Harrison, S. C., and Ptashine, M. (1996). DNA sequence preferences of GAL4 and PPR1: how a subset of Zn²⁺ Cys⁶ binuclear cluster proteins recognizes DNA. *Mol. Cell. Biol.* 16, 3773-80.
- Liao, S. M., Zhang, J., Jeffery, D. A., Koleske, A. J., Thompson, C. M., Chao, D. M., Viljoen, M., van Vuuren, H. J., and Young, R. A. (1995). A kinase-cyclin pair in the RNA polymerase II holoenzyme. *Nature* 374, 193-6.
- Liljelund, P., Losson, R., Kammerer, B., and Lacroute, F. (1984). Yeast regulatory gene PPR1. II. Chromosomal localization, meiotic map, suppressibility, dominance/recessivity and dosage effect. *J. Mol. Biol.* 180, 251-65.

- Lin, Y. S., Ha, I., Maldonado, E., Reinberg, D., and Green, M. R. (1991). Binding of general transcription factor TFIIB to an acidic activating region. *Nature* 353, 569-71.
- Linz, B., Koloteva, N., Vasilescu, S., and McCarthy, J. E. (1997). Disruption of ribosomal scanning on the 5'-untranslated region, and not restriction of translational initiation per se, modulates the stability of nonaberrant mRNAs in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 272, 9131-40.
- Loison, G., Losson, R., and Lacroute, F. (1980). Constitutive Mutants for Orotidine 5 Phosphat Decarboxylase and Dihydroorotic Acid Dehydrogenase in *Sacharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 2, 39-44.
- Losson, R., Fuchs, R. P., and Lacroute, F. (1983). In vivo transcription of a eukaryotic regulatory gene. *Embo J.* 2, 2179-84.
- Losson, R., Fuchs, R. P., and Lacroute, F. (1985). Yeast promoters URA1 and URA3. Examples of positive control. *J. Mol. Biol.* 185, 65-81.
- Losson, R., and Lacroute, F. (1981). Cloning of a eukaryotic regulatory gene. *Mol. Gen. Genet.* 184, 394-9.
- Lue, N. F., Chasman, D. I., Buchman, A. R., and Kornberg, R. D. (1987). Interaction of GAL4 and GAL80 gene regulatory proteins in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 7, 3446-51.
- 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, 86-9.
- Marmorstein, R., Carey, M., Ptashne, M., and Harrison, S. C. (1992). DNA recognition by GAL4: structure of a protein-DNA complex. *Nature* 356, 408-14.
- Marmorstein, R., and Harrison, S. C. (1994). Crystal structure of a PPR1-DNA complex: DNA recognition by proteins containing a Zn₂Cys₆ binuclear cluster. *Genes Dev.* 8, 2504-12.
- Matangkasombut, O., Buratowski, R. M., Swilling, N. W., and Buratowski, S. (2000). Bromodomain factor 1 corresponds to a missing piece of yeast TFIID. *Genes Dev.* 14, 951-62.
- Miller, B. G., Hassell, A. M., Wolfenden, R., Milburn, M. V., and Short, S. A. (2000). Anatomy of a proficient enzyme: the structure of orotidine 5'-monophosphate decarboxylase in the presence and absence of a potential transition state analog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 2011-6.
- Mitchell, P. J., and Tjian, R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245, 371-8.

Mizuno, T., Nakazawa, N., Remgsamrarn, P., Kunoh, T., Oshima, Y., and Harashima, S. (1998). The Tup1-Ssn6 general repressor is involved in repression of IME1 encoding a transcriptional activator of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* *33*, 239-47.

Mukai, Y., Harashima, S., and Oshima, Y. (1991). AAR1/TUP1 protein, with a structure similar to that of the beta subunit of G proteins, is required for $\alpha 1$ - $\alpha 2$ and $\alpha 2$ repression in cell type control of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *11*, 3773-9.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *51*, 263-73.

Murphy, D. J., Hardy, S., and Engel, D. A. (1999). Human SWI-SNF component BRG1 represses transcription of the c-fos gene. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 2724-33.

Myer, V. E., and Young, R. A. (1998). RNA polymerase II holoenzymes and subcomplexes. *J. Biol. Chem.* *273*, 27757-60.

Nakajima, N., Horikoshi, M., and Roeder, R. G. (1988). Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: purification, genetic specificity, and TATA box-promoter interactions of TFIID. *Mol. Cell. Biol.* *8*, 4028-40.

Ng, R., and Abelson, J. (1980). Isolation and sequence of the gene for actin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *77*, 3912-6.

Ossipow, V., Tassan, J. P., Nigg, E. A., and Schibler, U. (1995). A mammalian RNA polymerase II holoenzyme containing all components required for promoter-specific transcription initiation. *Cell* *83*, 137-46.

Ozer, J., Moore, P. A., Bolden, A. H., Lee, A., Rosen, C. A., and Lieberman, P. M. (1994). Molecular cloning of the small (γ) subunit of human TFIIA reveals functions critical for activated transcription. *Genes Dev.* *8*, 2324-35.

