

**Interaktionen zwischen Transkriptionsaktivatoren
und Coaktivatoren sowie Corepressoren
in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae***

I n a u g u r a l d i s s e r t a t i o n

zur

**Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Greifswald

vorgelegt von

Maike Engelhardt, geb. Spierling

Greifswald, 11.01.2021

Dekan: Prof. Dr. Gerald Kerth

1. Gutachter: Prof. Dr. Hans-Joachim Schüller

2. Gutachter: Prof. Dr. Gerhard H. Braus

Tag der Promotion: 23.04.2021

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis	3
II Abbildungsverzeichnis	7
III Tabellenverzeichnis	9
1 Zusammenfassung	10
1.1 Summary	12
2 Einleitung	14
2.1 Regulation der Transkription in Eukaryoten	14
2.2 Aktivatorproteine in der Hefe <i>S. cerevisiae</i>	15
2.3 Regulation der Phospholipid-Biosynthese in der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
2.3.1 Der heterodimere Aktivator Ino2/Ino4 und der Repressor Opi1	18
2.4 Generelle Transkriptionsfaktoren	20
2.4.1 Der TFIID-Komplex.....	20
2.4.2 Der TFIIA-Komplex.....	23
2.4.3 Die Transkriptionsfaktoren TFIIB, TFIIE, TFIIIF und TFIIH.....	24
2.4.4 Der Mediator-Komplex	25
2.5 Transkriptionsregulation durch Modifizierung der Chromatinstruktur	26
2.5.1 Chromatin-remodellierende Komplexe	26
2.5.2 Einfluss posttranslationaler Modifizierungen von Histonen.....	27
2.6 Corepressorkomplexe in der Hefe <i>S. cerevisiae</i>	28
2.6.1 Der Sin3/Rpd3 Corepressorkomplex	28
2.6.2 Der Cyc8/Tup1 Corepressorkomplex.....	29
2.7 Die ATPasen des 26 S Proteasoms: Sug1 und Sug2	30
2.8 Ziele der Arbeit	32
3 Ergebnisse	33
3.1 Promotorrekrutierung der Corepressoren Sin3 und Cyc8 durch Aktivatorproteine	33
3.1.1 Expression von HA ₃ -markiertem Sin3 und Cyc8.....	33
3.1.2 Charakterisierung der Interaktion von Ino2 mit Sin3 und Cyc8	34
3.1.2.1 Konstruktion von GST-Ino2-Verkürzungen und gerichtete Mutagenese von <i>INO2</i>	35
3.1.2.2 Kartierung der Sin3/Cyc8- Interaktionsdomäne in Ino2	36
3.1.2.3 Einfluss einer defekten Ino2-Variante auf die Regulation der Expression ICRE- abhängiger Gene	37
3.1.3 Charakterisierung der Interaktion von Pho4 und Hac1 mit Sin3 und Cyc8	39
3.1.3.1 Kartierung der Sin3/Cyc8- Interaktionsdomäne von Pho4	40
3.1.3.2 Eingrenzung der Sin3/Cyc8- Interaktionsdomäne von Hac1.....	41
3.1.4 Kartierung der Aktivator-Interaktionsdomäne im Sin3-Corepressor	42
3.1.5 Test auf <i>in vivo</i> -Interaktion zwischen Sin3 und den Aktivatoren Ino2 und Pho4.....	43
3.2 Studien zur Promotorrekrutierung des Aktivators Ino2 durch den basalen Transkriptionsfaktor TFIID	46
3.2.1. Interaktionsstudien zwischen TFIID und Ino2	47
3.2.2 Charakterisierung der Interaktion zwischen Taf1 und Ino2.....	47
3.2.2.1 Taf1-Sequenzvergleich zwischen <i>Saccharomyces</i> -Hefen.....	47

3.2.2.2	Gerichtete Mutagenese ausgewählter Aminosäuren in Taf1	48
3.2.2.3	Funktionelle Charakterisierung der Mutation LLK-AAA mittels „GST-Pulldown“	49
3.2.2.4	Funktionelle Charakterisierung der Mutation KY-AA mittels „Plasmid Shuffling“	50
3.2.2.5	Einfluss der <i>TAF1</i> _{K206A Y207A} -Variante auf die Expression des <i>INO1</i> -Gens	55
3.2.3	Die Bromodomänenfaktoren Bdf1 und Bdf2	56
3.2.3.1	Konstruktion einer HA ₃ -Bdf1 Fusion und Interaktionsstudien mit Ino2	56
3.2.3.2	Konstruktion von HA ₃ -Bdf1-Längenvarianten und Interaktionsstudien mit Ino2	57
3.2.3.3	Charakterisierung einer Bdf1-Ino2-Interaktionsdomäne durch gerichtete Mutagenese	59
3.2.4	Charakterisierung der Interaktion zwischen Taf12 und Ino2	60
3.2.4.1	Taf12-Sequenzvergleich zwischen <i>Saccharomyces</i> -Hefen	60
3.2.4.2	Gerichtete Mutagenese ausgewählter Aminosäuren in Taf12	61
3.2.4.3	Einfluss einer Taf12-Teildeletion auf die <i>INO1</i> -Genaktivierung	63
3.3	Promotorrekrutierung des basalen Transkriptionsfaktors TFIIA durch den Aktivator Ino2 ...	67
3.3.1	Interaktionsstudien zwischen Ino2 und den TFIIA-Untereinheiten	67
3.3.2	Eingrenzung der Ino2-Interaktionsdomäne in Toa1	68
3.3.2.1	Untersuchungen zur Toa1-Interaktion mit Ino2-TAD1 und Ino2-TAD2	70
3.3.3	Gerichtete Mutagenese innerhalb der Interaktionsdomänen von Toa1	70
3.3.4	<i>In vitro</i> -Interaktionsstudien zwischen Ino2 und Toa1-Varianten	73
3.3.5	Phänotypische Charakterisierung ausgewählter Toa1-Varianten mittels „Plasmid Shuffling“	75
3.3.5.1	Konstruktion des Hefe-Stammes MSY8	75
3.3.5.2	Insertion der zu testenden <i>TOA1</i> -Varianten in ein <i>LEU2</i> -Centromerplasmid	76
3.3.5.3	Phänotypische Charakterisierung der <i>TOA1</i> -Varianten	77
3.3.6	Eingrenzung der Ino2-Interaktionsdomäne in Toa2	80
3.4	Promotorrekrutierung der ATPasen Sug1, Sug2 und Swi2 durch den Aktivator Ino2	81
3.4.1	<i>In vitro</i> -Interaktion von Sug1 und Sug2 mit Ino2	82
3.4.1.1	Expression von HA ₃ -Sug1 und HA ₃ -Sug2 und Interaktionsstudien mit Ino2	83
3.4.1.2	Konstruktion von Sug1-Längenvarianten für die Kartierung einer minimalen Interaktionsdomäne	84
3.4.1.4	Interaktion von Ino2 mit Sug2-Längenvarianten	87
3.4.2	<i>In vitro</i> -Interaktion von Swi2 mit Aktivatoren der Hefe	88
3.4.2.1	<i>In vitro</i> -Interaktion des Gal4 Aktivators mit dem N-Terminus von Swi2	88
3.4.2.2	Kartierung einer Aktivator-Interaktionsdomäne im Swi2-Protein	89
3.4.2.3	Charakterisierung der Ino2-Swi2-Interaktion mittels gerichteter Mutagenese	92
4	Diskussion	95
4.1	Charakterisierung der Promotorrekrutierung von Corepressoren durch Aktivatorproteine ..	95
4.1.1	Der Corepressor Sin3 interagiert mit den Aktivatoren Ino2, Pho4 und Hac1	95
4.1.2	Der Corepressor Cyc8 interagiert mit den Aktivatoren Ino2, Pho4 und Hac1	97
4.1.3	Der Einfluss einer Ino2 FLD-AAA-Mutation auf die Expression ICRE-abhängiger Gene	98

4.2 Charakterisierung der Interaktionen basaler Transkriptionsfaktoren mit dem Aktivator Ino2	99
4.2.1 Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors TFIID für die Phospholipidbiosynthese	101
4.2.2 Bdf1 - eine Komponente der Transkriptionsmaschinerie interagiert mit Ino2	103
4.2.3 Die TFIIA-Untereinheiten Toa1 und Toa2 interagieren mit Ino2	104
4.3 Die Aktivator-abhängige Rekrutierung des SWI/SNF-Chromatinremodellierungskomplexes	106
4.4 Die Rolle der ATPasen Sug1 und Sug2 bei der Transkriptionsinitiation	108
4.5 Resümee und Ausblick	109
5 Material und Methoden	111
5.1 Verwendete Organismen	111
5.1.1 <i>Escherichia coli</i> -Stämme	111
5.1.2 Hefestämme	111
5.2 Nährmedien	113
5.2.1 Bakterielle Medien	113
5.2.2 Medien für Hefe	113
5.3 Klonierungsvektoren und Plasmide	114
5.3.1 Klonierungsvektoren	114
5.3.2. Erhaltene Plasmide	114
5.3.1 Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide	116
5.4 Oligonucleotide	121
5.5 Molekularbiologische und biochemische Standardpuffer	129
5.6 Kultivierung von Mikroorganismen	129
5.6.1 Anzucht von <i>E. coli</i> -Zellen	129
5.6.2 Anzucht von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Zellen	129
5.6.3 Zelldichtebestimmung	129
5.6.4 Herstellung von Dauerkulturen	130
5.7 Transformationstechniken	130
5.7.1 Transformation von <i>E. coli</i> nach der Calciumchlorid-Methode	130
5.7.2 Transformation von Hefe nach der modifizierten Lithiumacetat-Methode	131
5.8 Methoden zur Isolierung von DNA	131
5.8.1 Analytische Isolierung von Plasmid- DNA aus <i>E. coli</i> („Miniscreen“)	131
5.8.2 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> (Säulenpräparation)	132
5.8.3 Isolierung chromosomaler DNA aus Hefezellen	133
5.9 Enzymatische Modifikationen von DNA-Molekülen	133
5.9.1 Endonukleolytische Spaltung von Plasmid- DNA	133
5.9.2 Phosphatase-Behandlung zur 5'-Dephosphorylierung gespaltener Vektoren	134
5.9.3 Ligation von DNA-Molekülen	134
5.10 Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	135
5.10.1 PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Klonierung	135
5.10.2 Analytische PCR zum Nachweis von DNA-Manipulationen	136

5.10.3 PCR zur gerichteten Mutagenese von Leserahmenkassetten mit mutagenen synthetischen Oligonucleotiden.....	136
5.10.4 Aufreinigung von PCR-Produkten.....	138
5.11 Elektrophoretische Auftrennung von Molekülen.....	139
5.11.1 Auftrennung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese	139
5.11.2 Isolierung von DNA-Molekülen aus Agarosegelen	139
5.11.3 Auftrennung von Proteinen in denaturierenden Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE).....	140
5.12 Zellaufschlussmethoden	142
5.12.1 Glasperlenaufschluss von Hefezellen	142
5.12.2 „Zirconia-Bead“-Zellaufschluss von Hefezellen.....	142
5.12.3 Ultraschallaufschluss von <i>E.coli</i> -Zellen	142
5.13 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	143
5.13.1 Proteinbestimmung mit der Mikrobiuret-Methode.....	143
5.14 β-Galaktosidase-Enzymtest	143
5.15 Heterologe Expression und Aufreinigung von Fusions-Proteinen in <i>E. coli</i>	145
5.15.1 Expression von HA3-Proteinen.....	145
5.15.2 Expression der GST-Fusionsproteine	145
5.15.3 Affinitätschromatografische Aufreinigung der GST-Fusionsproteine im „batch“-Verfahren	146
5.15.4 Proteinfärbung mittels Coomassie-Blau	147
5.16 Affinitätschromatografischer GST-Pulldown zum <i>in vitro</i>- Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen	147
5.16.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten für affinitätschromatografische GST-Pulldown-Experimente.....	147
5.16.2 Vorklärung der HA ₃ -Proteine und Bindungsreaktion	148
5.16.3 Aufreinigung der Interaktionsansätze	149
5.17 Western Blot-Analyse	149
5.17.1 Übertragung von Proteinen auf eine Transfermembran	149
5.17.2 Immunologischer Nachweis HA ₃ -Epitop-markierter Proteine	150
6 Anhang.....	152
6.1 Literaturverzeichnis	152
6.2 Abkürzungsverzeichnis	167
6.3 Publikationen	168

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Aktivators Ino2.	19
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des TFIIID-Komplexes.	20
Abbildung 2.3: Darstellung des TFIIA-Komplexes.	24
Abbildung 3.1: Expressionskontrolle von HA ₃ -Sin3 und HA ₃ -Cyc8 aus <i>S. cerevisiae</i> bzw. <i>E. coli</i>	34
Abbildung 3.2: <i>In vitro</i> -Interaktion zwischen Ino2 und Sin3 bzw. Cyc8.	35
Abbildung 3.3: <i>In vitro</i> -Interaktion zwischen Ino2-Verkürzungen und Sin3 bzw. Cyc8.	37
Abbildung 3.4: <i>In vitro</i> -Interaktion zwischen Pho4 und Hac1 mit Sin3 bzw. Cyc8.	39
Abbildung 3.5: Charakterisierung der Pho4-Interaktionsdomäne mit Sin3 und Cyc8.	40
Abbildung 3.6: Eingrenzung der Hac1-Interaktionsdomäne mit Sin3 und Cyc8.	41
Abbildung 3.7: Charakterisierung der Hac1-Interaktionsdomäne mit Sin3 und Cyc8.	42
Abbildung 3.8: Kartierung der Aktivator-Interaktionsdomäne innerhalb des Corepressors Sin3.	42
Abbildung 3.9: Prinzip des „Yeast-Two-Hybrid“ Systems zum Nachweis möglicher <i>in vivo</i> - Interaktionen zwischen Sin3 und den Aktivatoren Ino2 und Pho4.	43
Abbildung 3.10: „Yeast-Two-Hybrid“ Experimente zum Test auf <i>in vivo</i> -Interaktion zwischen Sin3 und den Aktivatoren Ino2 und Pho4.	45
Abbildung 3.11: Taf1-ABD2-Sequenzvergleich zwischen verschiedenen <i>Saccharomyces</i> -Hefen.	48
Abbildung 3.12: Charakterisierung der Taf1-ABD 2.	49
Abbildung 3.13: Charakterisierung der Taf1-Mutationen L208A L209A und K210A.	50
Abbildung 3.14: Prinzip des „plasmid shuffling“.	51
Abbildung 3.15: Konstruktion weiterer <i>TAF1</i> -Centromerplasmide.	53
Abbildung 3.16: „Plasmid Shuffling“ mit <i>TAF1</i> K206A Y207A.	54
Abbildung 3.17: Einfluss von Inositol auf das Wachstum eines Stammes mit <i>TAF1</i> Genvariante.	54
Abbildung 3.18: Quantifizierung der Effekte einer Taf1 _{K206A Y207A} -Mutation.	55
Abbildung 3.19: Interaktionsstudien zwischen Ino2 und Bdf1.	57
Abbildung 3.20: Interaktionsstudien zwischen Ino2 und Bdf1-Längenvarianten.	58
Abbildung 3.21: Interaktionsstudien zwischen Ino2 und Bdf1-Varianten.	59
Abbildung 3.22: Taf12-Sequenzvergleich verschiedener <i>Saccharomyces</i> -Hefen.	61
Abbildung 3.23: Charakterisierung der Taf12-Aktivatorbindedomäne 2.	62
Abbildung 3.24: Charakterisierung der Taf12-Aktivatorbindedomäne 2 durch eine Vierfach-Mutante.	62
Abbildung 3.25: „Plasmid Shuffling“ mit der Längenvariante <i>TAF12</i> ₂₇₉₋₅₃₉	64
Abbildung 3.26: Test auf Inositol-abhängiges Wachstum von Zellen mit einer <i>TAF12</i> -Längenvariante.	65
Abbildung 3.27: Quantifizierung der Effekte einer Taf12-Verkürzung.	66
Abbildung 3.28: Interaktionsstudien zwischen Ino2 und den TFIIA-Untereinheiten.	68
Abbildung 3.29: Interaktionsstudien zwischen Ino2 und Toa1-Längenvarianten.	69
Abbildung 3.30: Interaktionsstudien zwischen Ino2 und C-terminalen Toa1-Längenvarianten.	69
Abbildung 3.31: Interaktionsstudien zwischen den Ino2-TADs und Toa1.	70
Abbildung 3.32: Vergleich der N-terminalen Toa1-Sequenzen verschiedener <i>Saccharomyces</i> -Hefen.	71
Abbildung 3.33: Vergleich der C-terminalen Toa1-Sequenzen verschiedener <i>Saccharomyces</i> -Hefen.	72
Abbildung 3.34: Interaktionsstudien zwischen Ino2 und Toa1-Varianten.	74
Abbildung 3.35: „Plasmid Shuffling“ mit <i>TOA1</i> -Varianten.	78

Abbildung 3.36: Untersuchungen zur Inositolabhängigkeit der im „Plasmid Shuffling“ untersuchten *TOA1*-Varianten.79

Abbildung 3.37: Interaktionsstudie zwischen Ino2 und einer *Toa2*-Längenvariante.81

Abbildung 3.38: Interaktion zwischen den Aktivatoren Ino2 bzw. Gal4 und Sug1 bzw. Sug2.83

Abbildung 3.39: Interaktion zwischen Ino2-TAD1 bzw. Ino2-TAD2 und Sug1 bzw. Sug2.84

Abbildung 3.40: Kartierung der mit Ino2 interagierenden Sug1-Abschnitte.86

Abbildung 3.41: Interaktion zwischen Ino2 und Sug2-Längenvarianten.87

Abbildung 3.42: Interaktion zwischen Gal4 und Swi2.....89

Abbildung 3.43: Interaktionsstudien mit der Gal4-TAD und Swi2-Längenvarianten.....90

Abbildung 3.44: Interaktion zwischen Hefeaktivatoren und Swi2₁₆₁₋₃₀₀.91

Abbildung 3.45: Interaktionsstudien zwischen der Minimaldomäne von Swi2 und Hefeaktivatoren. 91

Abbildung 3.46: Vergleich der Swi2-Sequenzen im Aminosäurebereich 286-307 verschiedener *Saccharomyces*-Hefen.....92

Abbildung 3.47: Interaktionsstudien zwischen Ino2 und Swi2-Varianten.94

Abbildung 4.1: Modell zur Ino2-vermittelten Bindung von TFIIA und TFIID im Promotorbereich ICRE-abhängiger Gene.....101

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Einfluss des Ino2-Wildtyps und der Ino2 FLD-AAA-Mutante auf die Expression ICRE-abhängiger Gene	38
Tabelle 3.2: Konstruierte Plasmide mit den zugehörigen Bdf1-Längenvarianten	57
Tabelle 3.3: Plasmide für Interaktionsstudien mit den zugehörigen Toa1-Sequenzvarianten	73
Tabelle 3.4: ARS CEN LEU2-Plasmide mit TOA1-Sequenzvariationen im N-Terminus.....	76
Tabelle 3.5: ARS CEN LEU2-Plasmide mit TOA1-Sequenzvariationen im C-Terminus	77
Tabelle 3.6: Konstruierte Plasmide mit den zugehörigen Toa2-Längenvarianten	81
Tabelle 3.7: Plasmide für die Synthese von HA ₃ -Sug1-Längenvarianten in E. coli	85
Tabelle 5.1: Verwendete Bakterienstämme.....	111
Tabelle 5.2: Verwendete Hefestämme, vom Betreuer zur Verfügung gestellt	112
Tabelle 5.3: Verwendete Hefestämme, selbst konstruiert	112
Tabelle 5.4: Verwendete Klonierungsvektoren	114
Tabelle 5.5: Zur Verfügung gestellte Plasmide.....	114
Tabelle 5.6: Konstruierte Plasmide.....	116
Tabelle 5.7: Verwendete Oligonucleotide.....	121
Tabelle 5.8: Zusammensetzung der Trenngele für die SDS-PAGE	141

1 Zusammenfassung

Phospholipide wie Phosphatidylinositol und Phosphatidylcholin sind essenzielle Bestandteile aller biologischen Membranen und für deren Integrität und Funktion unerlässlich. Sind Inositol und Cholin (IC) im Medium vorhanden, ist die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* in der Lage, diese aufzunehmen und zu verarbeiten. Unter Mangelbedingungen können diese Stoffe von der Zelle selbst synthetisiert werden. Daher ist es sinnvoll, die Phospholipidbiosynthese-Gene differenziell zu exprimieren, was auf der Ebene der Transkriptionsinitiation geschieht. Bei IC-Mangel werden die Gene (z. B. das Inositol-3-Phosphat Synthase Gen *INO1*) durch Bindung des heterodimeren Aktivorkomplexes Ino2/Ino4 an das Promotorelement ICRE („inositol/ choline responsive element“) aktiviert, um die Biosynthese zu gewährleisten. Sowohl Ino2 als auch Ino4 sind für die ICRE-Bindung nötig, während die transkriptionale Aktivierung nur durch Ino2 mit Hilfe zweier Transkriptionsaktivierungsdomänen TAD1 und TAD2 vermittelt wird. Ist dagegen ausreichend IC vorhanden, werden die Gene reprimiert, indem der Repressor Opi1 an den Aktivator Ino2 bindet, sodass es zu einer Konformationsänderung kommt und eine Dimerisierung mit Ino4 nicht mehr möglich ist.