Papamichos-Chronakis, M., Conlan, R. S., Gounalaki, N., Copf, T., and Tzamarias, D. (2000). Hrs1/Med3 is a Cyc8-tup1 corepressor target in the RNA polymerase II holoenzyme. *J. Biol. Chem.* *275*, 8397-403.

Park, S. H., Koh, S. S., Chun, J. H., Hwang, H. J., and Kang, H. S. (1999). Nrg1 is a transcriptional repressor for glucose repression of STA1 gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 2044-50.

Paull, T. T., Carey, M., and Johnson, R. C. (1996). Yeast HMG proteins NHP6A/B potentiate promoter-specific transcriptional activation in vivo and assembly of preinitiation complexes in vitro. *Genes Dev.* *10*, 2769-81.

- Peterson, C. L., and Tamkun, J. W. (1995). The SWI-SNF complex: a chromatin remodeling machine? *Trends Biochem. Sci.* *20*, 143-6.
- Pickart, C. M., and Rose, I. A. (1985). Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase acts on ubiquitin carboxyl-terminal amides. *J. Biol. Chem.* *260*, 7903-10.
- Pierrat, B., Lacroute, F., and Losson, R. (1993). The 5' untranslated region of the PPR1 regulatory gene dictates rapid mRNA decay in yeast. *Gene* *131*, 43-51.
- Platt, A., and Reece, R. J. (1998). The yeast galactose genetic switch is mediated by the formation of a Gal4p-Gal80p-Gal3p complex. *Embo J.* *17*, 4086-91.
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E., and Werner, T. (1995). MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acides Res.* *23*, 4878-84.
- Radzicka, A., and Wolfenden, R. (1995). A proficient enzyme. *Science* *267*, 90-3.
- Redd, M. J., Arnaud, M. B., and Johnson, A. D. (1997). A complex composed of tup1 and ssn6 represses transcription in vitro. *J. Biol. Chem.* *272*, 11193-7.
- Reece, R. J., and Ptashne, M. (1993). Determinants of binding-site specificity among yeast C6 zinc cluster proteins. *Science* *261*, 909-11.
- Reinberg, D., Horikoshi, M., and Roeder, R. G. (1987). Factors involved in specific transcription in mammalian RNA polymerase II. Functional analysis of initiation factors IIA and IID and identification of a new factor operating at sequences downstream of the initiation site. *J. Biol. Chem.* *262*, 3322-30.
- Roberts, S. G., Ha, I., Maldonado, E., Reinberg, D., and Green, M. R. (1993). Interaction between an acidic activator and transcription factor TFIIB is required for transcriptional activation. *Nature* *363*, 741-4.
- Rose, M., and Winston, F. (1984). Identification of a Ty insertion within the coding sequence of the *S. cerevisiae* URA3 gene. *Mol. Gen. Genet.* *193*, 557-60.
- Roy, A., Exinger, F., and Losson, R. (1990). cis- and trans-acting regulatory elements of the yeast URA3 promoter. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 5257-70.
- Ryan, M. P., Jones, R., and Morse, R. H. (1998). SWI-SNF complex participation in transcriptional activation at a step subsequent to activator binding. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 1774-82.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning*.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *74*, 5463-7.

- Sassone-Corsi, P., and Borrelli, E. (1986). Transcriptional regulation by trans-acting factors. *Trends Genet.* 2, 215-219.
- Schaffner, W., Serfling, E., and Jasin, M. (1985). Enhancer and eucaryotic gene transcription. *Trends Genet.* 1, 224-230.
- Schjerling, P., and Holmberg, S. (1996). Comparative amino acid sequence analysis of the C6 zinc cluster family of transcriptional regulators. *Nucleic Acides Res.* 24, 4599-607.
- Schwartz, L. B., Sklar, V. E., Jaehning, J. A., Weinmann, R., and Roeder, R. G. (1974). Isolation and partial characterization of the multiple forms of deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase in the mouse myeloma, MOPC 315. *J. Biol. Chem.* 249, 5889-97.
- Seifart, K. H., and Benecke, B.-J. (1975). DNA-dependent RNA polymerase C. *Eur. J. Biochem.* 53, 293-300.
- Sherman, F. (1991). Getting started with yeast, *Meth. Enzymol.*, Volume 194.
- Shimizu, M., Roth, S. Y., Szent-Gyorgyi, C., and Simpson, R. T. (1991). Nucleosomes are positioned with base pair precision adjacent to the alpha 2 operator in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J.* 10, 3033-41.
- Sikorski, R. S., and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.
- Smith, R. L., and Johnson, A. D. (2000). Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* 25, 325-330.
- Song, W., Treich, I., Qian, N., Kuchin, S., and Carlson, M. (1996). SSN genes that affect transcriptional repression in *Saccharomyces cerevisiae* encode SIN4, ROX3, and SRB proteins associated with RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* 16, 115-20.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-17.
- Spahr, H., Beve, J., Larsson, T., Bergstrom, J., Karlsson, K. A., and Gustafsson, C. M. (2000). Purification and characterization of RNA polymerase II holoenzyme from *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 275, 1351-6.
- Stirpe, F., and Fiume, L. (1967). Studies on the pathogenesis of liver necrosis by alpha-amanitin. Effect of alpha-amanitin on ribonucleic acid synthesis and on ribonucleic acid polymerase in mouse liver nuclei. *Biochem. J.* 105, 779-82.