Um eine erfolgreiche Transkriptionsinitiation zu gewährleisten, bilden neben der RNA-Polymerase II eine Reihe genereller Transkriptionsfaktoren (A, B, D, E, F und H) sowie der Mediator-Komplex im Promotorbereich der Zielgene den sog. Präinitiationskomplex (PIC). Die von diesen basalen Faktoren gewährleistete geringe Grundexpression kann von Aktivatorproteinen, die an positiv-regulatorische Elemente („upstream activation site“, UAS) binden, deutlich verstärkt werden. Hierzu nutzen Aktivatorproteine verschiedene Mechanismen, zu denen die Auflockerung der Chromatinstruktur durch Histonmodifikationskomplexe wie SAGA oder Chromatinremodellierungskomplexe wie SWI/SNF, die bessere Bindung der Transkriptionsfaktoren am Basalpromotorbereich oder die Beschleunigung des Übergangs vom geschlossenen zum offenen PIC gehören.

Im Verlauf dieser Arbeit konnten zahlreiche Interaktionen zwischen dem Aktivator Ino2 und Faktoren der Transkriptionsmaschinerie nachgewiesen werden, die vermutlich die Häufigkeit der Transkriptionsinitiation beeinflussen. Einige der Untereinheiten des Transkriptionsfaktors TFIID interagieren mit Ino2. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Charakterisierung der Interaktion der Ino2-TAD1 mit Taf1 und Taf12. Der Austausch der Aminosäuren Asparaginsäure-20 und Phenylalanin-21 in Ino2 führte zu einem Interaktionsausfall mit beiden Tafs. In Taf1 konnten zwei basisch-hydrophobe Aminosäure-Bereiche (K206 Y207 und L208 L209 K210) innerhalb der minimalen Aktivatorbindedomäne 2 (ABD2) identifiziert werden, die kritisch für den Kontakt zum Aktivator sind. Es konnte ferner gezeigt werden, dass basische und hydrophobe Aminosäuren in Kombination für die Bindung an den Aktivator verantwortlich sind und dass der Austausch gegen Alanin (KY-AA) zu einem Abfall der Expression des *INO1*-Gens auf 44% führt. Darüber hinaus konnte der Bromodomänenfaktor Bdf1 als Interaktionspartner von Ino2 identifiziert werden. Bdf1 vervollständigt Hefe-Taf1, während Säuger-Taf1 selbst Bromodomänen zur Erkennung von Histonacetylierungen beinhaltet. Innerhalb der Taf12-Minimaldomäne sind die Aminosäuren K150 L151 R175 und L176 wesentlich für die Bindung an Ino2. Eine Teildeletion von Taf12, die unter anderem den Verlust dieser Aminosäuren zur Folge hat, führt zu einer auf 76% reduzierten *INO1*-Expression.

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der von Ino2 kontaktiert wird, ist TFIIA mit seinen Untereinheiten Toa1 und Toa2. Die Proteine kontaktieren beide TADs des Aktivators, allerdings konnten innerhalb der minimalen Interaktionsdomänen der Toa-Proteine keine für diese Interaktion verantwortliche Aminosäuren identifiziert werden. Veränderungen der Toa1-Sequenz hatten keinen phänotypischen Einfluss auf die Phospholipidbiosynthese, allerdings führten einige Veränderungen (RKRK-Motiv im AS-Bereich 253-259) zu letalen Folgen für das Wachstum der Zellen, weil die Bildung des TFIIA-TBP-TATA-Komplexes beeinträchtigt ist. Wahrscheinlich hat die Interaktion zwischen Ino2 und TFIIA eine verstärkende Wirkung auf die Transkriptionsinitiation der Phospholipidbiosynthese-Gene, indem die Interaktion zwischen TFIIA und TFIIID stabilisiert wird und TFIIA die interaktive Oberfläche am Promotor für Interaktionen mit anderen Proteinen vergrößert.

Die Verschiebung der Nucleosomen in Promotorbereichen durch Chromatinremodellierungskomplexe wie SWI/SNF ist ein weiterer Mechanismus der Transkriptionsaktivierung. In früheren Arbeiten wurde bereits die Interaktion zwischen Ino2, Aro80 bzw. Gal4 und der SWI/SNF ATPase-Untereinheit Swi2 beschrieben. Im Zuge dieser Arbeit konnte eine minimale Interaktionsdomäne im AS-Bereich 238-307 kartiert werden. Essenzielle Aminosäuren für die Bindung an Ino2 und andere Aktivatoren konnten nicht identifiziert werden.

Sug1 und Sug2 sind ATPasen der regulatorischen 19S-Untereinheit des 26S Proteasoms. Neben der Degradation fehlgefalteter polyubiquitinerter Proteine haben sie auch eine nicht-proteolytische Bedeutung für die Transkriptionsinitiation. Bekannt ist, dass proteasomale ATPasen an aktiven Promotoren zu finden sind und mit Aktivatorproteinen (z. B. Gal4) interagieren können. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass auch Ino2 von Sug1 und Sug2 kontaktiert wird. Möglicherweise dienen sie am *INO1*-Promotor als Stabilisatoren und Vermittler zwischen Ino2 und der Transkriptionsmaschinerie und erleichtern den Übergang des Präinitiationskomplexes in den Elongationskomplex.

Unter reprimierenden Bedingungen bindet Opi1 an Ino2 und rekrutiert die Corepressorkomplexe Sin3 und Cyc8/Tup1, die ihrerseits Histondeacetylasen in Promotornähe bringen und die Transkription durch lokale Chromatinverfestigung reprimieren. Frühere Arbeiten hatten gezeigt, dass die Corepressoren auch mit Ino2 und weiteren Aktivatoren (Hac1 und Pho4) interagieren und dass sie in Abhängigkeit von Ino2, nicht aber von Opi1, am *INO1*-Promotor vorliegen. In dieser Arbeit wurde die Interaktion zwischen Ino2 und Sin3 bzw. Cyc8 charakterisiert. Sin3 und Cyc8 kontaktieren einen Bereich des Aktivators, der die TAD2 und die RID (Repressorinteraktionsdomäne) enthält. Es war bekannt, dass die Aminosäuren Phenylalanin-130, Leucin-131 und Asparaginsäure-132 essenziell für die Interaktion mit Opi1 sind. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass deren Austausch gegen Alanin auch einen Interaktionsverlust mit Cyc8 und Sin3 bewirkt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass diese FLD-AAA-Mutation zu einer praktisch konstitutiven Expression des *INO1*-Gens führt, allerdings auf niedrigerem Niveau als im Fall dereprimierter Zellen mit einem Wildtyp Ino2. In Hac1 und Pho4 konnten Aminosäuren mit vergleichbarer Bedeutung für die Corepressorbindung nicht identifiziert werden. Offenbar können die Corepressoren je nach physiologischer Situation in der Zelle positiv oder negativ auf die Transkriptionsinitiation wirken.

1.1 Summary

Phospholipids such as phosphatidylinositol and phosphatidylcholine are essential components of all biological membranes and are essential for their integrity and function. If inositol and choline (IC) are present in the medium, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is able to import them for subsequent biochemical use. In the absence of precursors, these substances can be synthesized by the cell. Thus, it is reasonable to differentially express phospholipid biosynthetic genes at the level of transcriptional initiation. Under conditions of IC limitation, genes (such as the inositol-3-phosphate synthase gene *INO1*) are activated by binding of the heterodimeric activator complex Ino2/Ino4 to the promoter element ICRE (“inositol/choline responsive element”) to ensure biosynthesis. Ino2 as well as Ino4 are required for ICRE binding while transcriptional activation is mediated exclusively by Ino2 via two transcriptional activation domains, TAD1 and TAD2. In the presence of high concentrations of IC, the genes are repressed by repressor Opi1 which binds to activator Ino2, triggering a conformational change so that dimerization with Ino4 is no longer possible.

To ensure transcriptional initiation, RNA polymerase II together with a number of general transcription factors (A, B, D, E, F and H) as well as the mediator complex forms the preinitiation complex (PIC) in the promoter region of the target genes. These basal factors ensure a low level of gene expression which can be increased substantially by binding of activator proteins to “upstream activation sites” (UAS). To achieve this, activators can use various mechanisms, including structural changes of chromatin by histone modification complexes such as SAGA or chromatin remodelling by complexes such as SWI/SNF, the improved binding of transcription factors at the basal promoter or acceleration of the transition from closed to open PIC.

In this work, numerous interactions between the activator Ino2 and factors of the transcriptional machinery have been demonstrated which presumably influence the frequency of transcriptional initiation. Some of the subunits of the transcription factor TFIID interact with Ino2. This work focused on the characterization of the interaction of Ino2-TAD1 with Taf1 and Taf12. The exchange of the amino acids aspartic acid-20 and phenylalanine-21 in Ino2 abolished interaction with both Tafs. In Taf1, two basic-hydrophobic amino acid regions (K206 Y207 and L208 L209 K210) within its minimal activator binding domain 2 (ABD2) were identified which are critical for activator contact. In addition, it could be shown that basic and hydrophobic amino acids in combination are responsible for binding to the activator and that the exchange to alanine (KY-AA) decreased expression of the *INO1* gene to 44%. Furthermore, the bromodomain factor Bdf1 could be identified as an interaction partner of Ino2. Bdf1 completes yeast Taf1, while mammalian Taf1 itself contains bromodomains for the detection of histone acetylations. Within the Taf12 minimal domain, amino acids K150 L151 R175 and L176 are important for binding to Ino2. A partial deletion of Taf12 resulting in the loss of these amino acids leads to a reduction of *INO1* expression to 76%.

Another transcription factor contacted by Ino2 is TFIIA with its subunits Toa1 and Toa2. The proteins contact both TADs of the activator, but no individual amino acids important for this interaction could be identified within minimal interaction domains of the Toa proteins. Mutations of the Toa1 sequence did not have a phenotypic influence on phospholipid biosynthesis, but some alterations (RKRK-motif

at AA 253-259) had lethal consequences for cell growth because formation of the TFIIA-TBP-TATA complex was affected. Presumably, interaction between Ino2 and TFIIA has an enhancing effect on transcriptional initiation of the phospholipid biosynthetic genes by stabilizing the interaction between TFIIA and TFIID and the increase of the interactive surface area at the promoter for interactions with other proteins.

The displacement of nucleosomes in promoter regions by chromatin remodeling complexes such as SWI/SNF is another mechanism of transcriptional regulation. Previous work has already described the interaction between Ino2, Aro80 or Gal4 and the SWI/SNF ATPase subunit Swi2. In this work, a minimal interaction domain (aa 238-307) could be mapped. Amino acids essential for binding to Ino2 and other activators could not be identified.

Sug1 and Sug2 are ATPases of the regulatory 19S subunit of the 26S proteasome. In addition to the degradation of misfolded polyubiquitinated proteins, they also have a non-proteolytic role for transcription initiation. It is known that proteasomal ATPases are found at active promoters and that they can interact with activator proteins (e. g. Gal4). The present work shows that Ino2 is also contacted by Sug1 and Sug2. Presumably, they serve as a stabilizer and mediator between Ino2 and the transcription machinery at the *INO1* promoter and facilitate the transition from the preinitiation complex to the elongation complex.

Under repressing conditions, Opi1 binds to Ino2 and recruits the corepressor complexes Sin3 and Cyc8/Tup1, which in turn bring histone deacetylases near the promoter and repress transcription by local chromatin condensation. Previous work had shown that these corepressors interact with Ino2 and other activators (Hac1 and Pho4) and that they are present at the *INO1* promoter in dependence of Ino2 but not of Opi1. In this thesis, the interaction between Ino2 and Sin3 or Cyc8 was characterized. Sin3 and Cyc8 contact a region of the activator containing the TAD2 and the RID (repressor interaction domain). It is known that amino acids phenylalanine-130, leucine-131 and aspartic acid-132 are essential for the interaction with Opi1. In this work it was shown that their exchange to alanine also causes a loss of interaction with Cyc8 and Sin3. Furthermore, it could be shown that an FLD-AAA mutation leads to almost constitutive expression of the *INO1* gene, but at a level below that of derepressed cells with a wild-type Ino2. In Hac1 and Pho4, amino acids comparably important for interaction with corepressors could not be identified. Apparently, depending on the physiological situation in the cell, corepressors can have a positive or a negative effect on transcription initiation

2 Einleitung

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* findet Anwendung als Bier-, Back- und Weinhefe und konnte sich in den letzten Jahrzehnten als Modellorganismus für molekular- und zellbiologische Fragestellungen etablieren. Hierfür eignet sich *S. cerevisiae* hervorragend, da die zellbiologischen Merkmale der Eukaryoten mit Eigenschaften der Mikroorganismen verbunden werden. Die Hefe lässt sich leicht kultivieren, hat kurze Generationszeiten, kann leicht transformiert werden und es gibt die Möglichkeit der Einführung gezielter Veränderungen in bestimmte Gene durch homologe Rekombination (Rothstein *et al.*, 1991). Außerdem kann die Hefe mit haploidem oder diploidem Chromosomensatz vorkommen, was die Konstruktion von Mutanten erleichtert. Ein weiterer Vorteil der Hefe *S. cerevisiae* ist die Verfügbarkeit mehrerer Selektionsmarker für genetische und molekularbiologische Untersuchungen. Gewonnene Erkenntnisse über grundlegende Vorgänge, wie die Regulation der Genexpression, die Steuerung des Zellzyklus oder viele Stoffwechselprozesse können aufgrund von Homologien zwischen Hefe-Genen und Genen höherer Eukaryoten bis hin zum Menschen übertragen werden.

Auf pro- und eukaryotische Zellen wirken variierende Umwelteinflüsse und sich ändernde physiologische Bedingungen ein, an die sie sich stets neu anpassen müssen. Durch Veränderungen der Genexpression werden bestimmte Strukturproteine und Enzyme vermehrt in der Zelle gebildet, während die Synthese anderer Proteine gehemmt wird. Die Genexpression kann auf verschiedenen Ebenen kontrolliert werden (z. B. transkriptional, posttranskriptional oder translational), wobei die transkriptionale Regulation durch variierende Zugänglichkeit des Chromatins der Gene für die Transkriptionsmaschinerie oder differentielle Häufigkeit der Transkriptionsinitiation erfolgen kann.

2.1 Regulation der Transkription in Eukaryoten

Die Transkriptionsinitiation ist ein mehrstufiger Prozess, bei dem neben der RNA-Polymerase II eine Reihe genereller Transkriptionsfaktoren (A, B, D, E, F und H) sowie der Mediatorkomplex erforderlich sind (Woychik und Hampsey, 2002; Hahn und Young, 2011). Diese finden sich im Promotorbereich der Zielgene ein und formieren den sog. Präinitiationskomplex (PIC) im Bereich des Startpunktes der Transkription. Ort und Richtung der RNA-Synthese werden mit Hilfe regulatorischer und Kernpromotor-Elemente festgelegt. Zu diesen sog. *cis*-Elementen des Kernpromotors gehören die TATA-Box, an welche das TATA-Box-Bindeprotein (TBP) bindet und der Initiator (Inr), welcher mit Hilfe der TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) den genauen Startpunkt der Transkription festlegt. Diese basalen Elemente gewährleisten eine geringe Grundexpression.

Um diese zu verstärken, gibt es, wie schon erwähnt, positiv-regulatorische Elemente. Diese liegen „upstream“ des Promotors und werden dementsprechend „upstream activation site“ (UAS) (Hampsey, 1998) genannt. Hier erfolgt die Bindung von Aktivatorproteinen, welche durch verschiedene Mechanismen zu einer deutlich gesteigerten Genexpression führen. Hierzu zählen die

- Auflockerung der Chromatinstruktur durch Histonmodifikationskomplexe wie SAGA (Grant *et al.*, 1997) oder Chromatinremodellierungskomplexe wie SWI/SNF (Lin *et al.*, 2020);

- bessere Bindung des Transkriptionsfaktors TFIID am Basalpromotorbereich oder
- Beschleunigung des Übergangs vom geschlossenen zum offenen PIC.

Ebenso gibt es negativ-regulatorische Elemente, sog. „upstream repression sites“ (URS) (Hampsey, 1998), an die Repressoren binden und die Genexpression vermindern bzw. verhindern. Auch die Repression wird durch verschiedene Mechanismen erreicht, so zum Beispiel durch

- Hemmung der Bindung von Aktivatoren an deren UAS-Elemente;
- Blockade von Transkriptionsaktivierungsdomänen (TADs) innerhalb dieser Proteine oder
- Inhibition der Synthese aktivierender Proteine.

Ebenso führt die Rekrutierung von Proteinkomplexen wie Sin3/Rpd3 (Kadosh und Struhl, 1997) oder Cyc8/Tup1 (Smith und Johnson, 2000) zur Verdichtung der Chromatinstruktur im Promotorbereich, sodass dieser für die Transkriptionsmaschinerie unzugänglich gemacht wird.

2.2 Aktivatorproteine in der Hefe *S. cerevisiae*

Eukaryotische Aktivatoren enthalten mehrere funktionelle Domänen: eine Kernlokalisierungssequenz (NLS), welche den Kernimport ermöglicht, eine DNA-Bindedomäne (DBD), wodurch die Bindung an regulatorische Elemente (UAS) ermöglicht wird und Transkriptionsaktivierungsdomänen (TAD), die die aktivierende Wirkung des Proteins vermittelt (Kadonaga, 2004). Daneben enthalten Aktivatoren häufig weitere regulatorische oder Dimerisierungsdomänen, denn oft sind sie nur als Homo- oder Heterodimer oder in kleineren Komplexen funktional. In diesem Fall ist es möglich, dass einzelne dieser Domänen fehlen, weil deren Rolle von Bindepartnern übernommen wird.

Die DBDs besitzen meist ein festes Sequenz- oder Strukturmuster, anhand dessen sie in verschiedene Familien eingeteilt werden können. Zu nennen sind Zinkfingerproteine, deren DBDs Zink komplexieren können. Zinkfingerdomänen innerhalb der Proteine bestehen aus ca. 30 AS langen Sequenzen, die sich um das zentrale Zink-Ion falten und im Inneren je zwei konservierte Cystein- und Histidinreste (Klasse I) oder vier Cysteinreste (Klasse II) enthalten (Klug und Schwabe, 1995). In *S. cerevisiae* gibt es 50 verschiedene Zinkfingerproteine, die nochmals in Subfamilien eingeteilt werden (Böhm *et al.*, 1997). Ein Beispiel sind die Zinkcluster-Proteine der Gal4-Familie, welche nur in Pilzen existieren. Die DBD befindet sich meist am N-Terminus des Proteins (Schjerling und Holmberg, 1996) und enthält ein Zn_2C_6 -Motiv (sechs Cysteinreste binden 2 Zinkionen) mit der Konsensussequenz $CysX_2CysX_6CysX_{5-12}CysX_2CysX_{6-8}Cys$. Diese sogenannten C6 Zinkcluster-Proteine agieren als systemspezifische Regulatoren, die in Stoffwechselwege wie die Kohlenstoffverwertung, die Atmung oder den Aminosäuremetabolismus involviert sind (Zhang *et al.*, 2019). Zu den Zinkclusterproteinen zählt zum Beispiel Gal4, der wohl am besten untersuchte Aktivator in der Hefe. Er ist zuständig für die Aktivierung der Gene der Galaktoseverwertung (Lohr *et al.*, 1995). Ebenfalls zu nennen sind Aro80, ein Aktivator für Gene zur Verwertung aromatischer Aminosäuren (Iraqi *et al.*, 1999) und Leu3, welcher die Synthese verzweigtkettiger Aminosäuren aktiviert (Friden und Schimmel, 1988).