- Suarez, T., de Queiroz, M. V., Oestreicher, N., and Scazzocchio, C. (1995). The sequence and binding specificity of UaY, the specific regulator of the purine utilization pathway in *Aspergillus nidulans*, suggest an evolutionary relationship with the PPR1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J.* *14*, 1453-67.
- Sudarsanam, P., Iyer, V. R., Brown, P. O., and Winston, F. (2000). Whole-genome expression analysis of *snf/swi* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *97*, 3364-9.
- Tobias, J. W., and Varshavsky, A. (1991). Cloning and functional analysis of the ubiquitin-specific protease gene *UBP1* of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *266*, 12021-8.
- Tran, H. G., Steger, D. J., Iyer, V. R., and Johnson, A. D. (2000). The chromo domain protein *chd1p* from budding yeast is an ATP-dependent chromatin-modifying factor. *Embo J.* *19*, 2323-31.
- Treitl, M. A., and Carlson, M. (1995). Repression by *SSN6-TUP1* is directed by *MIG1*, a repressor/activator protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *92*, 3132-6.
- Tzamarias, D., and Struhl, K. (1994). Functional dissection of the yeast *Cyc8-Tup1* transcriptional co-repressor complex. *Nature* *369*, 758-61.
- Vallee, B. L., Coleman, J. E., and Auld, D. S. (1991). Zinc fingers, zinc clusters, and zinc twists in DNA-binding protein domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *88*, 999-1003.
- Varanasi, U. S., Klis, M., Mikesell, P. B., and Trumbly, R. J. (1996). The *Cyc8 (Ssn6)-Tup1* corepressor complex is composed of one *Cyc8* and four *Tup1* subunits. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 6707-14.
- Varshavsky, A. (1997). The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes Cells* *2*, 13-28.
- Varshavsky, A. (1996). The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *93*, 12142-9.
- Varshavsky, A. (1997). The ubiquitin system. *Trends Biochem. Sci.* *22*, 383-7.
- Wahi, M., and Johnson, A. D. (1995). Identification of genes required for alpha 2 repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *140*, 79-90.
- Wahi, M., Komachi, K., and Johnson, A. D. (1998). Gene regulation by the yeast *Ssn6-Tup1* corepressor. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *63*, 447-57.
- Wellhausen, A. (1999). Mechanistische Aspekte der transkriptionellen Regulation. Math.-Nat. Fakultät (Universität zu Köln).

- West, R. W., Yocum, R. R., and Ptashne, M. (1984). *Saccharomyces cerevisiae* GAL1-GAL10 divergent promoter region: Location and function of the upstream activating sequence UAS_G. *Mol. Cell. Biol.* *4*, 2467-2478.
- White, J. H., Brou, C., Wu, J., Burton, N., Egly, J. M., and Chambon, P. (1991). Evidence for a factor required for transcriptional stimulation by the chimeric acidic activator GAL-VP16 in HeLa cell extracts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *88*, 7674-8.
- Wickner, R. B. (1974). Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* that incorporate deoxythymidine-5'-monophosphate into deoxyribonucleic acid in vivo. *J. Bacteriol.* *117*, 252-60.
- Wieland, H., and Hallermayer, R. (1941). Über die Giftstoffe des Knollenblätterpilzes. VI. Amanitin das Hauptgift des Knollenblätterpilzes. *Justus Liebig's Annalen der Chemie* *548*, 1-18.
- Williams, F. E., Varanasi, U., and Trumbly, R. J. (1991). The CYC8 and TUP1 proteins involved in glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* are associated in a protein complex. *Mol. Cell. Biol.* *11*, 3307-16.
- Wilson, C. J., Chao, D. M., Imbalzano, A. N., Schnitzler, G. R., Kingston, R. E., and Young, R. A. (1996). RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. *Cell* *84*, 235-44.
- Wittke, S., Lewke, N., Müller, S., and Johnsson, N. (1999). Probing the molecular environment of membrane proteins in vivo. *Mol. Biol. Cell.* *10*, 2519-30.
- Woodage, T., Basrai, M. A., Baxevanis, A. D., Hieter, P., and Collins, F. S. (1997). Characterization of the CHD family of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 11472-7.
- Wu, N., Mo, Y., Gao, J., and Pai, E. F. (2000). Electrostatic stress in catalysis: structure and mechanism of the enzyme orotidine monophosphate decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *97*, 2017-22.
- Wu, Y., Reece, R. J., and Ptashne, M. (1996). Quantitation of putative activator-target affinities predicts transcriptional activating potentials. *Embo J.* *15*, 3951-63.
- Yu, Y., Eriksson, P., and Stillman, D. J. (2000). Architectural transcription factors and the SAGA complex function in parallel pathways to activate transcription. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 2350-7.
- Yudkovsky, N., Logie, C., Hahn, S., and Peterson, C. L. (1999). Recruitment of the SWI/SNF chromatin remodeling complex by transcriptional activators. *Genes Dev.* *13*, 2369-74.