Sogenannte basische Leucinzipper-Module vermitteln sowohl die Dimerisierung von Proteinen sowie die nachfolgende Bindung von DNA. Diese Domänen bestehen aus α -helicalen Heptad-Modulen, in

denen Leucin-Reste in regelmäßigen Abständen vorkommen. Durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Leucin-Resten kommt es zur Homo- oder Heterodimerbildung über eine „coiled-coil“-Struktur (Landschulz *et al.*, 1988).

DBDs mit basischen Helix-Loop-Helix-Motiven dienen zum einen der Dimerisierung durch die Zusammenlagerung der Helix-Loop-Helix-Motive zu einem Vier-Helix-Bündel. Dadurch werden die basischen Domänen in räumliche Nähe zueinander gebracht und können DNA-Sequenzen mit der Konsensussequenz 5'-CANNTG-3' erkennen und binden (Robinson und Lopes, 2000). Ein Beispiel für Aktivatoren mit diesem bHLH-Motiv ist der Ino2/Ino4-Komplex. Er ist nur als Heterodimer funktional, denn Ino4 besitzt neben der bHLH-Domäne eine Kernlokalisierungssequenz (NLS) für den Kernimport, während Ino2 neben dem bHLH-Motiv zwei N-Terminale TADs besitzt, durch welche die Genaktivierung vermittelt wird (Kumme *et al.*, 2008; Schwank *et al.*, 1995).

Neben den hier beschriebenen DBDs gibt es in Hefe Aktivatoren mit weiteren Domänen, wie Helix-Turn-Helix oder Homöo-Domänen. Weiterhin sind HMG1-, Myb-ähnliche und Forkhead-ähnliche Domänen zu nennen, welche die DNA-Bindung vermitteln.

Die TADs vermitteln Interaktionen zwischen Proteinen, wobei Aktivatoren Kontakt zu generellen Transkriptionsfaktoren, wie TFIIA, TFIID oder TFIIB oder dem Mediatorkomplex aufnehmen können. In Folge dessen wird der Übergang vom geschlossenen zum offenen Präinitiationskomplex unterstützt und die Initiation der Transkription vorangetrieben. Ebenso kann Kontakt zu Chromatinremodellierungskomplexen (z. B. SWI/SNF) und Histonmodifizierungskomplexen (z. B. SAGA) aufgenommen werden, wodurch die Chromatinstruktur im Zielpromotorbereich aufgelockert und für die Transkriptionsmaschinerie zugänglich gemacht wird.

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass für die Zusammensetzung der Transkriptionsmaschinerie eine Reihe spezifischer, vorübergehender Interaktionen mit multiplen Proteinen unterschiedlicher Architektur erforderlich sind. Generell gilt die definierte Struktur eines Proteins als Voraussetzung für dessen Funktionalität. Dies kann ebenso durch kurze Erkennungssequenzen gewährleistet werden, die in einer formbaren Umgebung liegen, welche in der Lage ist, verschiedene Strukturen anzunehmen. Diese sogenannten IDRs („intrinsically disordered regions“) sind etwa 30 AS lange Bereiche, die in mehr als der Hälfte aller eukaryotischen Proteine vorkommen. Sie agieren als „Linker“ zwischen verschiedenen Proteindomänen und können eine enorme strukturelle Flexibilität für einen Proteinkomplex darstellen. So kann die Zusammensetzung von Proteinkomplexen entsprechend der Anforderungen für die Zelle erleichtert werden (z. B. Mediator). Die meisten an der Transkriptionsregulation beteiligten Proteine beinhalten IDRs, um die benötigte strukturelle und funktionelle Flexibilität zu gewährleisten, die nötig ist, um zahlreiche vorübergehende hochspezifische Interaktionen zu koordinieren. Etwa 90% aller Transkriptionsaktivierungsdomänen enthalten IDRs (zusammengefasst in Fuxreiter *et al.*, 2008). Aktivierungsdomänen sind im Gegensatz zu DBDs weniger konserviert, unstrukturierter, weniger anfällig gegenüber Mutationen und können an unterschiedlichste Coaktivatoren binden. Aufgrund der Diversität der TADs ist es schwer, diese in funktionelle bzw. strukturelle Klassen einzuteilen. Allerdings gibt es die sog. sauren TADs (z. B. in Gal4, Gcn4, VP16 und Ino2), die zahlreiche saure Bereiche mit hydrophoben Aminosäuren beinhalten. Mutationsanalysen zeigten, dass ein Austausch hydrophober Aminosäuren gegen Alanin einen

größeren Effekt auf die Aktivität der Aktivierungsdomänen hat als eine Veränderung der sauren Bereiche (am Beispiel der VP16-TAD: Sullivan *et al.*, 1998). Tatsächlich bilden saure Aminosäuren unstrukturierte Domänen, die erst bei Kontakt mit Coaktivatoren eine α -Helix bilden, während durch diese Konformationsänderung hydrophobe (meist aromatische) Aminosäuren zugänglicher für die Bindung an Coaktivatoren gemacht werden. Ein Grund für das Vorhandensein unterschiedlich geladener Aminosäuren innerhalb der ADs in diversen Transkriptionsaktivatoren ist die biphasische Bindung an Coaktivatoren. Die primäre Bindung wird durch die negative Ladung saurer Aminosäuren vermittelt, während die darauffolgende langsame (zumeist multiple) Bindung zwischen hydrophoben Aminosäuren eine sehr hohe Affinität aufweist. Tatsächlich führt das Einfügen von Alanin in saure Bereiche sogar zu einer gesteigerten Strukturierung, was eine erhöhte Aktivität der Aktivatoren zur Folge haben kann. Der Austausch einer sauren Aminosäure gegen ein helixbrechendes Prolin hat nur geringen Einfluss, was für die untergeordnete Rolle der sauren Aminosäuren und der Bildung einer α -Helix spricht (zusammengefasst in Staller *et al.*, 2018). Durch diesen Mechanismus wird eine Variabilität geschaffen, die erlaubt, dass Aktivierungsdomänen unter verschiedenen zellulären Bedingungen an unterschiedlichen Genen präsent sind und verschiedene Faktoren der Transkriptionsmaschinerie kontaktieren und so eine effiziente Transkriptionsregulation gewährleisten. Beispielsweise besitzt Gcn4 Aktivierungsdomänen, die vier verschiedene Strukturdomänen in der Mediatoruntereinheit Med15 kontaktieren können (Erijman *et al.*, 2020). Da die Art der Aminosäuren für die Funktion der Aktivierungsdomänen von höherer Bedeutung als die Primärsequenz ist, konnten bislang keine speziellen Sequenzen identifiziert werden. Erijman *et al.* (2018) haben mit Hilfe eines Hochdurchsatzverfahrens zahlreiche synthetische Aktivierungsdomänen generiert und konnten somit diverse aktivierende Sequenzen hinsichtlich ihrer Funktion charakterisieren. Darüber hinaus gelangten sie zu der Erkenntnis, dass wirksame TADs 9 oder mehr AS besitzen, so wie bereits zuvor für den Aktivator Gal4 beschrieben (Piskacek *et al.*, 2016).

2.3 Regulation der Phospholipid-Biosynthese in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Phospholipide wie Phosphatidylcholin und Phosphatidylinositol sind essenzielle Bestandteile aller biologischen Membranen und für deren Integrität und Funktion unerlässlich. Sie bestehen aus einem hydrophilen Kopf aus Inositol oder Cholin und hydrophoben Bestandteilen (gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren), welche die Schwanz-Struktur darstellen. Sind Inositol und Cholin als Phospholipidvorstufen im Medium vorhanden, ist die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* in der Lage, diese über spezifische Membrantransporter aufzunehmen und in Phospholipide einzubauen. Unter Mangelbedingungen ist es der Hefe durchaus auch möglich, diese Stoffe selbst zu synthetisieren (Greenberg und Lopes, 1996). Daher ist es sinnvoll, die Phospholipid-Biosynthesegene differenziell zu exprimieren. Sind ausreichend Inositol und Cholin (im Folgenden als IC bezeichnet) vorhanden, werden diese Gene reprimiert, während sie bei IC-Mangel aktiviert werden, um die Biosynthese zu gewährleisten (Henry und Patton-Vogt, 1998; Santiago und Mamoun, 2003; Jesch *et al.*, 2005). Dabei katalysiert das vom Gen *INO1* codierte Enzym Inositol-3-phosphat Synthase die Isomerisierung von Glucose-6-phosphat zu Inositol-3-phosphat (Lopes *et al.*, 1991). Dieses und weitere Gene unterliegen einer starken Regulation auf Ebene der Transkriptionsinitiation. Dabei handelt es sich unter anderem

um die Gene *CHO1/PSS1* bzw. *PEM1/CHO2* und *PEM2/OPI3* für die Enzyme Phosphatidylserin Synthase bzw. zwei Methyltransferasen, die zur Synthese von Phosphatidylserin, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin erforderlich sind (Bailis *et al.*, 1992; Kodaki *et al.*, 1991). Zu nennen sind auch die Gene *FAS1* und *FAS2* für die Fettsäure Synthase (Schüller *et al.*, 1992a) und *ACC1* (Acetyl-CoA Carboxylase, Hasslacher *et al.*, 1993) sowie *ACS2* (Acetyl-CoA Synthase, Hiesinger *et al.*, 1997).

All diese Gene werden über das Promotorelement ICRE („inositol/choline responsive element“, Schüller *et al.*, 1992a) reguliert. Dieses *cis*-wirkende UAS-Element besitzt eine 11 Basenpaar lange Konsensussequenz WYTTCAVRTGS (Schüller *et al.*, 1995), an die der heterodimere Aktivatorkomplex Ino2/Ino4 im Falle der Genaktivierung bindet (Ambroziak und Henry, 1994; Schwank *et al.*, 1995). Ino2 und Ino4 treten durch ein sog. bHLH-Motiv (basisches Helix-Loop-Helix-Motiv, Hoshizaki *et al.*, 1990; Nikoloff *et al.*, 1992) in Kontakt. Das ist notwendig, um die Genaktivierung zu gewährleisten, denn nur im Komplex sind sie funktionell und können an die im ICRE-Motiv befindliche E-Box (CANNTG, Blackwell und Weintraub, 1990) binden.

2.3.1 Der heterodimere Aktivator Ino2/Ino4 und der Repressor Opi1

Ino4 ist mit 151 Aminosäuren nur halb so groß wie Ino2 und besitzt neben dem bHLH-Motiv eine Kernlokalisierungssequenz (NLS) und ist somit für den Kernimport zuständig (Kumme *et al.*, 2008). Ino2 (304 AS) enthält neben der im C-Terminus lokalisierten bHLH-Domäne zwei separate N-terminale Transkriptionsaktivierungsdomänen (Schwank *et al.*, 1995). Die TAD1 befindet sich im AS-Bereich 1-35 und zeigte bei Reporter-gen-Analysen eine starke Aktivierungsleistung, während die schwächere TAD2 den AS-Bereich 101-135 umfasst (Dietz *et al.*, 2003). Mutagenesestudien der effizienten TAD1 zeigten, dass einige saure und hydrophobe Aminosäuren (z. B. D21 und F22) von zentraler Bedeutung für die Genaktivierung sind; ein Austausch gegen basische Aminosäuren führte zu einem praktisch vollständigen Funktionsverlust.

Die aktivierende Leistung wird durch Kontakt mit generellen Transkriptionsfaktoren vermittelt. Die bHLH-Domäne kontaktiert TFIIB (Dietz *et al.*, 2003) und die Histon Methyltransferase Set2 (Dettmann *et al.*, 2010), während die TADs Kontakt zu mehreren TAF-Untereinheiten des Transkriptionsfaktors TFIID aufnehmen (Hintze *et al.*, 2017) und somit die Bildung des Präinitiationskomplexes (PIC) erleichtert wird. Außerdem werden die Proteinkomplexe SAGA (Spt/Ada/Gcn5-Acetyltransferase; Dietz *et al.*, 2003) und der Mediator durch Ino2 kontaktiert, wenn auch nur indirekt, z. B. über die Proteinkinase Snf1 (Lo *et al.*, 2005). SAGA führt durch seine Histon-Acetyltransferase-Aktivität zur Auflockerung des Chromatins im Promotorbereich, sodass der PIC leichter zugänglich ist, während der Mediator Kontakt zur RNA-Polymerase II herstellt.

Neben den TADs besitzt Ino2 eine Repressor-Interaktions-Domäne (RID) im AS-Bereich 118-135 (Heyken *et al.*, 2005). An diese bindet der Repressor Opi1 („overproducer of inositol“) unter IC-reprimierenden Bedingungen (genügend Inositol und Cholin sind vorhanden). Durch diese Bindung kommt es vermutlich zu einer Konformationsänderung von Ino2, sodass eine Dimerisierung mit Ino4 nicht mehr möglich und die Transkription ICRE-abhängiger Gene reprimiert ist (Kumme *et al.*, 2008). Neben einer Aktivator-Bindedomäne (AID, AS 321-380) zur Wechselwirkung mit der RID von Ino2

besitzt Opi1 eine Sin3-Interaktionsdomäne (OSID, AS 44-105), die die Corepressoren Sin3 und Cyc8 kontaktiert (Wagner *et al.*, 2001; Jäschke *et al.*, 2011). Dadurch werden die Corepressorkomplexe Sin3/Rpd3 und Cyc8-Tup1 an Promotoren der Phospholipid-Biosynthesegene rekrutiert und verfestigen mit Hilfe ihrer Histon-Deacetylase-Aktivität das Chromatin im Promotorbereich und reprimieren somit die Transkription. Die AID wird von glutaminreichen Sequenzen flankiert (White *et al.*, 1991), deren Funktion vermutlich die Separation der AID ist, denn eine Deletion der N-terminalen glutaminreichen Domäne (Q) führte zu einer defekten Opi1-Variante (Wagner *et al.*, 1999). Ein weiteres Strukturmotiv innerhalb von Opi1 ist der basische Leucinzipper (bZIP, AS 139-160), der aber keine bekannte Bindung an eine DNA-Sequenz vermittelt. Dennoch ist diese Domäne essenziell für die Repressorleistung von Opi1, denn ein Aminosäureaustausch von Leucin zu Alanin an AS-Stelle 160 führte zu einer verringerten Interaktion mit Ino2 (Wagner *et al.*, 1999; 2001). Der basische Teil dieses Sequenzmotivs ist für die Bindung an Phosphatidsäure wichtig (s. u.; Loewen *et al.*, 2004).

Opi1 befindet sich nur unter reprimierenden Bedingungen im Zellkern, unter dereprimierenden Bedingungen (IC-Mangel) kommt es zur Akkumulation von Phosphatidsäure (PA), welche als Vorstufe zur Phospholipid-Biosynthese benötigt wird. PA bindet an Opi1, sodass es zu einer Konformationsänderung kommt und der Repressor über sein FFAT-Motiv („two phenylalanines in an acidic tract“, AS 200-206) an das ER-ständige Protein Scs2 bindet (Loewen *et al.*, 2003). Sind Inositol und Cholin dagegen vorhanden, werden diese mit PA zu Phosphatidylinositol bzw. -cholin umgesetzt, sodass die PA-Konzentration sinkt und das freigesetzte Opi1 in den Zellkern gelangen kann, wodurch es zur Genrepression kommt (Loewen *et al.*, 2004).



Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Aktivators Ino2. Transkriptionsaktivierungsdomänen (TAD1, AS 1-35; TAD2 AS 101-135), Repressorinteraktionsdomäne (RID, AS 118-135), basisches Helix-Loop Helix-Motiv (bHLH, AS 230-304).

2.4 Generelle Transkriptionsfaktoren

Voraussetzung für eine erfolgreiche Transkriptionsinitiation ist der Zusammenbau des Präinitiationskomplexes (PIC). Dieser legt den Start und die Richtung der Transkription fest, stabilisiert die RNA-Polymerase II, führt zur Entwindung der DNA-Matrize und stellt Kontakt zu Aktivatorproteinen her. Der PIC besteht in Eukaryoten aus etwa 50 Proteinen, die in verschiedenen basalen Transkriptionsfaktoren enthalten sind.

2.4.1 Der TFIID-Komplex

Der erste Schritt im Zusammenbau des PIC ist die Bindung des basalen Transkriptionsfaktors TFIID im Promotorbereich RNA-Polymerase II-abhängiger Gene. Zunächst wurde TFIID in Säugerzellen und in *Drosophila* beschrieben (Brou *et al.*, 1993; Dynlacht *et al.*, 1991; Kokubo *et al.*, 1993), später dann auch in *S. cerevisiae* nachgewiesen (Poon und Weil, 1993; Reese *et al.*, 1994; Moqtaderi *et al.*, 1996). In Hefe sind neben dem TATA-bindenden Protein TBP (Spt15) 14 TBP-assoziierte Faktoren (Taf1-14; Nomenklatur nach Tora, 2002) enthalten. Einige Taf-Proteine kommen zusätzlich auch im Histon-acetyltransferase-Komplex SAGA vor (zusammengefasst in Cler *et al.*, 2009). In höheren Eukaryoten gibt es mehrere TFIID-Varianten mit unterschiedlicher Zusammensetzung (Freiman, 2009; Müller *et al.*, 2010). Anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen zeigte sich eine asymmetrische, dreifach gelappte Struktur des Proteinkomplexes (Brand *et al.*, 1999). Diese „Lappen“ können ihre Position so verändern, dass der Komplex eine offene oder geschlossene Konformation annimmt (Grob *et al.*, 2006). Einige Tafs kommen in zweifacher Ausführung im Proteinkomplex vor (Sanders *et al.*, 2002), sie bilden untereinander Heterodimere und bilden zusammen mit Taf5 den Kern-Komplex von TFIID. Hierbei handelt es sich um die Taf-Dimere Taf3-Taf10, Taf4-Taf12, Taf6-Taf9, Taf8-Taf10 und Taf11-Taf13. Diese Tafs besitzen eine sogenannte „histone fold domain“ (HFD), ein Sequenzmotiv, welches die Dimerisierung der Tafs ermöglicht und zur Entstehung einer Histon-ähnlichen Struktur führt (Gangloff *et al.*, 2001). Taf1, Taf2, Taf7 und TBP liegen jeweils nur in einer Kopie vor und bilden einen Subkomplex von TFIID (Sanders *et al.*, 2002).

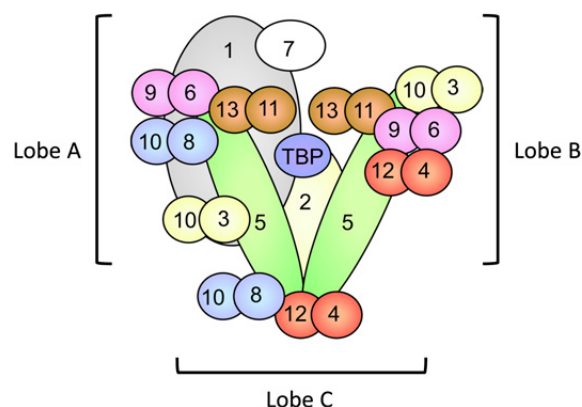


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des TFIID-Komplexes. Dargestellt ist die dreifach gelappte Struktur (Lobe A, B und C) des Komplexes mit dem Kernkomplex aus zwei Taf5-Kopien sowie den HFD-Dimeren Taf3-Taf10, Taf4-Taf12, Taf6-Taf9, Taf8-Taf10 und Taf11-Taf13 sowie dem Subkomplex aus Taf1, Taf2, Taf7 und TBP. Taf14 ist nicht dargestellt. Abbildung nach Hahn und Young, 2011.

TBP (ca. 27 kDa) bindet an die TATA-Box mit der Konsensussequenz TATAWAWR (W=A oder T; R=A oder G; Basehoar *et al.*, 2004) oder an TATA-ähnliche Sequenzen (Blair *et al.*, 2012) und ist genomweit an den meisten Promotoren lokalisiert (Rhee und Pugh, 2012). Die Bindung von TBP an die DNA-Matrize erfolgt durch die sattelartige Struktur des Proteins über die kleine Furche der DNA und führt zu einer Biegung der DNA um ca. 90 ° (Kim *et al.*, 1993). Der konkave Teil des Sattels wird durch zwei 80 Aminosäuren lange Abschnitte gebildet, die die hochkonservierte Kerndomäne im C-Terminus des Proteins bilden. Diese bilden je fünf β -Faltblätter, die an die DNA-Sequenz binden. Die darüber liegende konvexe Oberfläche besteht aus einer α -Helix und ist für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich. Zwischen zwei Faltblättern befindet sich eine weitere α -Helix, welche eine Art „Steigbügel“ bildet (Nikolov und Burley, 1997).

Die *TAF* Gene sind in Hefe essenziell und an der Expression von über 80% der Protein-codierenden Gene beteiligt (Kuras *et al.*, 2000; Huisinga und Pugh, 2004). Neben TBP sind auch einige Taf-Proteine in der Lage, mit der DNA zu interagieren. Ein Dimer aus Taf1 und Taf2 bindet an den Initiator, der den Startpunkt der Transkription festlegt (Chalkley und Verrijzer, 1999). In höheren Eukaryoten bindet das Dimer aus Taf6 und Taf9 an die Sequenzmotive DPE („downstream promoter element“) und MTE („Motif ten element“; Burke und Kadonaga, 1997; Theisen *et al.*, 2010).

Taf1 in *S. cerevisiae* ist mit ca. 120 kDa die zweitgrößte Untereinheit von TFIID und hat eine besondere Bedeutung für die Funktion des Transkriptionsfaktors. Darauf weisen die verschiedenen funktionellen Domänen im Protein hin. Die eben erwähnte Initiator-Bindung in Kombination mit Taf2 erfolgt mit Hilfe des HMG-Motivs („high mobility group“) im C-Terminus des Proteins. Für die Interaktion mit TBP dienen die sogenannten TAND-Motive 1-3 („Taf-N-terminal domains“; Kotani *et al.*, 1998), wodurch dessen Bindung an die Promotor-DNA verhindert wird (Kokubo *et al.*, 1994). Wechselwirkungen mit anderen Taf-Proteinen erfolgt über die Taf-Taf-Interaktionsdomäne, die sich an die TAND-Motive anschließt (Bai *et al.*, 1997). Im Zentrum des Proteins wurde eine Histonacetyltransferase-Domäne beschrieben, die *in vitro* für die Acetylierung der Histone H3 und H4 zuständig ist (Mizzen *et al.*, 1996). Unklar ist jedoch, ob dieser Vorgang tatsächlich in der Zelle stattfindet. Durch Interaktionen zwischen Taf1 und spezifischen Aktivatorproteinen wie z. B. Adr1 (Komarnitsky *et al.*, 1998), Gcn4 (Drysdale *et al.*, 1998), Rap1 (Garbett *et al.*, 2007) und Ino2 (Hintze *et al.*, 2017) kommt es zur Rekrutierung von TFIID zu den Zielpromotoren und somit zur Erhöhung der Wahrscheinlichkeit der Transkriptionsinitiation.

In höheren Eukaryoten ist Taf1 wesentlich größer und enthält zwei Bromo-Domänen, die Histonacetylierungen erkennen können und somit eine weitere Möglichkeit zur Rekrutierung von TFIID an Promotorbereiche bieten (Jacobsen *et al.*, 2000). Außerdem gibt es jeweils eine Proteinkinase-Domäne im N- bzw. C-Terminus von Taf1 (Dikstein *et al.*, 1996; O'Brien und Tijan, 1998). Matangkasombut *et al.* (2000) beschrieben in *S. cerevisiae* zwei Proteine, Bdf1 und Bdf2, die jeweils zwei Bromodomänen enthalten und Einfluss auf die Transkription und die Chromatinmodifizierung haben. Die Bromodomänen erkennen acetylierte Histone, vorwiegend in den Histonen H3 und H4, was zu einer Rekrutierung des Chromatinremodellierungskomplex SWR1 zu Zielpromotoren und der

Auflockerung der Nucleosomenstruktur im Promotorbereich führt. Zunächst wurden die Bromodomänenfaktoren als Interaktionspartner von Taf7 identifiziert, und eine Deletion von Bdf1 bzw. der Bdf-Interaktionsdomäne in Taf7 führte zu Defekten bei der Genexpression. Bdf1 und Bdf2 sind genetisch redundant, das Vorhandensein eines der beiden Gene ist essenziell für das Überleben der Zelle. Scheinbar ist Bdf1 jedoch das wichtigere der beiden Proteine, da eine $\Delta bdf1$ -Nullmutante sensitiv gegenüber Salzstress ist, während eine $\Delta bdf2$ -Nullmutante keinen Effekt auf das Wachstum der Zelle unter Salzstress zeigt. Eine Überexpression von Bdf2 kann das Fehlen von Bdf1 jedoch ausgleichen. Darüber hinaus kann Bdf1 die Expression von Bdf2 durch Bindung an dessen Promotor negativ beeinflussen, während Bdf2 keinen Einfluss auf die Bdf1-Expression nehmen kann (Fu *et al.*, 2013). Aufgrund der Bromodomänen, der Kinase-Aktivität von Bdf1 und dessen Fähigkeit, in Kontakt mit Taf1 zu treten, scheint Bdf1 das Hefe-Taf1 zu komplettieren, sodass dieses dem Taf1 höherer Eukaryoten entspricht. Dafür spricht auch, dass Bdf1 in Hefe von ähnlichen Faktoren kontaktiert wird wie der C-Terminus im humanen Taf1, bspw. dem humanen Chaperon CIA und dessen Gegenstück in der Hefe Asf1 (Chimura *et al.*, 2002).

Eine weitere TFIID-Untereinheit mit besonderer Bedeutung ist Taf7 (ca. 67,5 kDa). Diese Untereinheit ist an der Regulation der Transkription beteiligt. Das äußert sich zum einen durch die Interaktion mit Taf1, wobei dessen Histonacetyltransferase-Aktivität gehemmt und die Transkriptionsinitiation verzögert wird. Außerdem führt die Interaktion von Taf7 mit TFIH zur Inhibierung der Phosphorylierung der C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II (Gegonne *et al.*, 2013).

Taf12 ist ein essenzielles Protein mit einem Molekulargewicht von 61 kDa. Es kommt sowohl im TFIID- als auch im SAGA-Proteinkomplex vor. Hier ist Taf12 an der strukturellen Integrität, der Nucleosomen-Acetylierung und der Transkriptionsstimulierung beteiligt. Mit Hilfe seiner HFD kann Taf12 mit weiteren Untereinheiten aus SAGA oder TFIID ein Histon-ähnliches Oktamer bilden und zur Chromatinmodifizierung beitragen (Grant *et al.*, 1998). Darüber hinaus kann Taf12 weitere Untereinheiten beider Proteinkomplexe kontaktieren. Hierbei handelt es sich unter anderem um Tra1 (Weake und Workman, 2012), Ada2 (Sanders *et al.*, 2002), Gcn5 (Lee *et al.*, 2011), Taf1 und Taf10 (Sanders *et al.*, 2002). Außerdem konnten Interaktionen mit diversen Aktivatorproteinen, bspw. Gal4 (Bhaumik und Green, 2001), Rap1 (Tomar *et al.*, 2008) und Ino2 (Hintze *et al.*, 2017) nachgewiesen werden.

Die weiteren TFIID-Untereinheiten spielen eine wichtige Rolle für den Zusammenbau und die Stabilität des Proteinkomplexes. In *Drosophila*-Zellen hatte der Verlust von Taf4, Taf5, Taf6, Taf9 oder Taf12 deutlichen Einfluss auf die Integrität des TFIID-Komplexes (Wright *et al.*, 2006). Wie elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dient ein Taf5-Dimer als Brücke, um die drei „Lappen“ des Proteinkomplexes (siehe Abb. 2.2) zu verbinden (Leurent *et al.*, 2004). Darüber hinaus sind weitere Taf-Proteine in der Lage, mit Aktivatorproteinen in Kontakt zu treten. Zu nennen sind unter anderem der Aktivator für die Gene der Galaktoseverwertung Gal4 (Lim *et al.*, 2007), außerdem Gcn4, ein Aktivator für Gene der Aminosäurebiosynthese (Drysdale *et al.*, 1998; Natarajan *et al.*, 1999) und Ino2, das die Gene für die Phospholipidbiosynthese aktiviert (Hintze *et al.*, 2017).

2.4.2 Der TFIIA-Komplex

Im weiteren Verlauf der PIC-Assemblierung werden die Transkriptionsfaktoren TFIIA und TFIIIB rekrutiert und vervollständigen den „upstream promoter complex“, welcher an den Promotor bindet (Sainsbury *et al.*, 2015).

TFIIA dient als Hilfsfaktor, der durch eine direkte Bindung mit TBP (Cortes *et al.*, 1992) die Rekrutierung von TFIID an den Promotor verbessert und beschleunigt und für eine Stabilisierung des TBP-DNA-Komplexes sorgt (Imbalzano *et al.*, 1994; Kraemer *et al.*, 2001). Des Weiteren führt die Interaktion zwischen TFIIA und TBP zur Verdrängung inhibierender Faktoren von TFIID, womit TFIIA eine antirepressorische Funktion zugeschrieben wird (Meisterernst und Roeder, 1991). Allerdings stimuliert TFIIA auch in Abwesenheit inhibitorischer Faktoren die Transkriptionsinitiation und hat somit eine grundlegende Funktion bei der Transkriptionsinitiation (Sun *et al.*, 1994). Durch direkte Interaktionen mit diversen Aktivatoren, beispielsweise Yap1 (Kraemer *et al.*, 2006), Rap1 (Papai *et al.*, 2010) und Ino2 (Hintze, 2014) beeinflusst TFIIA die Transkription auch in seiner Funktion als Coaktivator (Ozer *et al.*, 1998). Auch die Wirkung anderer Coaktivatoren wie PC4 und HMG-2 wird mit Hilfe von TFIIA vermittelt (Ge und Roeder, 1994; Shykind *et al.*, 1995).

TFIIA weist starke Sequenzkonservierungen von Hefe über *Drosophila* bis hin zum Menschen auf. Lediglich die Anordnung der Untereinheiten unterscheidet sich. Während TFIIA in der Hefe aus zwei Untereinheiten Toa1 (32 kDa) und Toa2 (13,5 kDa) besteht (Ranish *et al.*, 1992), gibt es im Menschen und in *Drosophila* drei Untereinheiten α (35 kDa), β (19 kDa) und γ (12 kDa; Cortes *et al.*, 1992; Coulombe *et al.*, 1992). Die α - und β -Untereinheiten werden vom gleichen Gen codiert und das Produkt wird posttranslational prozessiert, um zwei Untereinheiten zu erhalten. Alle zwei bzw. drei Untereinheiten sind essenziell für die Funktion von TFIIA, allerdings werden nur die drei konservierten Sequenzbereiche für die Aktivität des Komplexes benötigt (Kang *et al.*, 1995). Hierbei handelt es sich um die N-terminalen 54 Aminosäuren der α - Untereinheit und die C-terminalen 76 Aminosäuren der β -Untereinheit, welche Sequenzähnlichkeiten zum N- und C-Terminus von Toa1 in Hefe zeigen. Die konservierten Bereiche innerhalb von Toa1 werden durch einen 155 Aminosäuren langen, nicht konservierten Linker miteinander verbunden (Tan *et al.*, 1996). Außerdem sind jeweils die kleinen γ -Untereinheiten (in Hefe: Toa2) weitgehend konserviert (Dejong und Roeder, 1993; Ma *et al.*, 1993; Yokomori *et al.*, 1993).

Die drei konservierten Abschnitte bilden zusammen zwei Domänen aus. Die N-Termini der beiden Untereinheiten Toa1 und Toa2 in der Hefe bilden mit jeweils zwei Helices eine sogenannte „four-helix-bundle“-Struktur (FHB; Geiger *et al.*, 1996), welche für die Dimerisierung der beiden Proteine verantwortlich ist und weitere Komponenten des Initiationskomplexes rekrutiert (Stargell *et al.*, 2001). Die C-Termini hingegen bilden mit jeweils drei β -Faltblättern eine sechssträngige „ β -barrel“-Domäne (Geiger *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 1996), welche den Kontakt untereinander, zur DNA stromaufwärts der TATA-Box und zum TBP herstellt (Liu *et al.*, 1998). Das „ β -barrel“ konkurriert dabei mit der TAND2 von Taf1 um die Bindung an TBP (Kokubo *et al.*, 1998; Bagby *et al.*, 2000), wodurch die

inhibierende Wirkung der TAND1 aufgehoben und die Bindung von TBP an den Promotor stabilisiert wird (Ozer *et al.*, 1998).

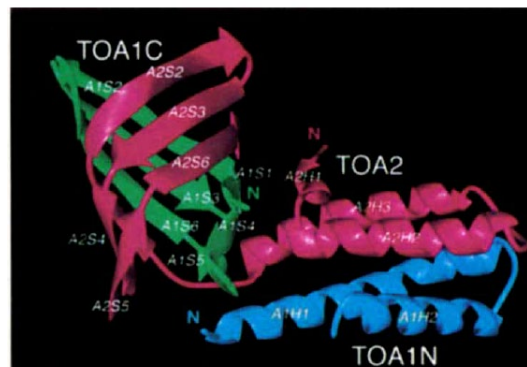


Abbildung 2.3: Darstellung des TFIIA-Komplexes. Dargestellt ist die Seitenansicht des TFIIA-Komplexes. Blau ist der N-Terminus der größeren Toa1-Untereinheit, welche eine α -Helix ausbildet. Grün ist der dazugehörige C-Terminus in β -Faltblatt-Konformation. In Rot ist die kleinere Toa2-Untereinheit, ebenfalls mit α -Helix und β -Faltblatt dargestellt (Tan *et al.*, 1996).

2.4.3 Die Transkriptionsfaktoren TFIIIB, TFIIIE, TFIIIF und TFIIH

Eine entscheidende Rolle während der PIC-Assemblierung spielt der basale Transkriptionsfaktor TFIIIB (Sua7 in *S. cerevisiae*, 38 kDa). Dieses Protein besitzt eine N-terminale Zinkfingerdomäne (TFIIB_{ZR}) und zwei imperfekte C-terminale α -helikale Wiederholungen (cTFIIIB; Buratowski und Zhou, 1993). Diese kontaktiert TBP und die Promotor-DNA stromauf- und abwärts der TATA-Box (in höheren Eukaryoten bekannt als BRE-Motiv, „TFIIIB recognition element“; [Langrange *et al.*, 1998]), wodurch die Transkriptionsrichtung festgelegt wird (Bagby *et al.*, 1995). TFIIB_{ZR} kontaktiert zum einen TFIIIF und darüber hinaus Untereinheiten der RNA-Polymerase II und positioniert somit die DNA im aktiven Zentrum des Enzyms, wodurch der exakte Startpunkt der Transkription festgelegt wird (Kostrewa *et al.*, 2009). Im nicht aktiven Zustand kommt es zwischen TFIIB_{ZR} und cTFIIIB zu intramolekularen Wechselwirkungen, sodass die Oberfläche nicht für Interaktionen mit der RNAP II und der DNA zur Verfügung steht. Die Konformation des Proteins ändert sich durch Kontakt mit Aktivatorproteinen in die aktive Form und zieht den weiteren Zusammenbau des PICs nach sich (Roberts und Green, 1994; Wu und Hampsey, 1999).

Der Transkriptionsfaktor TFIIIF ist fest mit der RNA-Polymerase II assoziiert und unterstützt dessen Bindung an den Komplex aus TFIIID, TFIIA und TFIIIB am Promotor (Ziegler *et al.*, 2003). In *S. cerevisiae* besteht TFIIIF aus den Untereinheiten Tfg1, Tfg2 und Tfg3 (=Taf14), wobei Taf14 für die Transkription nicht essenziell ist (Chafin *et al.*, 1991; Henry *et al.*, 1994), aber mit Aktivatorproteinen wie Gcn4, Hap4 und Swi5 in Kontakt tritt (Neely *et al.*, 1999). Humanes TFIIIF besteht lediglich aus zwei Untereinheiten TFIIIF α (Rap74) und TFIIIF β (Rap30), die jeweils Tfg1 und Tfg2 entsprechen. Durch das Fehlen der dritten Untereinheit Tfg3 dient Tfg2 als Bindestelle für Aktivatoren, wie z. B. SRF („serum response factor“; Joliot *et al.*, 1995).

TFIIF verhindert unspezifische Interaktionen zwischen der RNA-Polymerase II und der Promotor-DNA, wirkt stabilisierend auf den PIC, stimuliert die frühe RNA-Synthese und verhindert das Pausieren der RNA-Polymerase II während der RNA-Synthese (Sainsbury *et al.*, 2015). Zusammen mit TFIIB bindet TFIIF an die DNA stromabwärts der TATA-Box (He *et al.*, 2013). Den Komplex aus den basalen Transkriptionsfaktoren TFIID, TFIIA, TFIIB, TFIIF und der RNA-Polymerase II am Promotor nennt man Kern-PIC („core PIC“).

Die basalen Transkriptionsfaktoren TFIIE und TFIIH vervollständigen den PIC, sodass dieser als geschlossener („closed“) PIC vorliegt. TFIIE bindet dabei an die RNA-Polymerase II und stellt die Verbindung zwischen dem PIC und TFIIH her (Flores *et al.*, 1989; Maxon *et al.*, 1994). TFIIE besteht aus den Untereinheiten Tfa1 und Tfa2 (Feaver *et al.*, 1994), welche Ähnlichkeiten zum bakteriellen Sigma-Faktor aufweisen (Sumimoto *et al.*, 1991; Ohkuma *et al.*, 1991). Für die kleinere Untereinheit Tfa2 konnten Aktivatorkontakte, z. B. mit Pho2 und Pho4 nachgewiesen werden (Magbanua *et al.*, 1997).

TFIIH ist ein Multiproteinkomplex mit zehn Untereinheiten und zwei wesentlichen Enzymaktivitäten. Die Untereinheiten Rad3 und Ssl2 sind ATP-abhängige Helicasen, welche durch Aufschmelzung des DNA-Doppelstranges den Übergang vom geschlossenen zum offenen PIC vollziehen (Guzder *et al.*, 1994), wobei eine etwa 10 bp große Transkriptionsblase entsteht. Außerdem ist TFIIH durch sein Kinase-Modul Kin28-Ccl1-Tfb3 für die Phosphorylierung der Carboxy-terminalen Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II-Untereinheit Rpb1 verantwortlich (Feaver *et al.*, 1991; Gibbons *et al.*, 2012). Dieser Schritt ist notwendig für die Transkriptionsinitiation und den Übergang in die Elongation der mRNA-Synthese. Darüber hinaus sind die nicht zum Kinase-Modul gehörenden TFIIH-Untereinheiten an der Nucleotidexcisionsreparatur (NER) beteiligt und bewirken die Aufschmelzung fehlerhafter DNA-Stränge (Svejstrup *et al.*, 1995). TFIIH wird wie die übrigen basalen Transkriptionsfaktoren von Aktivatorproteinen kontaktiert (Lim *et al.*, 2007).