Zappavigna, V., Falciola, L., Citterich, M. H., Mavilio, F., and Bianchi, M. E. (1996). HMG1 interacts with HOX proteins and enhances their DNA binding and transcriptional activation. *Embo J.* 15, 4981-91.

Zhang, D. Y., Dorsey, M. J., Voth, W. P., Carson, D. J., Zeng, X., Stillman, D. J., and Ma, J. (2000). Intramolecular interaction of yeast TFIIB in transcription control. *Nucleic Acides Res.* 28, 1913-20.

Zhang, M., Rosenblum-Vos, L. S., Lowry, C. V., Boakye, K. A., and Zitomer, R. S. (1991). A yeast protein with homology to the beta-subunit of G proteins is involved in control of heme-regulated and catabolite-repressed genes. *Gene* 97, 153-61.

8. Anhang

8.1 Oligonukleotide

8.1.1 ADH1-Primer zur Sequenzierung von pADNS-Derivaten:

Promotorprimer (1994):

TCGTTCCCTTTCTTCCTTGT

Terminatorprimer (1995):

TCTGGCAAGGTAGACAAGCCG

8.1.2 Primer zur Klonierung von PPR1:

5' PPR1-ORF (BamHI)

gacgcgatccccATG AAG CAG AAA AAA TTT AAC TC

3' PPR1-ORF (NotI)

aaggaaaaagcgccgCTA AAA TAT TCC ACC GGA TTC

8.1.3 Primer zur Klonierung von PPR1₁₋₁₂₃₊₂₀₉₋₉₀₄:

PPR1-123+209-904FOR:

AA AAG TAC AGT TCA GTT TCA gcg ctg ggc acg atg aga ga

PPR1-123+209-904REV:

tc tct cat cgt gcc cag cgc TGA AAC TGA ACT GTA CTT TT

8.2 Klonierungen

8.2.1 Die Klonierung des *pade2*-KO-Plasmids

Das zur Einführung einer auxotrophen Mutation verwendete Plasmid *pade*-KO ist ein Derivat des Vektors pSL1180. In diesen wurden Teile des *ADE2*-Genes, die aus dem Plasmid SK-*ade2* (von N. Lehming) gewonnen wurden, kloniert (siehe Abb. 7.1 A und B). In dem resultierenden Plasmid (*pade5'3'*) sind 645 Nukleotide des für *ADE2* kodierenden Bereiches durch 159 Nukleotide des multiplen Klonierbereichs des pSL1180 ersetzt. In *pade5'3'* wurde das *hisG-URA3-hisG*-Fragment aus dem Plasmid pNKY51 (Alani et al., 1987) derart kloniert, daß es sich zwischen den *ADE2* Sequenzen befand (siehe Abb. 7.1 B und C).

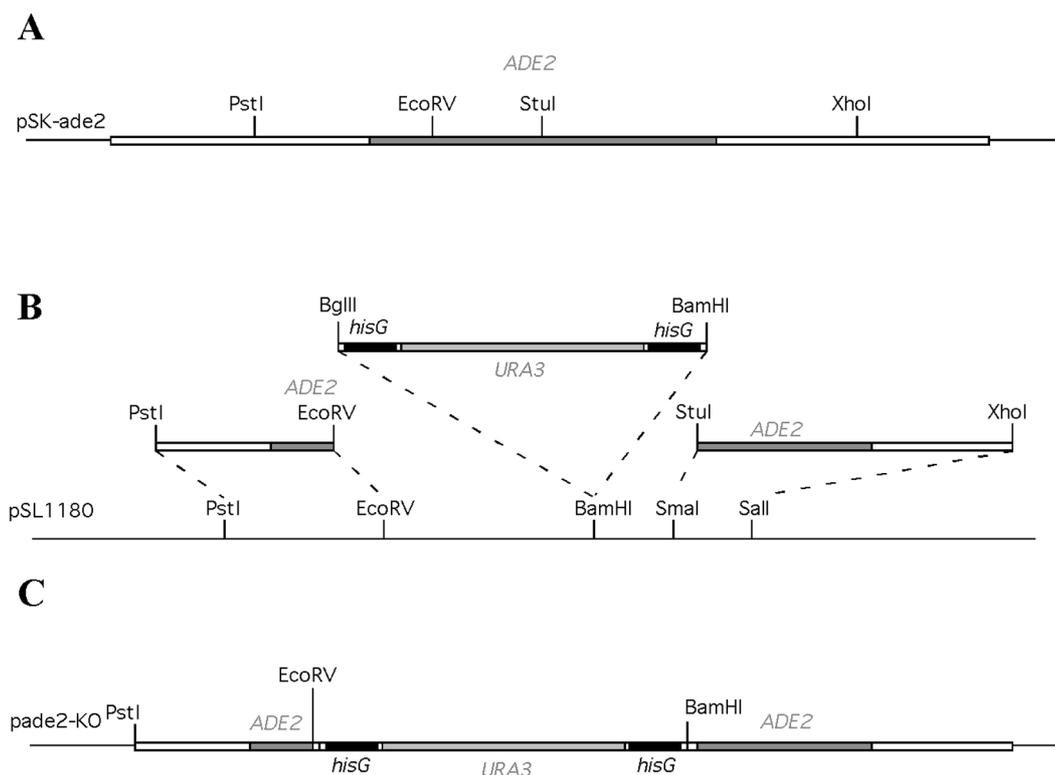


Abb. 7.1: Das Plasmid *pade2*-KO zur Deletion des chromosomalen *ADE2*-Gens.

Die Abbildung stellt schematisch die Klonierung von *pade2*-KO dar. Quelle der *Ade2*-Fragmente war das von N. Lehming zur Verfügung gestellte Plasmid pSK-*ade2* (A). Teil B zeigt die Subklonierung der einzelnen Fragmente in pSL1180 (Pharmacia, Freiburg). Das BglIII/ BamHI-Fragment stammt aus dem Plasmid pNKY51 (Alani et al., 1987). (C) Schematische Darstellung von *pade2*-KO.

8.2.2 Klonierung von pADNX- und pACNX-N_{ub}-IBC3-PPR1

pADNX-N_{ub}IBC3 ist ein Derivat des pADNS (Colicelli et al., 1989). In dessen HindIII- und NotI-Restriktionsschnittstellen ist durch Oligonukleotide die Sequenz:

aagcttAGATCTCTCGAGCCCGGGGTCGACGCTAGCggcccgggcc

eingesetzt worden, wodurch der Vektor pADNX entstand. Ferner wurde das Chloramphenicol-Resistenzgen in das der β -Lactamase insertiert und der N-Terminus von Ubiquitin als HindIII/ BglII-Fragment subkloniert (N. Lehming). In dem Plasmid pACNX-N_{ub}IBC3 ist der 2 μ m "ori" von pADNX-N_{ub}IBC3 durch einen ARS-CEN-"ori" ersetzt worden (N. Lehming).

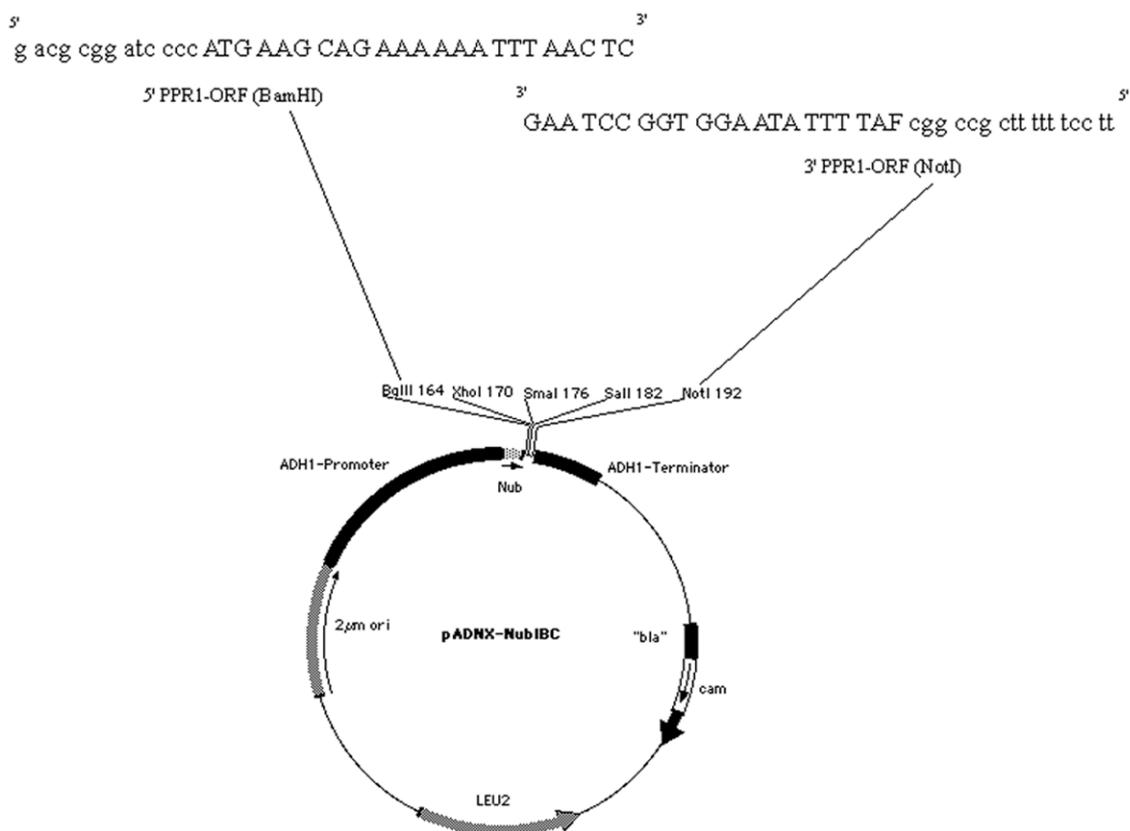


Abb. 7.2: Klonierung von pADNX-IBC3-PPR1.