2.4.4 Der Mediator-Komplex

Ein weiterer essentieller Transkriptionsfaktor ist der Mediator-Komplex. Er dient vorrangig als Vermittler der Genaktivierung durch seine Funktion als Interaktionsplattform für diverse Aktivatoren und die Transkriptionsmaschinerie (Kelleher *et al.*, 1990; Flanagan *et al.*, 1991). In Hefe besteht der Mediator aus 25 Untereinheiten, während in höheren Eukaryoten weitere dazukommen können. Von ihnen sind lediglich acht Untereinheiten strikt konserviert. Der strukturelle Aufbau des Multiproteinkomplexes ist von der Hefe bis hin zum Menschen gleich, es gibt die Kopf-, Mittel- und Schwanzregion und ein separates Kinase-Modul CDK8 (Guglielmi *et al.*, 2004). Die Kopf- und Mittelregion enthalten die konservierten Mediator-Komponenten (Björklund und Gustafsson, 2004; Bourbon, 2008) und kontaktieren die unphosphorylierte CTD der RNA-Polymerase II. Durch Wechselwirkungen mit TFIID, TFIIE und TFIIH wird der Zusammenbau des PIC unterstützt und die Phosphorylierung der CTD durch TFIIH erfolgt. Dadurch dissoziiert der Mediator im Verlauf der Transkriptionsinitiation von der RNA-Polymerase II und verbleibt mit den restlichen basalen Transkriptionsfaktoren am Promotor für eine neue Transkriptionsrunde (Yudkovsky *et al.*, 2000). Die Schwanzregion ist hauptsächlich für die Interaktionen mit Aktivatorproteinen zuständig, weshalb der Mediator eine grundlegende Bedeutung

für die regulierte Genexpression hat (Björklund und Gustafsson, 2004; Bourbon, 2008). Der Mediator kann sich aber auch reprimierend auf die Genexpression auswirken. Dafür sind die Untereinheiten Med14 und Med16 (in Hefe auch Rgr1 und Sin4) verantwortlich, die ebenfalls in der Schwanzregion zu finden sind (Li *et al.*, 1995). Außerdem kann sich durch Bindung des TFIID-Kinase-Moduls an die Kopfregion die Konformation des Proteinkomplexes dahingehend verändern, dass eine Interaktion zwischen Mediator und RNA Polymerase II unterbrochen wird, was eine negative Regulation der Initiation ermöglicht. Neben Konformationsänderungen, auch durch Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren und Aktivatoren, kann die Zusammensetzung Einfluss auf die Funktion des Mediators haben. So kommen in höheren Eukaryoten je nach Zelltyp unterschiedliche Mediator-Subkomplexe mit spezifischen Aufgaben vor (Larivière *et al.*, 2012; Allen und Taatjes, 2015).

2.5 Transkriptionsregulation durch Modifizierung der Chromatinstruktur

Die Regulation der Transkriptionsinitiation erfolgt meist schon vor der Assemblierung des PIC durch Veränderungen in der DNA-Verpackung. Die DNA liegt im Zellkern als Chromatin vor, dabei winden sich 146 bp DNA um ein Oktamer aus Histonproteinen, welches je zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4 enthält (Luger *et al.*, 1997; Luger und Richmond, 1998a). So werden die kleinsten Einheiten der verpackten DNA, die Nucleosomen, gebildet. Hierbei sind Faltungshelfer wie CAF-1 („chromatin assembly factor“, Smith und Stillman, 1989) oder NAP1 („nucleosome assembly protein“, Fujii-Nakata *et al.*, 1992) vonnöten. Die Regulation der Chromatinkondensation hat Einfluss auf die DNA-Zugänglichkeit und somit auch auf Prozesse wie Genexpression, Replikation, Rekombination und DNA-Reparatur. Die Nucleosomenzugänglichkeit kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden, z. B. ATP-abhängige Chromatinremodellierer (Peterson und Workman, 2000; Vignali *et al.*, 2000), Enzyme der kovalenten Histonmodifizierung (Sterner und Berger, 2000; Ng und Bird, 2000) und Histon-Chaperone.

2.5.1 Chromatin-remodellierende Komplexe

Um die Struktur der verpackten DNA zu beeinflussen, werden durch sogenannte Chromatinremodellierungskomplexe Histone ausgetauscht oder Nucleosomen ATP-abhängig verschoben bzw. entfernt, sodass weniger stark kondensierte DNA-Bereiche entstehen, die für die Transkriptionsmaschinerie gut zugänglich sind. Chromatinremodellierungskomplexe enthalten eine konservierte ATPase-Untereinheit, anhand derer sie in vier Familien eingeteilt werden können: SWI/SNF, ISWI, NURD/Mi-2/CHD und INO80/SWR. Diese Komplexe sind an verschiedenen Prozessen wie der Aktivierung oder Repression von Genen, Austausch von Histonen, Replikation und DNA-Reparatur beteiligt (Gangaraju und Bartholomew, 2007; Liu *et al.*, 2011).

Der erste biochemisch beschriebene Chromatinremodellierungskomplex war der SWI/SNF-Komplex aus *S. cerevisiae* (Cote *et al.*, 1994; Kwon *et al.*, 1994). SWI/SNF-Komponenten wurden zunächst als Regulatoren des Paarungstypwechsels („SWItching deficient“) und der Verwertung alternativer C-Quellen („Sucrose Non-Fermenting“, Peterson und Herskowitz, 1992; Workman und Kingston, 1998) identifiziert. SWI/SNF ist für die Aktivierung der Transkription bei 5% aller Hefegene erforderlich

(Sudarsanam *et al.*, 2000). Der Komplex besteht aus 12 Untereinheiten (Smith *et al.*, 2003), wobei die ATPase-Aktivität durch die Untereinheit Swi2 vermittelt wird. Somit ist Swi2 für die Bindung und Spaltung von ATP und die DNA-Translokation zuständig. Darüber hinaus bindet Swi2 unspezifisch an DNA und interagiert über eine Bromo-Domäne mit acetylierten Histonen (Clapier und Cairns, 2009). Zusammen mit den Actin-ähnlichen Proteinen Arp7 und Arp9 formt Swi2 einen Komplex mit ATPase- und Remodellierungsaktivität, der jedoch nicht zum Austausch des H2A-H2B Histon-Dimers fähig ist. Diese Aufgabe übernimmt Swi3, welches über eine SANT-Domäne (Swi3-Ada2-N-CoR-TFIIB) an DNA und Nucleosomen bindet und außerdem für den korrekten Zusammenbau des SWI/SNF-Komplexes notwendig ist (Yang *et al.*, 2007; Boyer *et al.*, 2002). Die meisten Untereinheiten des SWI/SNF-Komplexes, allen voran Swi2, Swi3, Snf5 und Swi1, werden von Aktivatoren kontaktiert, um den SWI/SNF-Komplex an die Promotorregion entsprechender Gene zu rekrutieren und dort die Nucleosomen zu modifizieren bzw. umzugruppieren (Neely *et al.*, 2002; Prochasson *et al.*, 2003; Collins *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2007). Durch Interaktion mit dem HIR-Corepressor ist SWI/SNF in der Lage, die Expression von Histon-Genen in Hefe zu reprimieren (Dimova *et al.*, 1999).

Weitere Chromatinremodellierungskomplexe sind beispielsweise RSC („remodels the structure of chromatin“) und der INO80-Komplex. Im Gegensatz zu SWI/SNF liegt RSC in höherer Kopienzahl vor und ist essenziell für das Wachstum der Zelle. Neben der Genaktivierung ist RSC an der Segregation von Chromosomen und der Stranginvasion während der homologen Rekombination beteiligt (Cairns *et al.*, 1996). INO80 reguliert die Transkription und die Reparatur der DNA (Morrison *et al.*, 2004; van Attikum *et al.*, 2004).

2.5.2 Einfluss posttranslationaler Modifizierungen von Histonen

Histone enthalten vor allem innerhalb ihrer N-Termini, welche aus den Nucleosomen herausragen, Aminosäuren, deren Modifikation Einfluss auf die Chromatindichte hat (Luger und Richmond, 1998b). Durch Acetylierungen (Kurdistani und Grunstein, 2003), Methylierungen (Zhang und Reinberg, 2001), Phosphorylierungen (Nowak und Corces, 2004), Ubiquitinierungen (Sun und Alles, 2002; Osley, 2004), SUMOylierungen (Nathan *et al.*, 2003) und ADP-Ribosylierungen (Golderer und Gröbner, 1991) verändern sich die Eigenschaften des Chromatins und bestimmen den epigenetischen Code oder Histoncode.

Die wichtigste posttranslationale Modifikation bei Histonen ist die Acetylierung bzw. Deacetylierung von Lysinresten. Lysin ist eine protonierte und damit positiv geladene Aminosäure, was elektrostatische Wechselwirkungen mit der negativ geladenen DNA zulässt. Die Folge sind eine kompakte Chromatinstruktur und schwer zugängliche Promotorbereiche. Eine Acetylierung überdeckt die positive Ladung von Lysin, sodass keine Interaktion mit der DNA mehr stattfindet und sich die Chromatinstruktur auflockert (Norton *et al.*, 1989; 1990). Die Acetylierung hat also eine aktivierende Wirkung, da die DNA leichter zugänglich für Chromatinremodellierungskomplexe und Enzyme der Transkriptionsmaschinerie wird.

Zuständig für Histonacetylierungen sind sogenannte Histon-Acetyltransferasen (HATs), wie Gcn5 („general control nonderepressible“ 5), eine Untereinheit aus dem SAGA-Komplex, die Lysinreste der Histone H2B und H3 acetyliert (Georgakopoulos und Thireos, 1992; Brownell *et al.*, 1996; Grant *et al.*, 1997; Ruiz-Garcia *et al.*, 1997). Der SAGA-Komplex (Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase) ist ein Multiproteinkomplex mit 20 Untereinheiten (Baker und Grant, 2007), die sich auf fünf Module verteilen. Das Kernmodul gibt die Struktur des Komplexes vor und interagiert mit TBP. Das HAT-Modul enthält unter anderem die Acetyltransferase Gcn5 als enzymatische Komponente und den Coaktivator Ada2. Außerdem gibt es das Protease-Ubiquitin-Modul, ein Taf-Modul, in dem mehrere TFIIID-Untereinheiten enthalten sind und ein Aktivator-bindendes Modul, welches Tra1 beinhaltet (Hahn und Young, 2011).

Frühere Arbeiten differenzierten zwischen SAGA-abhängigen Genen (betreffen zelluläre Stressreaktionen und sind stark vom Nährstoffangebot reguliert) und Taf-abhängigen Genen (besitzen zumeist grundlegende „house-keeping“-Funktionen und sind schwach reguliert). Legt man diese Einteilung zugrunde, sind in der Hefe *S. cerevisiae* etwa 10% aller Gene SAGA-abhängig (Lee *et al.*, 2000; Huisinga und Pugh, 2004). Neuere Ergebnisse heben allerdings eher eine weitreichende Redundanz beider Komplexe hervor (Baptista *et al.*, 2017; Warfield *et al.*, 2017; Donczew *et al.*, 2020).

Die genaktivierende Wirkung wird durch Interaktionen mit Aktivatoren, z. B. über Tra1 (Brown *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2012) oder Coaktivatoren, wie dem Mediator (Bhaumik *et al.*, 2004), erzielt. Weitere in Hefe vorkommende Histonacetyltransferase-Komplexe sind NuA3 (John *et al.*, 2000) und NuA4 (Allard *et al.*, 1999), die unterschiedliche Histone acetylieren.

2.6 Corepressorkomplexe in der Hefe *S. cerevisiae*

Da es sich bei der Acetylierung um einen Regulationsmechanismus handelt, muss die posttranslationale Modifizierung reversibel sein. Histondeacetylasen (HDACs) sind in der Lage, die Acetylreste der N-terminalen Lysinreste hydrolytisch zu entfernen, was eine dichtere Chromatinstruktur zur Folge hat. HDACs kommen als enzymatische Komponenten in Corepressorkomplexen wie dem Sin3/Rpd3-Komplex oder dem Cyc8/Tup1-Komplex vor.

2.6.1 Der Sin3/Rpd3 Corepressorkomplex

Der Sin3/Rpd3 Corepressorkomplex ist ein globaler Regulator der Transkription in Eukaryoten. Die enzymatische Komponente in Form einer Histondeacetylase ist das Protein Rpd3. Außerdem sind Hilfsproteine zur Stabilisierung, spezifische Regulatoren, die Kontakt zu Zielpromotoren herstellen und, als wichtigste Komponente, das Gerüstprotein Sin3, an welches alle Untereinheiten binden, enthalten (Grzenda *et al.*, 2009).

Zuerst wurde Sin3 von Sternberg *et al.* (1987) und Nasmyth *et al.* (1987) beschrieben. Sie fanden heraus, dass eine *sin3* Mutation zur Derepression des *HO*-Gens führt. Dieses Gen codiert für eine

Endonuklease, die zum Paarungstypwechsel in homothallischen Hefezellen benötigt wird. Normalerweise ist das Enzym nur in den Mutterzellen aktiv und bleibt in Tochterzellen ausgeschaltet. In einer *sin3* Mutante kommt es aber auch in Tochterzellen zum Paarungstypwechsel, sodass Sin3 (Switch independent) als Repressor der *HO*-Transkription fungieren muss. *SIN3* wurde noch unter sechs weiteren Synonymen (*SDI1*, *UME4*, *RPD1*, *GAM2*, *CPE3*, *SDS16*) als negativer Regulator in Hefe beschrieben (Silverstein und Ekwall, 2005; Grzenda *et al.*, 2009). Heute gilt Sin3 als pleiotroper Corepressor, der an vielen regulatorischen Prozessen in der Zelle beteiligt ist.

Das Sin3-Protein besteht aus 1536 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 175 kDa. Für seine Funktion als Gerüstprotein und Interaktionsplattform besitzt Sin3 vier PAHs („paired amphipathic helices“, Wang *et al.*, 1990). Ähnlich zu Helix-Loop-Helix-Domänen bilden die PAHs jeweils eine amphipathische α -Helix mit einer hydrophoben und einer hydrophilen Seite aus. Hier binden zahlreiche Repressoren, wie Opi1 (Wagner *et al.*, 2001), Rox1, Yox1, Dal80, Mot3 und Yhp1 (Kliewe, 2013). Erstaunlicherweise konnten auch Interaktionen mit den Aktivatoren Ino2, Pho4 und Hac1 nachgewiesen werden. Mittels Chromatin-Immunopräzipitationsstudien (ChIP) konnten Kliewe *et al.* (2017) zeigen, dass in Anwesenheit von Ino2 und trotz des Fehlens von Opi1 der Sin3 Corepressor-komplex an ICRE-haltige Promotoren rekrutiert wird. Zuvor wurde angenommen, dass für diesen Schritt der Repressor Opi1 essenziell ist. Zur Bindung der Histondeacetylasen Rpd3, Hda1 und Hos1 (Grigat *et al.*, 2012) enthält Sin3 neben den PAHs die Histondeacetylase Interaktionsdomänen (HIDs). Durch Interaktionen von Sin3 mit Repressorproteinen werden die Histondeacetylasen an Promotorbereiche rekrutiert und können durch Deacetylierung der Histone die Chromatinstruktur verdichten und somit die Expression entsprechender Gene reprimieren (Kasten *et al.*, 1997; Vogelauer *et al.*, 2000).

2.6.2 Der Cyc8/Tup1 Corepressorkomplex

Ein weiterer Corepressorkomplex, der in der Hefe *S. cerevisiae* in der Lage ist, durch Veränderungen der Chromatinstruktur inhibierend auf die Transkription zu wirken, ist der Cyc8/Tup1-Corepressorkomplex. Dieser wird durch sequenzspezifische DNA-bindende Proteine rekrutiert. Zur Kontaktaufnahme dienen in Cyc8 zehn N-terminale TPR-Motive („tetratricopeptide repeat“), die aus einer jeweils 34 Aminosäuren langen, wenig konservierten Konsensussequenz bestehen (Sikorski *et al.*, 1990; Tzamaris und Struhl, 1994). Tup1 hingegen besitzt sogenannte WD40-„Repeats“, welche aus acht konservierten Wiederholungen mit jeweils ca. 40 Aminosäuren bestehen, die mit Tryptophan-Aspartat (WD) enden (Williams und Trumbly, 1990).

Während Cyc8 Interaktionen mit zahlreichen Repressoren eingeht (darunter Opi1; Jäschke *et al.*, 2011; aber auch Rox1, Yox1, Mot3, Hac1, Nrg1, Sko1, Cup9, Dal80 und Yhp1), bindet Tup1 nur an drei der genannten Repressoren (Kliewe, 2013). Dafür ist Tup1, so wie Cyc8, in der Lage, mit den Histondeacetylasen Rpd3, Hos1 und Hos2 in Kontakt zu treten und diese an entsprechende Ziel-Promotoren zu rekrutieren (Davie *et al.*, 2003; Malavé und Dent, 2006). Zusätzlich interagiert Tup1 mit der HDAC Hda1 (Wu *et al.*, 2001). Infolgedessen kommt es durch Deacetylierung der Histone im Promotorbereich zu einer Chromatinverfestigung und Inhibierung der Transkription. Außerdem kann

Tup1 Kontakt zu den hypoacetylierten Histonen H3 und H4 aufnehmen (Edmondson *et al.*, 1996) und dadurch die HDACs direkt zu den Histonen rekrutieren. Die reprimierende Wirkung des Cyc8/Tup1 Corepressorkomplexes erfolgt ebenso durch die Interaktion mit Faktoren der Transkriptionsmaschinerie, insbesondere dem Mediator (Papamichos-Chronakis *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000).

Tatsächlich kann sich Cyc8 durch Interaktionen mit den Komplexen SAGA und Swi/Snf auch positiv auf die Transkription auswirken (Proft und Struhl, 2002). Darüber hinaus konnten Kliewe *et al.* (2017), ähnlich der Untersuchungen mit Sin3, Interaktionen mit den Aktivatoren Ino2, Pho4 und Hac1 nachweisen, sowie die Ino2-abhängige Anwesenheit von Cyc8 an ICRE-haltigen Promotoren in Abwesenheit des Repressors Opi1.

2.7 Die ATPasen des 26 S Proteasoms: Sug1 und Sug2

Als Modellbeispiel für eukaryotische Genkontrolle dient häufig die Regulation der *GAL*-Strukturgene im Verlauf der Verwertung von Galaktose als alternativer C-Quelle. Die Bindung des Aktivators Gal4 an die UAS_{GAL}-Sequenzen in den Promotoren der *GAL*-Gene führt zu deren Expression. Die Transkriptionsaktivierungsdomäne in Gal4 besteht aus 34 Aminosäuren und liegt in der Nähe des C-Terminus. Russell und Johnston (2001) beschrieben eine Gal4-Variante, dessen TAD lediglich 14 Aminosäuren enthält und zu einer signifikanten Reduktion der Expression der *GAL*-Gene führt. Eine Überexpression der verkürzten Aktivator-Variante mildert den Defekt ab und erlaubt den Zellen das Wachstum mit Galaktose. Im Zuge dieser Untersuchungen wurden Mutationen in den Genen *SUG1* und *SUG2* identifiziert, die eine Überexpression der verkürzten Aktivator-Variante ermöglichten. Sug1 und Sug2, auch unter den Namen Rpt6 und Rpt4 bekannt, sind Untereinheiten des eukaryotischen 26S Proteasoms. Dieses besteht aus einem 20S Zylinder, in dem die Proteolyse stattfindet und zwei beidseitigen 19S Deckeln, die ubiquitinierte Proteine erkennen, in den Zylinder einfädeln und ihn dann verschließen (Yoshimura *et al.*, 1993). Sug1 und Sug2 sind ATPasen innerhalb der 19S Untereinheiten (Baumeister *et al.*, 1998). Die Vermutung lag zunächst nahe, dass Mutationen im *SUG1*- und *SUG2*-Gen für eine verminderte Proteolyse der verkürzten Gal4-Variante verantwortlich sein könnten. Allerdings stellte sich heraus, dass *SUG1*- und *SUG2*-Allele, die keine Suppressorwirkung auf die Gal4-Mutation haben, einen weiteren Anstieg der Gal4-Variante verursachten. Den gleichen Effekt hatten Mutationen in 20 S Untereinheiten des Proteasoms. Dies lässt darauf schließen, dass nicht die Veränderung der Proteolyse durch Mutationen von Sug1 und Sug2 Einfluss auf die Expression der *GAL* Gene hat, sondern dass die 19S Untereinheit eine andere Rolle bei der Transkription spielt. Bereits 1992 wurde eine Interaktion zwischen Gal4 und Sug1 nachgewiesen (Swaffield *et al.*, 1992), wobei Sug1 als Suppressor of Gal4 bekannt wurde. Sug1 besteht aus 405 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 45 kDa und gehört zur Gruppe der AAA-ATPasen („ATPases associated with various cellular activities“; Baumeister *et al.*, 1998). Sug2 gehört ebenfalls zur AAA-Familie, besteht aus 437 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 49 kDa.