Der Primer 3' PPR1-ORF ist entgegen der üblichen Orientierung in 3'-5' Richtung angegeben. Die proteinkodierenden Nukleotide des PPR1 bzw. PPR1₁₋₁₂₃₊₂₀₉₋₉₀₄ sind als Tripletts angeordnet und in Blockschrift gehalten. Die Abbildung wurde mit Hilfe von MacPlasmap v1.82 und Adobe Photoshop 4.0 erstellt.

Der proteinkodierende Bereich des *PPR1*-Gens wurde durch PCR amplifiziert und in das Plasmid pADNX-N_{ub}IBC3 als BamHI/ NotI-Fragment kloniert (Abb. 7.2).

Bei der Klonierung von pACNX-N_{ub}IBC3-PPR1 wurde von N. Lehming analog verfahren. Mit den erhaltenen Konstrukten pADNX-N_{ub}IBC3-PPR1 und pACNX-N_{ub}IBC3-PPR1 ließ sich PPR1 als N_{ub}-Fusionsprotein exprimieren.

8.2.3 Klonierung von pADNX- und pACNX-N_{ub}IBC3-PPR1₁₋₁₂₃₊₂₀₈₋₉₀₄:

Die zu der Deletion flankierenden Nukleotidsequenzen (1 bis 369 und 627 bis 2712) von PPR1 wurden separat amplifiziert. Die hierbei verwendeten geninternen Primer überlappten sich, so daß diese nach dem Vereinen von Aliquots der Reaktionen mit dem jeweilig anderen Amplifikat hybridisierten und in den ersten Zyklen einer zweiten PCR als Primer fungierten:

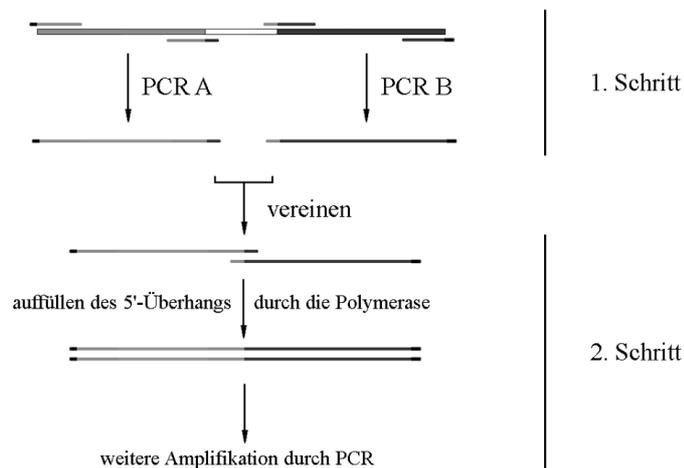


Abb. 7.3: Prinzip der Deletion durch PCR.

Der deletierte Bereich ist in weiß gehalten. Die flankierenden Sequenzabschnitte sind durch unterschiedlichen Grautönen gegeben. Die internen Primer, die sich überlappen, hatten folgende Sequenzen: AA AAG TAC AGT TCA GTT TCA gcg ctg ggc acg atg aga ga und tc tct cat cgt gcc cag cgc TGA AAC TGA ACT GTA CTT TT, wobei die in Blockschrift gehaltenen Nukleotide den 5'-Bereich kodierenden Teil entsprachen, die in Kleinbuchstaben hybridisierten mit dem 3'-Bereich. Die verwendeten endständigen Primer sind identisch mit denen, die bei der Klonierung von pADNX- und pACNX-N_{ub}IBC3-PPR1 verwendet wurden.

Diese so gebildeten DNA-Hybride wurden anschließend durch endständige Primer (vgl. Abb. 7.2) vervielfältigt.

Bei der Konstruktion von pADNX-N_{ub}-IBC3-PPR1₁₋₁₂₃₊₂₀₈₋₉₀₄, diente das zuvor von N. Lehming klonierte pACNX-N_{ub}IBC3-PPR1₁₋₁₂₃₊₂₀₉₋₉₀₄ als Matrize für die PCR. Beide wurden analog zu pADNX- und pACNX-N_{ub}-IBC3-PPR1 durch Subklonierung der PCR-Produkte erhalten (vgl. Abb. 7.2).

8.2.4 Klonierung von GST-PPR1 und GST-PPR1₁₋₁₂₃₊₂₀₈₋₉₀₄

Die gleichen PCR Produkte, die zur Klonierung der N_{ub}-Fusionen dienten, wurden als BamHI/ NotI-Fragmente in den Vektor pGEX-5X-1 (s. Abb. 7.3) kloniert.

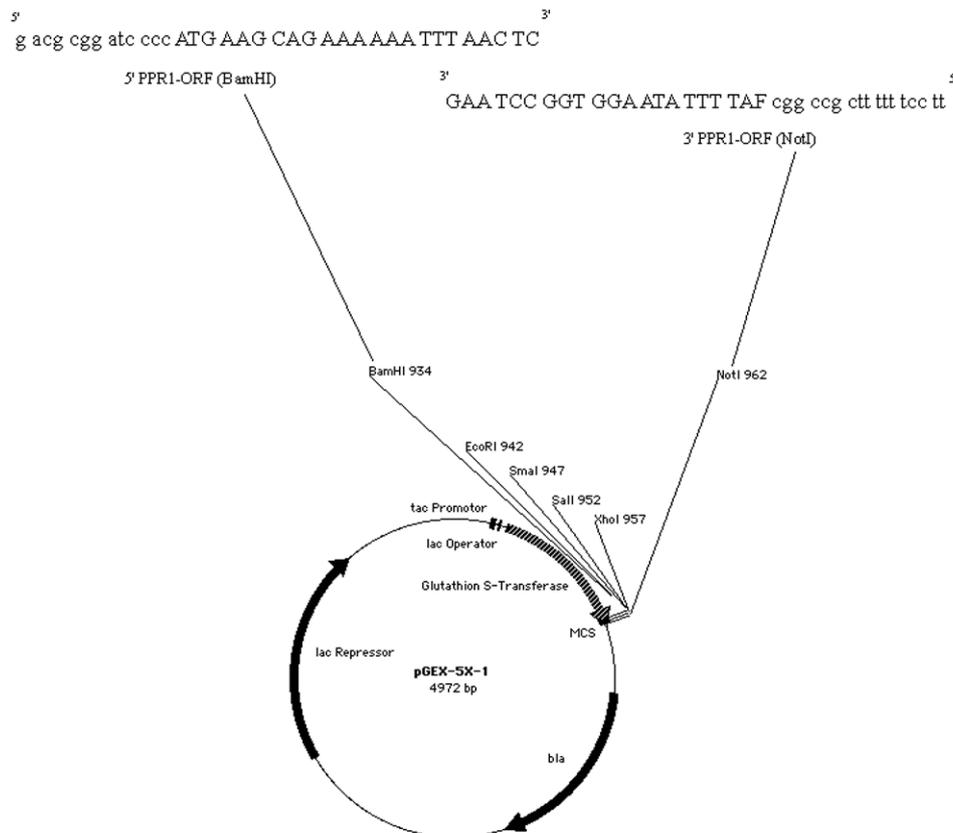


Abb. 7.3: Klonierung von GST-PPR1 und GST-PPR1₁₋₁₂₃₊₂₀₈₋₉₀₄.

Der Primer 3' PPR1-ORF ist entgegen der üblichen Orientierung in 3'-5' Richtung angegeben. Die proteinkodierenden Nukleotide des PPR1 bzw. PPR1₁₋₁₂₃₊₂₀₉₋₉₀₄ sind als Tripletts angeordnet und in Blockschrift gehalten. Die Abbildung wurde mit Hilfe von MacPlasmap v1.82 und Adobe Photoshop 4.0 erstellt.

8.3 Weitere Plasmide

8.3.1 Quelle für das *URA3*-Gen und der Ura3-Sonden

Für die Rekonstruktion der *URA3*-Loci und zur Gewinnung der *URA3*-Sonden für Southern- und Northern-Blot-Analysen wurde das Plasmid "spacing template" verwendet.

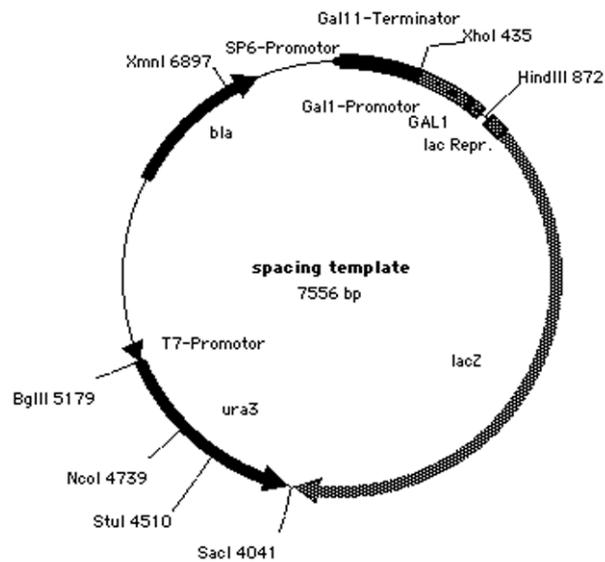


Abb. 7.4: spacing template

Das Plasmid ist ein pSP73-Derivat. Die relevanten Restriktionsschnittstellen sind SacI (4041)/ BglII (5179) für die Rekonstruktion der *URA3*-Loci und StuI (4510)/ BglII (5179) für die in den Northern- und Southern-Blot-Analysen eingesetzten Sonden.