Das AAA-Modul ist eine ca. 230 Aminosäuren lange Region, die die ATPase-Aktivität der AAA-Komplexe vermittelt. AAA-Komplexe kommen in allen Organismen vor (Hanson und Whiteheart,

2005), sind funktionell und organisatorisch sehr vielseitig und zeigen Unterschiede hinsichtlich Aktivität, Stabilität und Mechanismus (Erzberger und Berger, 2006). Sie sind involviert in Prozesse wie DNA-Replikation, Protein-Degradation, Signal-Transduktion und Regulation der Genexpression (Koonin *et al.*, 2004; Lupas und Frickey, 2004). Charakteristisch sind die Walker A- und Walker B-Motive, welche an das Phosphatrückgrat der DNA binden können (Walker *et al.*, 1982). Dafür besitzt das Walker A-Motiv eine Konsensussequenz GXXXXGKTS, wobei der Lysinrest (K) entscheidend für die Nucleotidbindung ist. Es ist auch unter den Namen Walker A-Loop oder P-Loop bekannt, da sich ein Glycin-haltiger „Loop“ ausbildet, dem eine β -Faltblattstruktur vorangeht und eine α -Helix folgt. Durch Bindung des Loops an Phosphatgruppen des DNA-Rückgrats kommt es zu Konformationsänderungen innerhalb der Nucleotide. Das Walker B-Motiv befindet sich in sog. P-Loop-Proteinen meist C-Terminal zum Walker A-Motiv und hat die Konsensussequenz RKXXXXGXXXXLhhhhD, wobei h für eine hydrophobe Aminosäure steht. Die erweiterte Konsensussequenz enthält am Ende zusätzlich einen Glutamatrest (Hanson und Whiteheart, 2005), sodass Asparaginsäure und Glutaminsäure aufeinander folgen, ähnlich wie bei DEAD/DEAH-Motiven vieler Helicasen.

Sug1 und Sug2 dienen als Untereinheiten des 26S Proteasoms der Proteolyse polyubiquitylierter Proteine, haben aber auch einen nicht-proteolytischen Einfluss auf die Regulation der Transkriptionsinitiation (Durairaj und Kaiser, 2014). Die 19S-Untereinheiten beeinflussen die Transkriptionselongation und die Nucleotidexcisionsreparatur (Gonzales *et al.*, 2002). In der Hefe gelten sie als Mediatoren der Transkription durch ihre Assoziation mit aktiven Promotoren. Sie erleichtern die Auflösung pausierender Elongationskomplexe und rekrutieren Coaktivatoren. Auch in höheren Eukaryoten spielen diese 19S-Untereinheiten eine regulatorische Rolle bei der Transkription, wobei der genaue Mechanismus bislang unbekannt ist (Bhat *et al.*, 2008).

2.8 Ziele der Arbeit

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass die Corepressoren Sin3 und Cyc8 mit dem Repressor Opi1 interagieren, der den Aktivator Ino2 kontaktieren kann. So ergab sich folgende Hypothese zum Verlauf der Repression der Transkription der *INO*-Gene: Ino2 (zusammen mit Ino4) liegt an ICRE-haltigen Promotoren gebunden vor, wird aber von Opi1 gehemmt, welcher die Corepressoren Sin3 und Cyc8 rekrutiert, die wiederum Histondeacetylasen kontaktieren und eine Repression der Transkription hervorrufen. In CHIP-Studien wurde jedoch gezeigt, dass die Corepressoren Sin3 und Cyc8 unabhängig von Opi1, dagegen in Abhängigkeit von Ino2 an ICRE-haltigen Promotoren zu finden sind. Eine direkte Interaktion zwischen den Corepressoren und dem Aktivator konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Diese Befunde sollten im Zuge dieser Arbeit verifiziert und die Interaktionsmuster der beteiligten Regulatoren weiter charakterisiert werden. Dementsprechend wurden zusätzliche Aktivatoren auf Interaktionen mit den Corepressoren untersucht und ebenfalls kartiert, um mögliche Repressorinteraktionsdomänen zu identifizieren.

Neben der Regulation der Repression beschäftigt sich diese Arbeit hauptsächlich mit der Genaktivierung durch Interaktionen zwischen dem Aktivator Ino2 und Faktoren der Transkriptionsmaschinerie, wobei detaillierte Studien zur Bindung an die basalen Transkriptionsfaktoren TFIID und TFIIA durchgeführt wurden, die zur Charakterisierung mehrerer Aktivatorbindedomänen (ABDs) führten. Sowohl für die Untereinheiten Taf1 bis Taf14 von TFIID und Toa1 sowie Toa2 aus TFIIA wurden in früheren Arbeiten Interaktionsstudien mit Ino2 durchgeführt, wobei Taf1, Taf4, Taf6, Taf10 und Taf12 als auch Toa1 und Toa2 als Interaktionspartner von Ino2 identifiziert wurden. Einige dieser Interaktionen sollten *in vitro* und *in vivo* näher charakterisiert werden, um mehr über die Rolle der einzelnen basalen Transkriptionsfaktoren und ihrer Untereinheiten zu erfahren. Für die Bromodomänenfaktoren Bdf1 und Bdf2 als weitere TFIID-Untereinheiten sind Aktivatorkontakte ebenfalls denkbar, sodass sie im Zuge dieser Arbeit auf eine Bindung mit Ino2 untersucht wurden. Neben den basalen Transkriptionsfaktoren spielen auch Chromatinremodellierungskomplexe eine tragende Rolle bei der Transkriptionsinitiation. Für die SWI/SNF-Untereinheit Swi2 wurden bereits Aktivatorkontakte, unter anderem mit Ino2, beschrieben. In dieser Arbeit sollte eine Minimaldomäne für die Interaktion mit dem Aktivator der *INO*-Gene identifiziert und mittels gerichteter Mutagenese charakterisiert werden.

In den letzten Jahren zeigte sich, dass Untereinheiten des 26S Proteasoms sowohl proteolytische als auch nicht-proteolytische Funktionen haben. Vor allem Sug1 und Sug2, Proteine der 19S-Partikel, wurden mit Aktivatorkontakten sowie einer effektiven Elongation in Verbindung gebracht. Hier galt es herauszufinden, ob auch Ino2 von diesen ATPasen kontaktiert wird, um gegebenenfalls eine minimale Aktivatorinteraktionsdomäne zu kartieren.

3 Ergebnisse

3.1 Promotorrekrutierung der Corepressoren Sin3 und Cyc8 durch Aktivatorproteine

In früheren Arbeiten wurde festgestellt, dass der Aktivator Ino2 und der Repressor Opi1 miteinander interagieren, wodurch der Repressor Kontakt zu ICRE-haltigen Promotoren der Phospholipid-Biosynthesegene erhält (Wagner *et al.*, 2001; Heyken *et al.*, 2005). Des Weiteren interagiert Opi1 mit den Corepressoren Sin3 und Cyc8 (Jäschke *et al.*, 2011), was zu einer Hypothese über die Reihenfolge der Interaktionsereignisse, die bei einer Histon-Deacetylase-vermittelten Repression der Zielgene ablaufen, führte: ICRE-Ino2-Opi1-Sin3/Cyc8-HDACs. In diesem Fall wäre die Opi1-Rekrutierung an entsprechende Promotoren Ino2-abhängig, während Sin3 und Cyc8 wiederum auf einen funktionellen Repressor Opi1 angewiesen sind, um Zugang zum Promotor zu bekommen. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden Chromatin-Immunopräzipitationsstudien (ChIPs) durchgeführt, eine Methode, um *in vivo* die Anwesenheit bestimmter Proteine (in diesem Falle der Repressor Opi1) an bestimmten Genorten (hier die ICRE-haltigen Promotoren der Gene *INO1* und *CHO2*) nachzuweisen. Felix Kliewe konnte in seiner Dissertation (2013) zeigen, dass Opi1 unter reprimierenden Bedingungen (Anwesenheit von Inositol und Cholin) an den ICRE-haltigen Promotoren von *INO1* und *CHO2* vorliegt, während dies in einer *ino2*-Nullmutante nicht der Fall war, was belegt, dass die Opi1-Rekrutierung an entsprechende Promotoren tatsächlich Ino2-abhängig ist. Weitere ChIP-Studien wurden durchgeführt, um zu überprüfen, ob Sin3 und Cyc8 Ino2- und Opi1-abhängig an ICRE-haltigen Promotoren vorliegen. So wie bei den vorhergegangenen Untersuchungen konnten Sin3 und Cyc8 unter reprimierenden Bedingungen an den jeweiligen Promotoren nachgewiesen werden, während dies in der *ino2*-Nullmutante nicht der Fall war. Entgegen der Erwartungen wurden die Corepressoren aber auch dann an den Promotoren nachgewiesen, wenn Opi1 in den Zellen fehlte. Weitere Studien wurden durchgeführt, um zu testen, ob die Corepressoren auch unter dereprimierenden Bedingungen (-IC) an den Promotoren vorliegen, was für Sin3 ohne Unterschied zu reprimierenden Bedingungen der Fall war. Cyc8 konnte ebenfalls, wenn auch mit reduzierter Konzentration, an den Promotoren nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse führten zu der Schlussfolgerung, dass nicht Opi1, sondern der Aktivator Ino2 für die Rekrutierung der Corepressoren an die ICRE-haltigen Promotoren zuständig ist (Kliewe *et al.*, 2017). Um diese Funktion zu erfüllen, müsste Ino2 aber in der Lage sein, mit Sin3 bzw. Cyc8 zu interagieren. Daher wurden *in vitro*-Interaktionstests mit Hilfe der „GST-Pulldown“-Methode zwischen Ino2 und Sin3 bzw. Cyc8 durchgeführt. Um zu überprüfen, ob eine solche Wechselwirkung eventuell generelle Bedeutung besitzt, wurden des Weiteren neben Ino2 auch die Aktivatoren Pho4 und Hac1 auf Interaktion mit den Corepressoren untersucht.

3.1.1 Expression von HA₃-markiertem Sin3 und Cyc8

Für die Analyse der Sin3- und Cyc8-Interaktion mit Ino2, Pho4 und Hac1 wurde HA₃-markiertes Sin3-Volllängenprotein und der N-Terminus von Cyc8 (AS 1-398; enthält die 10 TPR-Motive) verwendet, um zunächst die Interaktion zwischen den Corepressoren und den Aktivatoren der Hefe *S. cerevisiae* zu untersuchen. Die Expressionsplasmide für beide Proteine lagen bereits vor, zum einen pCW117

(Wagner *et al.*, 2001) zur Expression von HA₃-Sin3 in Hefe. Das Plasmid wurde in den proteasedefizienten *S. cerevisiae*-Stamm C13-ABY.S86 transformiert, in Selektivmedium angezogen und anschließend ein Rohextrakt gewonnen, der das markierte Protein enthielt. Für die bakterielle Synthese von HA₃-Sin3 diente das Plasmid pSW11 (Walz, 2008) sowie der proteasedefiziente *E. coli* Stamm BL21 mit zusätzlichen tRNA-Genen zur effektiven Expression eukaryotischer Proteine. Das Expressionsplasmid pFK77 (Kliewe *et al.*, 2017) wurde dementsprechend für die Expression von HA₃-Cyc8₁₋₃₉₈ in *E. coli* BL21 verwendet. Nach Transformation der Plasmide in den *E. coli*-Stamm und Anzucht in Medium mit Ampicillin- und Chloramphenicol-Zusatz zur Selektion wurde ein Rohextrakt gewonnen, der das markierte Protein enthielt. Für die Expression von HA₃-Cyc8 wurde die Induktion bei einer OD₆₀₀ zwischen 0,4 und 0,6 für 2 Stunden bei 37°C durchgeführt. Da dieses übliche Verfahren für die Expression bei dem HA₃-Sin3-Volllängenprotein zu starken Abbruchbanden führte, wurde die Induktion lediglich bei 16°C für 2 Stunden durchgeführt, um einen vorzeitigen Abbau des synthetisierten Fremdproteins in *E. coli* zu verhindern bzw. zu reduzieren. Abbildung 3.1 zeigt den immunologischen Nachweis von HA₃-Sin3 in Hefe und *E. coli* sowie von HA₃-Cyc8₁₋₃₉₈ in *E. coli*.

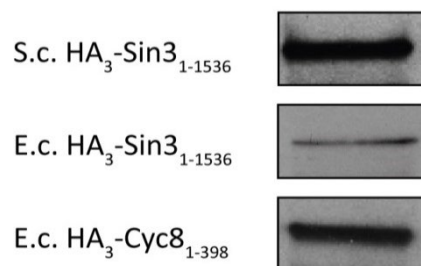


Abbildung 3.1: Expressionskontrolle von HA₃-Sin3 und HA₃-Cyc8 aus *S. cerevisiae* bzw. *E. coli*. Der Hefegesamtzellextrakt mit überexprimiertem HA₃-Sin3 (176 kDa) wurde aus pCW117-Transformanten des Stammes C13-ABY.S86 nach Anzucht in SCD-Ura-Flüssigmedium und Glasperlenaufschluss gewonnen. Zur bakteriellen Synthese dienten die Plasmide pSW11 (HA₃-Sin3) bzw. pFK77 (HA₃-Cyc8₁₋₃₉₈, 46 kDa) sowie der *E. coli*-Stamm BL21 (Anzucht in YTG-Medium unter Zugabe von Ampicillin und Chloramphenicol; Aufschluss mittels Ultraschall). Von den gewonnenen Gesamtproteinzellextrakten wurden ca. 50 µg Gesamtprotein für den Western-Blot mit anschließender Immunodetektion mit Hilfe Peroxidase-gekoppelter Anti-HA-Antikörper eingesetzt.

3.1.2 Charakterisierung der Interaktion von Ino2 mit Sin3 und Cyc8

Um zunächst festzustellen, ob das Volllängenprotein Ino2 mit Sin3 und Cyc8₁₋₃₉₈ interagiert, wurde das affinitätschromatografische Verfahren des „GST-Pulldowns“ durchgeführt, bei dem eine mögliche Interaktion zweier Proteine *in vitro* analysiert werden kann. Dafür muss ein Interaktionspartner mit dem bakteriellen Enzym Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniert und an einer Glutathion-Sepharose-Matrix immobilisiert werden. Dieses Matrix-gebundene Enzym wird mit einem Gesamtzellextrakt inkubiert, der den zweiten an das Epitop HA₃ gekoppelten Interaktionspartner enthält. Das GST-fusionierte Protein sowie, im Falle einer Interaktion, das daran gebundene HA₃-epitopmarkierte Protein werden nach diversen Waschschritten mittels freiem Glutathion eluiert. Das

HA₃-epitopmarkierte Protein lässt sich mittels Western-Blot Analyse und anschließender Immunodetektion mit Anti-HA-Antikörpern nachweisen.

Das hier verwendete GST-Ino2-Volllängenprotein wurde mit Hilfe des bereits vorliegenden Expressionsplasmids pSS56 (Schwank *et al.*, 1995) in *E. coli* BL21 exprimiert. Als Negativkontrolle diente reines GST, welches mit Hilfe des Vektors pGEX-SCS ebenfalls in *E. coli* BL21 exprimiert wurde. Um vergleichbare Mengen an GST-Proteinen für die Interaktionsstudien einzusetzen, wurde vorher die Expressionsstärke der einzelnen Konstrukte im Coomassie-gefärbten SDS-Gel abgeschätzt. Nur wenn in der GST-Kontrolle kein Signal detektiert werden konnte, wurden die Interaktionssignale als positiv gewertet. Das Ergebnis der „GST-Pulldowns“ zwischen Ino2 mit Sin3 und Cyc8 ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

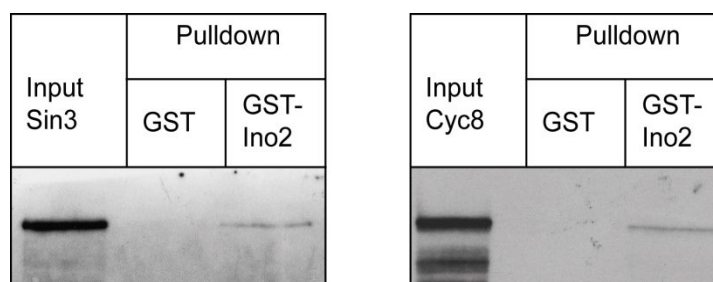


Abbildung 3.2: In vitro-Interaktion zwischen Ino2 und Sin3 bzw. Cyc8. Auf Interaktion untersucht wurde das vollständige Aktivatorprotein Ino2 als GST-Fusion (codiert durch das Plasmid pSS56) mit HA₃-Sin3 (pCW117) aus Hefezell-extrakt und HA₃-Cyc8₁₋₃₉₈ (pFK77) aus *E. coli*-Extrakt. Jeweils links wurde die Input-Kontrolle des jeweiligen HA₃-epitopmarkierten Proteins aufgetragen. Bei den Interaktionstests diente GST als Negativkontrolle (Mitte), während die rechte Spur die Corepressor-Interaktion zeigt. Die GST-Proteine wurden an GSH-Sepharose immobilisiert und mit vorgeklärtem Proteinextrakt inkubiert, der die genannte HA₃-Fusion enthielt. Nach mehrmaligem Waschen mit 1 x PBS wurden die GST-Proteine mittels freiem GSH eluiert und die Eluate durch SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot und Immunodetektion analysiert.

Das vollständige Ino2 interagiert sowohl mit Sin3 aus dem Hefezell-extrakt als auch mit Cyc8₁₋₃₉₈ aus einem *E. coli*-Gesamtzell-extrakt, wie die Abbildung zeigt. Weitere Studien ergaben, dass Sin3 aus einem *E. coli*-Gesamtzell-extrakt ebenfalls zur Interaktion mit Ino2 fähig ist (vgl. Abbildung 3.3), was auf eine direkte Interaktion beider Proteine hindeutet.