8.3.2 Quelle für die ACT1-Sonden

Die zur Normierung verwendeten Signale der *ACT1*-mRNA in den Northern-Blot-Analysen wurde mit einer Sonde aus dem *Yact1*-Plasmid (Ng and Abelson, 1980 - freundlicherweise von N. Johnsson zur Verfügung gestellt) detektiert.

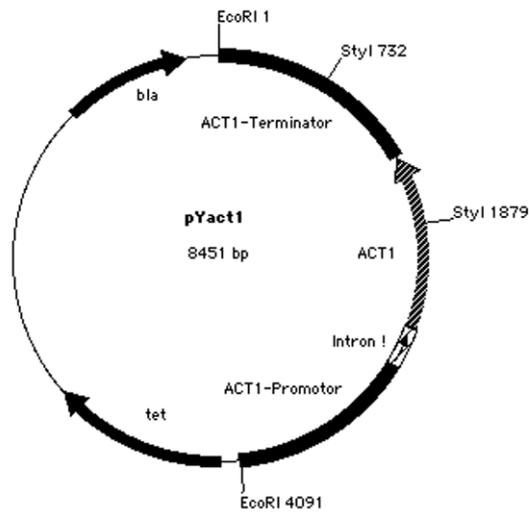


Abb. 7.5: Das Plasmid pYact1

Das Plasmid ist das von Ng et al. in pBR322 kloniert chromosomale *EcoRI*/*EcoRI*-Fragment mit dem *ACT1*-Locus (Ng and Abelson, 1980) und wurde freundlicherweise von N. Johnsson zur Verfügung gestellt. Die für die Gewinnung der ACT1-Sonde benutzten *StyI* Restriktionsschnittstellen sind angegeben.

8.4 Liste der verwendeten Computerprogramme

8.4.1 Lokale Installationen (Macintosh):

Adobe Photoshop 4.0 Power PC

Align DNA* v2.14

Canvas 5.0.2

EditSeq DNA* v3.81

Endnote 3.0.1

ImageQuant v1.1

ISIS/Draw 2.3

MacPlasmap v1.82

Microsoft Excel 5.0a

Microsoft Word 6.0.1.

Netscape Communicator 4.61

Rasmol Macintosh Version 2.6

8.4.2 Internetbasierende Programme:

MatInspector v2.2

<http://genomatix.gsf.de/cgi-bin/matinspector/matinspector.pl>

BLAST v2.0.13

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

Danksagung

An dieser Stelle bedanken ich mich bei all denen, auch namentlich nicht erwähnten, die auf unterschiedlichste Art zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. Norbert Lehming, der mir ermöglichte diese Arbeit anzufertigen und sie mit seiner ständigen Diskussionsbereitschaft und seinen Ratschläge begleitet hat.

Bei Herrn Prof. Dr. Helmut W. Klein bedanke ich mich für seine Bereitschaft die Betreuung dieser Arbeit zu übernehmen.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern des Labor Lehming danke ich für das Arbeitsklima in dem ich wirken durfte.

Besonderen Dank schulde ich Frau Dr. Brigitte Kull, Frau Dr. Agnès Le Saux (jetzt: IBGC-CNRS, Bordeaux) und Frau Jutta Schüller für die vielen Diskussionen, Ratschläge und Aufmunterungen. Danke!

Für die Überlassung diverser Plasmide bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. Nils Johnsson und Frau Jutta Schüller. Frau Stephanie Heck habe ich für die Bereitstellung der H₆-HA-TUP1-Präparation zu danken.

Zuletzt, aber nicht minder, danke ich Herrn Frank Bierbaum, Frau Dr. Brigitte Kull, Frau Jutta Schüller und Herrn Dr. Frank Sehmeyer für die Mühen beim Korrekturlesen dieser Arbeit.

Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Helmut W. Klein betreut und am Max-Delbrück-Laboratorium in der MPG unter der Anleitung von Herrn PD Dr. Norbert Lehming angefertigt worden.

Köln, den 27.Juli 2000

Lebenslauf

Name: Andreas Jochem Pätzold
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Geburtsdatum: 18. Dezember 1968
Geburtsort: Castrop-Rauxel

Schulbildung

Aug. 1975 bis Jun. 1979
Grundschule an der Kirchstraße in Castrop-Rauxel

Aug. 1979 bis Jun. 1985
Realschule II in Castrop-Rauxel
Abschluß: Fachoberschulreife

Aug. 1985 bis Jun. 1988
Ernst-Barlach-Gymnasium in Castrop-Rauxel
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Studium

Okt. 1988 bis Jan. 1995
Ruhr-Universität Bochum
Abschluß: Diplom-Chemiker

Jan. 1996 bis Jul. 2000
Doktorarbeit bei PD Dr. Norbert Lehming am
Max-Delbrück-Laboratorium in der Max-
Planck-Gesellschaft in Köln unter der Betreuung
von Prof. Dr. H.W. Klein (Universität zu Köln)

Berufliche Tätigkeit

Mai 1995 bis Dez. 1995
Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-
Delbrück-Centrum für molekulare Medizin in
Berlin-Buch