3.1.2.1 Konstruktion von GST-Ino2-Verkürzungen und gerichtete Mutagenese von *INO2*

Um die Interaktionsdomäne für die Corepressoren innerhalb des Ino2-Proteins einzugrenzen, wurden verschiedene Verkürzungen des Proteins synthetisiert und an einen GST-Tag gekoppelt. Einige entsprechende Plasmide lagen schon vor: pSS56 (AS 1-304), pWTH12 (AS 1-135), pWTH11 (AS 135-304), pWTH4 (AS 119-212; Heyken *et al.*, 2005) und pRAR99 (AS 1-118; Aref, 2014). Da sich der Aminosäurebereich 119-212 als sehr interessant erwies (siehe Abbildung 3.3), wurden in diesem Abschnitt weitere Verkürzungen vorgenommen. Hierfür wurden zunächst durch PCR mit Hilfe spezifischer Oligonucleotide verschiedene Genfragmente aus der genomischen DNA des Wildtypstammes JS91.15-23 amplifiziert und mit künstlichen Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI (5'-Ende) und *Hind*III (3'-Ende) versehen. Die PCR-Produkte wurden anschließend mit diesen Enzymen

geschnitten und in den ebenso gespaltenen Vektor pGEX-SCS hinter das GST-Gen, welches unter der Kontrolle des Ptac-Promotors steht, inseriert. Die dabei entstandenen Plasmide pMS35 und pMS37 enthalten die Ino2-Genabschnitte 119-195 und 119-165 (aufgeführt in Abbildung 3.3). Um eine weitere Charakterisierung der vermeintlichen Interaktionsdomäne vornehmen zu können, wurde in dem Aminosäurebereich 119-212 eine gerichtete Mutagenese der Aminosäuren Phenylalanin, Leucin und Asparaginsäure an den Stellen 130-132 durchgeführt (ausgetauscht gegen Alanin; im Folgenden als Mutation FLD-AAA bezeichnet). Diese Mutation ist laut Heyken *et al.* (2005) kritisch für die Interaktion zwischen Opi1 und Ino2. Zur gerichteten Mutagenese wurden spezifische Oligonucleotide sowie das Plasmid pWTH4 als Matrize verwendet. Die korrekte Einführung der gewünschten Sequenzveränderungen in das neu entstandene Plasmid pMS38 (GST-Ino2, AS 119-212 FLD-AAA) sowie die Abwesenheit ungewollter Mutationen wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt (LGC-Genomics, Berlin). Alle bereits vorhandenen wie auch die neu konstruierten Plasmide mit GST-Ino2 Fusionen wurden in den *E. coli*-Stamm BL21 transformiert, unter selektiven Bedingungen angezogen und zur Induktion der Expression mit IPTG behandelt. Alle Proteinverkürzungen konnten exprimiert, an GSH-Sepharose gebunden und mittels freiem GSH wieder eluiert werden (nicht gezeigt).

3.1.2.2 Kartierung der Sin3/Cyc8- Interaktionsdomäne in Ino2

Da das Ino2-Volllängenprotein mit Sin3 und Cyc8 interagieren kann, wurden die beschriebenen Verkürzungen des Proteins für GST-Pulldown-Experimente eingesetzt, um den Interaktionsbereich in Ino2 mit den Corepressoren eingrenzen zu können. Zunächst wurde getestet, ob der N-terminale Bereich von Ino2 mit den Aktivierungsdomänen TAD1 und TAD2 (AS 1-135) bzw. der C-Terminus des Proteins mit dem bHLH-Motiv (AS 135-304) zur Interaktion mit Sin3 fähig ist. Des Weiteren wurde eine kürzere Variante des N-Terminus (AS 1-100, enthält nur TAD1) getestet.

Wie Abbildung 3.3 zeigt, kann die N-terminale Hälfte von Ino2 (AS 1-135), nicht aber der C-Terminus mit Sin3 und Cyc8 interagieren. Da mit den Aminosäuren 1-100 keine Interaktion mehr möglich war, wurde getestet, ob die im Ino2 Protein zentral gelegene Längenvariante AS 119-212 mit den Corepressoren wechselwirken kann. Da hiermit eine Interaktion nachgewiesen werden konnte, wurden weitere, vom C-Terminus her sukzessive verkürzte Varianten als Interaktionspartner überprüft. Hierdurch konnte die Ino2 AS 119-165 als minimale Domäne festgestellt werden. Die Mutation FLD-AAA an den Stellen 130-132 in der Verkürzung 119-212 führte zu einem Interaktionsverlust im Vergleich zur identisch langen Wildtypvariante. Dieser Befund sowie die Überlappung der noch interagierenden Domänen im AS-Bereich 1-135 und 119-165 erlauben die Schlussfolgerung, dass sich die Minimaldomäne für die Interaktion mit Sin3 und Cyc8 im Aminosäurebereich 119-135 befindet. Diese überlappt mit der Opi1-Interaktionsdomäne RID (Repressor-Interaktionsdomäne), die von Heyken *et al.* (2005) identifiziert wurde.

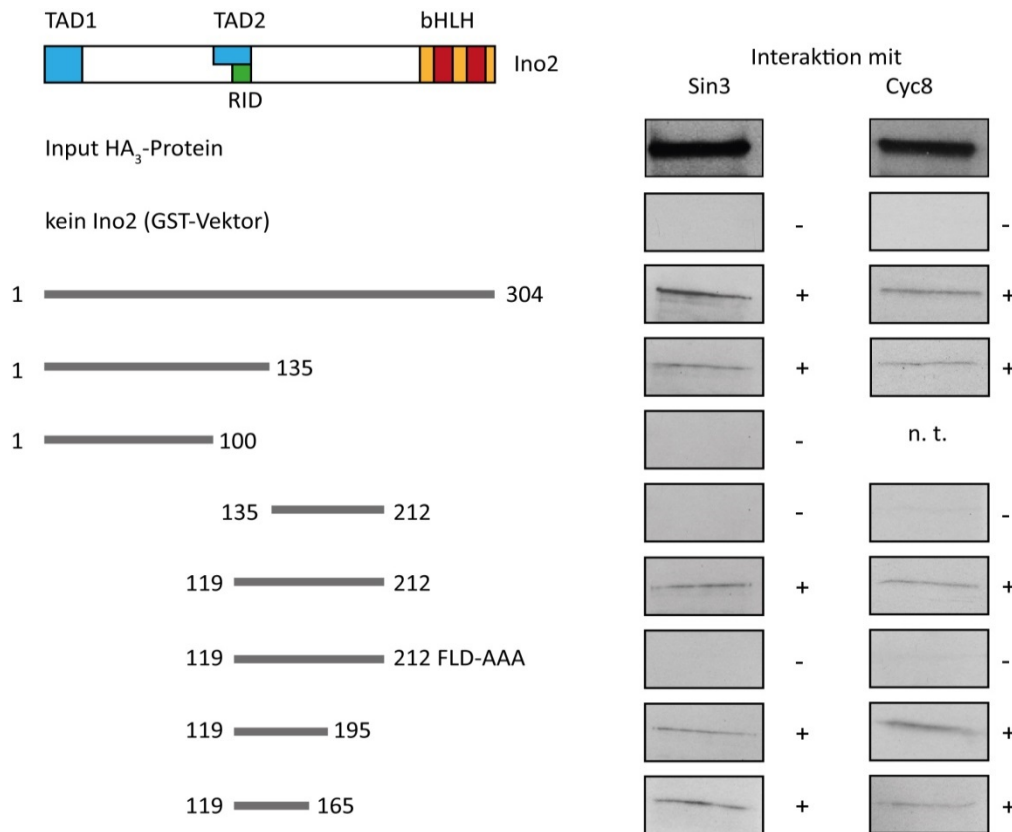


Abbildung 3.3: *In vitro*-Interaktion zwischen Ino2-Verkürzungen und Sin3 bzw. Cyc8. Verschiedene Längenvarianten des Aktivators Ino2 wurden auf Interaktion mit HA₃-Sin3 (codiert durch das Plasmid pSW11) bzw. HA₃-Cyc8₁₋₃₉₈ (pFK77) getestet. Für die Expression der verschiedenen GST-gekoppelten Längenvarianten des Aktivators dienten folgende Plasmide: pSS56 (AS 1-304), pWTH12 (AS 1-135), pMD119 (AS 1-100), pWTH4 (AS 119-212), pRAR99 (AS 135-212), pMS35 (AS 119-195), pMS37 (AS 119-165) und pMS38 (AS 119-212, FLD-AAA). Die Expression aller verwendeten Proteine erfolgte in *E. coli*. Die HA₃-Sin3-enthaltenden Proteinextrakte wurden mit den an GSH-Sepharose immobilisierten GST-Ino2-Varianten inkubiert, nach 2 Waschschritten mit 1 x PBS mit freiem GSH eluiert und für eine SDS-PAGE und Western-Blot mit anschließender Immunodetektion eingesetzt. Die Interaktionsstudien mit HA₃-Cyc8₁₋₃₉₈ erfolgten auf ähnliche Weise, lediglich die Anzahl der Waschschriffe mit 1 x PBS (hier drei) unterschied sich von den Sin3-Interaktionsstudien.

3.1.2.3 Einfluss einer defekten Ino2-Variante auf die Regulation der Expression ICRE-abhängiger Gene

Um die Auswirkungen einer für die Interaktion mit Opi1, Sin3 und Cyc8 unfähigen Ino2-Variante auf die Regulation ICRE-abhängiger Gene zu untersuchen, wurde der Ino2-Wildtyp und die Ino2 FLD-AAA-Mutante in SIRP3-basierenden Stämmen exprimiert. Dieser enthält ein chromosomal integriertes ICRE-CYC1-*lacZ* Reportergen, dessen Expression durch die Konzentration der Phospholipidvorstufen Inositol und Cholin reguliert wird. Für die Untersuchungen diente zum einen der Stamm SIRP3.Δino2 (Schwank *et al.*, 1995), welcher neben dem Reportergen eine Δino2 Nullmutation trägt. Des Weiteren wurde der Stamm SIRP3.Δino2Δopi1 (Wagner *et al.*, 2001) verwendet, der eine zusätzliche Δopi1 Nullmutation aufweist. Die Plasmide pMS100 und pMS101 enthalten den Ino2-Wildtyp bzw. die Ino2-FLD-AAA-Mutation unter der Kontrolle des MET25-Promotors, um die *ino2* Nullmutationen in den beiden Hefestämmen zu komplementieren. Nach Transformation der Stämme mit jeweils einem der

Plasmide sowie dem Leervektor p414-MET25, welcher als Negativkontrolle diente, wurde die Anzucht der Hefezellen in geeignetem Medium unter Zugabe von Methionin, Inositol und Cholin durchgeführt. Methionin (Endkonzentration 1 mM) diente der Schwächung des *MET25*-Promotors, damit keine Überexpression von Ino2 in den Zellen stattfand, sondern die Proteine etwa auf physiologischem Niveau vorlagen (Schwank *et al.*, 1997). Inositol und Cholin wurden in Form einer IC-Stammlösung eingesetzt. Sind ausreichend Inositol und Cholin im Medium vorhanden (je 200 μ M), werden die Strukturgene der Phospholipidbiosynthese nicht exprimiert, es herrschen reprimierende Bedingungen, unter denen der Repressor Opi1 in den Zellkern gelangt und an Ino2 bindet. Sind nicht genügend Inositol und Cholin vorhanden (je 5 μ M), kann die Zelle diese selbst synthetisieren und befindet sich im dereprimierten Zustand. Der Repressor Opi1 gelangt nicht in den Zellkern, sodass sich ein Heterodimer aus Ino2 und Ino4 bilden kann, welches die Expression der Strukturgene der Phospholipidvorstufen aktiviert. Nach Anzucht, Ernte und Aufschluss der Zellen wurde die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität in den entstandenen Proteinextrakten ermittelt. Die Ergebnisse dieses Tests sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tabelle 3.1: Einfluss des Ino2-Wildtyps und der Ino2 FLD-AAA-Mutante auf die Expression ICRE-abhängiger Gene

Genotyp	Spezifische Galactose-Aktivität in (U/mg)			
	SIRP3. Δ ino2		SIRP3. Δ ino2 Δ opi1	
	Repression	Derepression	Repression	Derepression
<i>MET25-INO2</i>	19 \pm 5	196 \pm 28	192 \pm 30	219 \pm 31
<i>MET25-INO2</i> _{FLD-AAA}	90 \pm 15	114 \pm 18	125 \pm 20	136 \pm 28
Leervektor	3 \pm <1	4 \pm 1	3 \pm <1	4 \pm 1

Die Stämme SIRP3. Δ ino2 und SIRP3. Δ ino2 Δ opi1 wurden mit *INO2* (pMS100) bzw. *INO2*_{FLD-AAA} (pMS101) jeweils unter der Kontrolle des *MET25*-Promotors transformiert. Der Leervektor p414-MET25 diente als Negativkontrolle. Die transformierten Stämme wurden in entsprechendem Medium unter reprimierenden Bedingungen (200 μ M Inositol + 200 μ M Cholin) bzw. dereprimierenden Bedingungen (5 μ M Inositol + 5 μ M Cholin) unter Zugabe von Methionin (1 mM) angezogen. Die β -Galaktosidaseaktivität ist angegeben in nmol oNPG, die pro mg Protein pro min hydrolysiert wurden (U/mg). Jedes Experiment repräsentiert den Mittelwert von 8 individuellen Anzuchten und Enzymtests.

Die Ergebnisse des Enzymtests zeigen, dass die Genexpression in Anwesenheit der intakten Regulatorgene *INO2* und *OPI1* unter reprimierenden Bedingungen relativ niedrig ist (19 \pm 5). Liegt aber anstelle des Ino2-Wildtypproteins die Ino2-FLD-AAA-Mutante vor, steigt die Expression etwa um das Vierfache, weil Opi1 hier nicht mehr in der Lage ist, Ino2 zu binden und somit seine reprimierende Wirkung nicht entfalten kann. Unter dereprimierenden Bedingungen ist die Expression zehnmal höher als unter reprimierenden Bedingungen. Allerdings sinkt hier die Expression auf 58%, sobald die Ino2-Mutante anstelle des Wildtyps vorliegt. In der *opi1* Nullmutante verhält es sich ähnlich wie in dem Opi1-exprimierenden Stamm unter dereprimierenden Bedingungen. Die Repression kann nicht erfolgen, was an den hohen β -Galaktosidase-Aktivitäten abgelesen werden kann (192 \pm 30 unter reprimierenden Bedingungen mit Ino2-Wildtyp). Außerdem sinkt die Expression unter reprimierenden

Bedingungen sowie unter dereprimierenden Bedingungen auf ca. 62-65%, wenn die Ino2 FLD-AAA-Mutante vorliegt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Mutation in der RID von Ino2 Auswirkungen sowohl auf die Repression als auch auf die Aktivierung der entsprechenden Gene hat, vermutlich, weil Opi1, Sin3 und Cyc8 (als Repressionsvermittler) nicht länger rekrutiert werden können und aufgrund der Überlappung von RID und TAD2 zusätzlich die Funktion der TAD2 beeinträchtigt ist (Heyken *et al.*, 2005).

3.1.3 Charakterisierung der Interaktion von Pho4 und Hac1 mit Sin3 und Cyc8

Um festzustellen, ob die Interaktionen zwischen Ino2 und den Corepressoren eine Ausnahme darstellt, oder ob es noch weitere Aktivatorproteine gibt, die mit Sin3 und Cyc8 interagieren können, wurden Pho4 und Hac1 für weitere Interaktionsstudien ausgewählt. Pho4 ist ein Aktivator, der ähnlich wie Ino2 ein bHLH-Motiv zur Dimerisierung enthält (Shao *et al.*, 1998) und für die positive phosphatabhängige Regulation einiger Gene des Phosphat-Stoffwechsels (z. B. *PHO5*) zuständig ist (Ogawa und Oshima, 1990). Graumann *et al.* (2004) identifizierten Sin3 neben einer Vielzahl weiterer Proteine als Interaktionspartner von Pho4. Hac1 ist ein Aktivator der UPR („unfolded protein response“, Reaktion der Zelle auf ungefaltete Proteine). Außerdem reguliert Hac1 die Expression von Genen der Phospholipidbiosynthese (Kaufman, 1999).

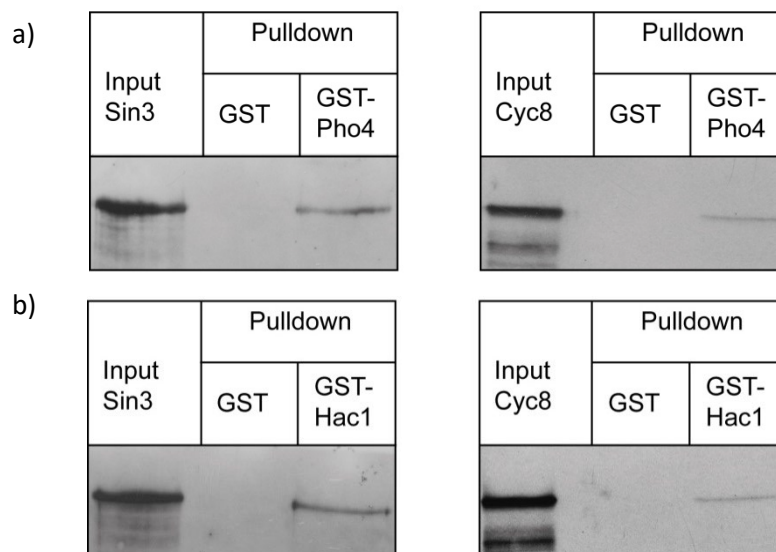


Abbildung 3.4: *In vitro*-Interaktion zwischen Pho4 und Hac1 mit Sin3 bzw. Cyc8.

a) Interaktionsstudien zwischen GST-Pho4₁₋₃₁₂ (codiert durch das Plasmid pWTH54) und HA₃-Sin3 (pCW117) und HA₃-Cyc8 (pFK77).

b) Interaktionsstudien zwischen GST-Hac1₁₋₂₂₀ (codiert durch das Plasmid pFK65) und HA₃-Sin3 (pSW11) und HA₃-Cyc8 (pFK77).

HA₃-Sin3 wurde aus *S. cerevisiae* gewonnen. Alle anderen Proteinextrakte wurden aus *E. coli* BL21 gewonnen. Jeweils links wurde die Input-Kontrolle des jeweiligen HA₃-epitopmarktierten Proteins aufgetragen. GST diente als Negativkontrolle (mittlere Spur). In der rechten Spur wurden die Eluate der Interaktionsexperimente aufgetragen. Die GST-Proteine wurden an GSH-Sepharose immobilisiert und mit vorgeklärten Proteinextrakten inkubiert, die die genannten HA₃-Fusionen enthielten. Nach mehrmaligem Waschen mit 1 x PBS wurden die GST-Proteine mittels freiem GSH von der Sepharose eluiert.

Auch hier wurde das affinitätschromatografische Verfahren des „GST-Pulldowns“ angewandt. Die verwendeten Plasmide für die Pho4-Volllänge (pWTH54; GST-Pho4₁₋₃₁₂) und für den Großteil des Hac1-Proteins (pFK65; GST-Hac1₁₋₂₂₀, AS 221-238 enthalten die TAD und wurden nicht berücksichtigt) lagen bereits vor und wurden für die Überexpression in *E. coli* BL21 verwendet. Die Proteine wurden an GSH-Sepharose immobilisiert und mit HA₃-Sin3- bzw. HA₃-Cyc8₁₋₃₉₈-enthaltendem Proteinextrakt inkubiert. Die in Abbildung 3.4 dargestellten Ergebnisse der „GST-Pulldown“-Experimente zeigen, dass Pho4 und Hac1 weitere Interaktionspartner der Corepressoren Sin3 und Cyc8 darstellen.

3.1.3.1 Kartierung der Sin3/Cyc8- Interaktionsdomäne von Pho4

Frühere Studien beschäftigten sich mit der Frage nach der minimalen Sin3/Cyc8-Interaktionsdomäne innerhalb des Proteins Pho4. Kliewe *et al.* (2017) generierten im Zuge solcher Untersuchungen zahlreiche GST-Pho4-Fusionen, die Teilbereiche des Proteins beinhalteten. Dabei stellte sich heraus, dass sich die Corepressor-Interaktionsdomäne innerhalb von Pho4 auf die Aminosäuren 156-208 beschränkt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in diesem Bereich eine gerichtete Mutagenese durchgeführt. Bei der Auswahl der zu verändernden Aminosäuren diente die FLD-AAA-Mutation in Ino2 (welche zum Interaktionsverlust führte, siehe Abschnitt 3.1.2.2) als Orientierung. Hier folgt auf zwei hydrophobe Aminosäuren eine saure. Ein ähnliches Muster ist in dem minimalen, zur Interaktion fähigen Bereich in Pho4 ebenfalls vorhanden. Hier handelt es sich um die Aminosäuren Leucin, Phenylalanin und Glutaminsäure an den Stellen 170-172, die mittels Mutagenese-PCR in Alanin umgewandelt wurden. Das entstandene Plasmid pMS92 enthielt nun GST-Pho4₁₅₆₋₂₀₈ mit der Mutation LFE-AAA. Dieses Plasmid und pRAR74 (GST-Pho4₁₅₆₋₂₀₈ ohne Mutation) wurden in *E. coli* BL21 transformiert und der durch Ultraschall-Aufschluss der erhaltenen Transformanden entstandene Proteinextrakt für „GST-Pulldown“-Experimente eingesetzt. Als potentielle Interaktionspartner dienten erneut HA₃-Sin3 (pSW11) und HA₃-Cyc8 (pFK77). Als Negativkontrolle wurde der Leervektor pGEX-SCS verwendet, der zur Expression von reinem GST führt. Die erhaltenen Befunde sind in Abbildung 3.5 dargestellt.

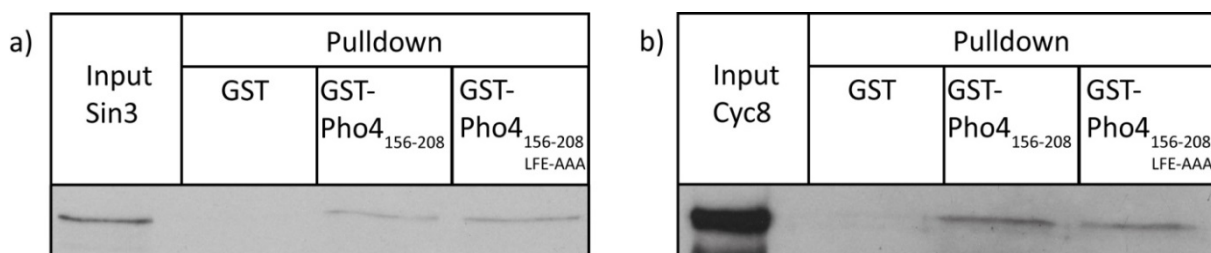


Abbildung 3.5: Charakterisierung der Pho4-Interaktionsdomäne mit Sin3 und Cyc8.

a) Interaktionsstudien zwischen GST-Pho4₁₅₆₋₂₀₈ (codiert durch das Plasmid pRAR74), GST-Pho4₁₅₆₋₂₀₈ LFE-AAA (pMS92) und HA₃-Sin3 (pSW11)

b) Interaktionsstudien zwischen GST-Pho4₁₅₆₋₂₀₈ (codiert durch das Plasmid pRAR74), GST-Pho4₁₅₆₋₂₀₈ LFE-AAA (pMS92) und HA₃-Cyc8 (pFK77).

Alle Proteinextrakte wurden aus *E. coli* BL21 gewonnen. Jeweils links wurde die Input-Kontrolle des jeweiligen HA₃-epitopmarkierten Proteins aufgetragen. GST diente als Negativkontrolle. Die beiden rechten Spuren zeigen die Signale der Interaktionsexperimente. Nach Inkubation der immobilisierten GST-Fusionen mit Zellextrakten, die HA₃-markierte Proteine enthielten, folgten zwei Waschschrte mit 1 x PBS und die Elution mit freiem GSH.

Die Abbildung zeigt die Interaktionen von Sin3 bzw. Cyc8 mit dem Wildtyp Pho4₁₅₆₋₂₀₈ und der Variante Pho4_{156-208 LFE-AAA}. Im Gegensatz zu den Befunden der Ino2-Mutagenese (FLD-AAA) führte eine Einführung von Mutationen in die ähnliche Sequenz LFE nicht zu einem Interaktionsverlust.

3.1.3.2 Eingrenzung der Sin3/Cyc8- Interaktionsdomäne von Hac1

Wie in Abschnitt 3.1.3 dargestellt, handelt es sich bei Hac1 ebenfalls um einen Interaktionspartner der Corepressoren Sin3 und Cyc8. Um auch hier eine Interaktionsdomäne eingrenzen zu können, wurden zwei Teilsequenzen des Proteins hinter GST fusioniert und der damit erhaltene Proteinextrakt für „GST-Pulldown“-Experimente eingesetzt. Hierbei handelt es sich zum einen um die N-terminale Hälfte mit der DNA-bindenden bZIP-Domäne (AS-Bereich 1-120) sowie um die C-terminale Hälfte (AS-Bereich 121-217). Auch hier wurde die im C-Terminus lokalisierte TAD (AS 221-238) nicht berücksichtigt.

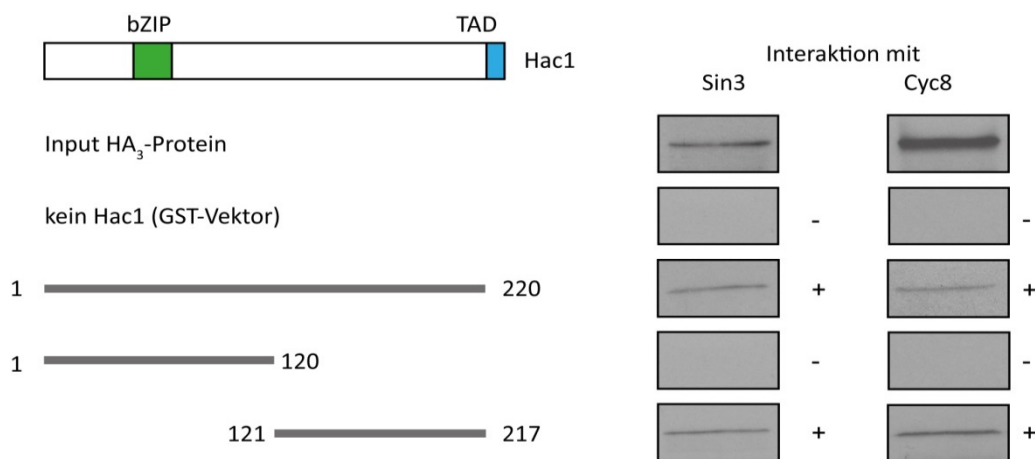


Abbildung 3.6: Eingrenzung der Hac1-Interaktionsdomäne mit Sin3 und Cyc8. Interaktionsstudien wurden mit den Längenvarianten GST-Hac1₁₋₂₂₀ (pFK65), GST-Hac1₁₋₁₂₀ (pFK105) und Hac1₁₂₁₋₂₁₇ (pFK106) sowie HA₃-Sin3 (pSW11) bzw. HA₃-Cyc8 (pFK77) durchgeführt. Alle Proteinextrakte wurden aus *E. coli* BL21 gewonnen. Nach Inkubation der immobilisierten GST-Fusionen mit Zellextrakten, die HA₃-markierte Proteine enthielten, folgten zwei Waschschriffe mit 1 x PBS und die Elution mit freiem GSH.

Wie Abbildung 3.6 zeigt, dienen im Hac1 die C-terminalen Aminosäuren 121-217, nicht aber der N-Terminus des Proteins als Interaktionsdomäne mit Sin3 und Cyc8. Interessanterweise enthält auch dieser Abschnitt ein Sequenzmotiv, das den Aminosäuren FLD im Ino2 ähnelt (Leucin, Phenylalanin und Asparaginsäure an den Stellen 185-187, ebenfalls zwei hydrophobe und eine saure Aminosäure). Auch hier wurde mittels gerichteter Mutagenese ein Austausch gegen drei Alaninreste vorgenommen (LFD-AAA Variante). Allerdings war die so veränderte Längenvariante noch immer zur Interaktion mit den Corepressoren in der Lage (Abbildung 3.7).

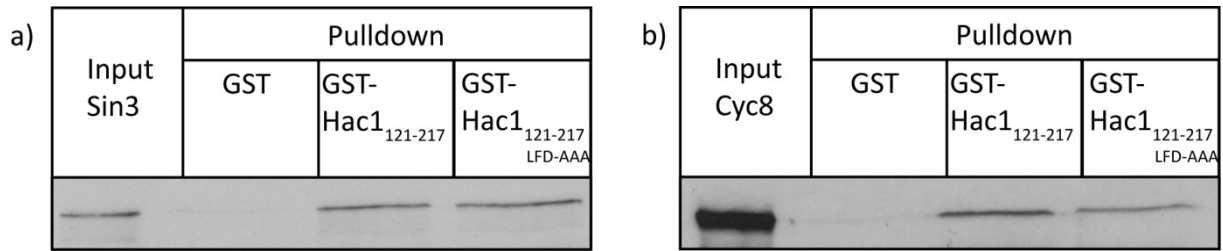


Abbildung 3.7: Charakterisierung der Hac1-Interaktionsdomäne mit Sin3 und Cyc8.

a) Interaktionsstudien zwischen GST-Hac1₁₂₁₋₂₁₇ (codiert durch das Plasmid pFK106), GST-Hac1₁₂₁₋₂₁₇ LFD-AAA (pMS93) und HA₃-Sin3 (pSW11)

b) Interaktionsstudien zwischen GST-Hac1₁₂₁₋₂₁₇ (codiert durch das Plasmid pFK106), GST-Hac1₁₂₁₋₂₁₇ LFD-AAA (pMS93) und HA₃-Cyc8 (pFK77).

Alle Proteinextrakte wurden aus *E. coli* BL21 gewonnen. Jeweils links wurde die Input-Kontrolle des jeweiligen HA₃-epitopmarktierten Proteins aufgetragen. GST diente als Negativkontrolle. Die beiden rechten Spuren zeigen die Signale der Interaktionsexperimente. Nach Inkubation der immobilisierten GST-Fusionen mit Zellextrakten, die HA₃-markierte Proteine enthielten, folgten zwei Waschschritte mit 1 x PBS und die Elution mit freiem GSH.

3.1.4 Kartierung der Aktivator-Interaktionsdomäne im Sin3-Corepressor

Sin3 ist mit ca. 174 kDa ein sehr großes Protein mit mehreren bereits kartierten Domänen, den sogenannten PAHs (= „paired amphipathic helices“) und einem konservierten C-Terminus (Grigat *et al.*, 2012). Daher ist es natürlich interessant festzustellen, welche Domäne oder Domänen von den Aktivatoren, die im Rahmen dieser Arbeit auf Interaktion mit dem Corepressor untersucht wurden, kontaktiert werden. Dafür wurden für mehrere GST-Pulldown-Experimente bereits vorhandene HA₃-markierte Sin3-Längenvarianten und die Aktivatoren als GST-Fusionen eingesetzt.

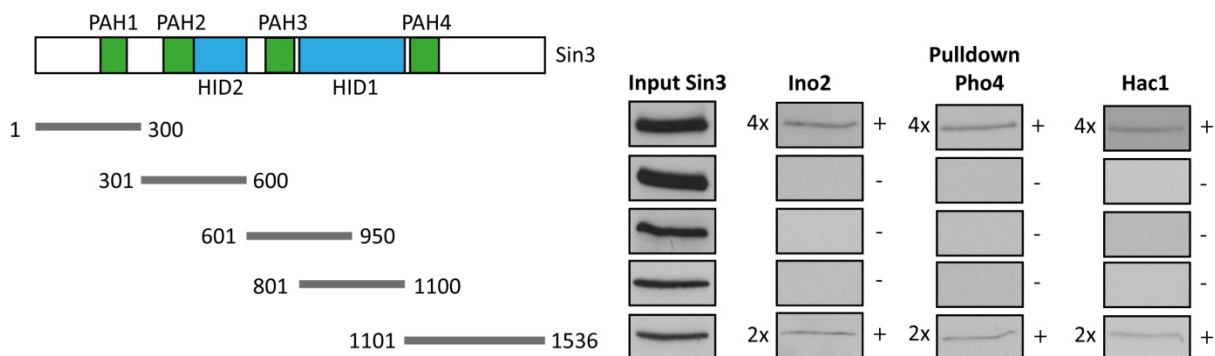


Abbildung 3.8: Kartierung der Aktivator-Interaktionsdomäne innerhalb des Corepressors Sin3. Es wurden Interaktionsstudien mit verschiedenen Längenvarianten des HA₃-Sin3-Proteins, codiert durch die Plasmide pCW83 (AS 1-300), pYJ91 (AS 301-600), pYJ90 (AS 601-950), pYJ89 (AS 801-1100) und pMP20 (AS 1101-1536) durchgeführt. Alle Proteinextrakte wurden aus *E. coli* BL21 gewonnen und für GST-Pulldown-Experimente eingesetzt. Die entsprechenden GST-Proteine wurden durch die Plasmide pWTH12 (GST-Ino2₁₋₁₃₅), pWTH54 (GST-Pho4₁₋₃₁₂) und pFK65 (GST-Hac1₁₋₂₁₇) codiert und ebenfalls in *E. coli* BL21 hergestellt. Die HA₃-Protein-enthaltenden Proteinextrakte wurden mit GSH-Sepharose inkubiert, an die die entsprechenden GST-Proteine immobilisiert wurden. Nach 4 bzw. 2 Waschschritten mit 1 x PBS wurden die mittels GSH erhaltenen Eluate für eine Western-Blot Analyse mit anschließender Immunodetektion eingesetzt.

Die PAH1 umfasst den AS-Bereich 1-300 und wird von dem Plasmid pCW83 codiert. PAH2 und HID2 („histone deacetylase interaction domain“) liegen im Bereich 301-600, dafür codiert das Plasmid pYJ91. pYJ90 beinhaltet die Aminosäuren 601-950 und somit PAH3. Die HID1 liegt im AS-Bereich 801-1100, für dessen Expression das Plasmid pYJ89 diente. Sowohl PAH4 als auch HCR (= „highly conserved region“) befinden sich im AS-Bereich 1101-1536, welcher vom Plasmid pMP20 exprimiert wird. All diese Plasmide sind Hefe-Expressionsplasmide und die hiermit gewonnenen Hefe-Proteinextrakte wurden mit GSH-Sepharose inkubiert, an die bereits die GST-Proteine GST-Ino2₁₋₁₃₅, GST-Pho4₁₋₃₁₂ und GST-Hac1₁₋₂₁₇ immobilisiert wurden. Diese Proteine wurden in den vorherigen Interaktionsstudien bereits verwendet und aus *E. coli* BL21 gewonnen.

Abbildung 3.8 zeigt, dass der AS-Bereich 1-300, welcher die PAH1 beinhaltet, von allen drei Aktivatorproteinen kontaktiert wird. Mit anderen Sin3-Bereichen scheint es keine Interaktion zu geben. Lediglich der C-Terminus (PAH4 + HCR) kann ebenfalls von den Aktivatoren gebunden werden, wenn die Waschstringenz während des Experiments herabgesetzt wird, was für eine Redundanz der Aktivator-Corepressor-Interaktion innerhalb von Sin3 spricht.

3.1.5 Test auf *in vivo*-Interaktion zwischen Sin3 und den Aktivatoren Ino2 und Pho4

Die bisher charakterisierten Interaktionen zwischen Corepressoren und Aktivatoren wurden mit Hilfe des „GST-Pulldowns“, eines *in-vitro* Verfahrens, untersucht. Mit dem „Yeast-Two-Hybrid“ System (Fields und Song, 1989) besteht die Möglichkeit, diese Wechselwirkungen auch *in vivo* zu bestätigen. Das System basiert auf dem modularen Aufbau vieler eukaryotischer Transkriptionsaktivatoren aus DNA-Bindedomäne (DBD) und Transkriptionsaktivierungsdomäne (TAD). Das in dieser Arbeit verwendete „Yeast-Two-Hybrid“ System beruht auf dem Gal4-Aktivator, der an UAS_{GAL}-Sequenzen bindet und Gene zur Verwertung von Galaktose anschaltet. Werden DBD und TAD räumlich voneinander getrennt, wirkt Gal4 nicht mehr transkriptionsaktivierend. Um *in vivo* Wechselwirkungen zweier potenzieller Interaktionspartner zu untersuchen, werden diese jeweils an eine der Gal4-Domänen fusioniert, welche im Falle einer Interaktion wieder in räumliche Nähe gebracht werden. Diese Rekonstruktion des Aktivators Gal4 führt zur nachfolgenden Expression UAS_{GAL}-abhängiger Gene.

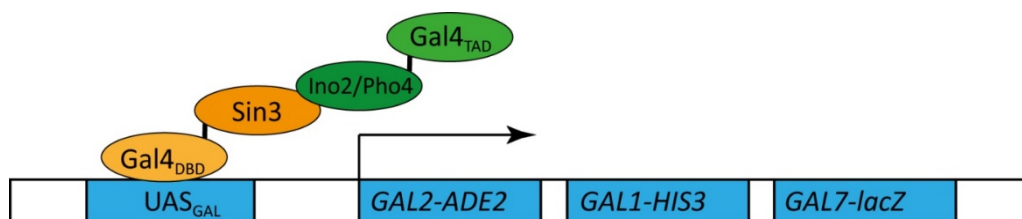


Abbildung 3.9: Prinzip des „Yeast-Two-Hybrid“ Systems zum Nachweis möglicher *in vivo*-Interaktionen zwischen Sin3 und den Aktivatoren Ino2 und Pho4. Die Gal4_{DBD}-Sin3-Fusion bindet an ein UAS_{GAL}-Element. Bei einer Interaktion von Sin3 mit einer Gal4_{TAD}-Aktivator-Fusion wird der Aktivator rekonstruiert, indem die Funktionsdomänen in räumliche Nähe gebracht und nachfolgende UAS_{GAL}-abhängige Gene exprimiert werden. In diesem Fall handelt es sich um ein Reportergen (*GAL2-ADE2*), das eine Adenin-Auxotrophie des Stammes PJ69-4A ausgleicht.

Der in dieser Arbeit verwendete Stamm PJ69-4A (James *et al.*, 1996) enthält mehrere solcher UAS_{GAL}-abhängiger Gene, unter anderem eine GAL2-ADE2-Fusion, welche die Selektion auf Adenin-freiem Medium erlaubt, denn eine Rekonstruktion des Gal4-Aktivators führt in dem ansonsten Adenin-auxotrophen Stamm zu Wachstum auf entsprechendem Selektionsmedium. Mit Hilfe des Vektors pGAD-C1 (James *et al.*, 1996) konnten GAL4_{TAD}-Fusionen unter Kontrolle des ADH1-Promotors hergestellt werden. Dafür wurden die Genbereiche Ino2₁₁₉₋₂₁₂, Ino2₁₀₁₋₂₁₂ und Pho4₁₀₅₋₂₀₈ mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide amplifiziert und nach einem Verdau mit *Bam*HI und *Pst*I in den Vektor pGAD-C1 inseriert. Dabei entstanden die Plasmide pMS79, pMS80 und pMS81. Eine weitere Gal4_{TAD}-Opi1 Fusion, die als Positivkontrolle diente, lag bereits vor (codiert vom Plasmid pCW82), ebenso wie die Gal4_{DBD}-Fusionen mit Sin3₁₋₃₀₀ (enthält PAH1) und Sin3₁₋₈₈₈-Genbereichen (PAH1 und PAH2) im Vektor pGBD-C1 (James *et al.*, 1996), codiert durch die Plasmide pJW6 und pJW16.

Für die *in vivo*-Interaktionsversuche wurde der Stamm PJ69-4A zunächst mit den Sin3-Fusionen der Plasmide pJW6 und pJW16 und dem Leervektor pGBD-C1 transformiert, und auf SCD-Trp-Medium selektiert. In einer zweiten Transformation wurden jeweils die Ino2-, Pho4-, oder Opi1-Fusionen (Plasmide pMS79, pMS80, pMS81, pCW82 und der Leervektor pGAD-C1) in die Zellen gebracht. Die Selektion erfolgte nun auf SCD-LT-Medium (-Leu -Trp). Durch Stempeln der Doppeltransformanden auf das Dreifachselektionsmedium SCD-ALT (-Ade -Leu -Trp) konnten Protein-Protein-Interaktionen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.10 dargestellt.

Die Abbildung zeigt das Ergebnis der Experimente zu den *in vivo*-Interaktionsstudien zwischen Sin3 und Aktivatoren Ino2 und Pho4. Es wurden jeweils Genbereiche der Aktivatoren ausgewählt, die bei *in vitro*-Interaktionsstudien Kontakt zu den Corepressoren aufnehmen konnten. Als Positivkontrolle diente der Repressor Opi1, der erwartungsgemäß mit Sin3 interagiert und demnach Wachstum auf SCD-ALT zeigte. Die Negativkontrollen, bei denen jeweils ein Leervektor statt eines Fusionsplasmids bei der Transformation eingesetzt wurde, konnten auf dem Dreifachselektivmedium nicht wachsen. Die Kombination aus Sin3 und den Aktivatoren führte ebenfalls zu keinem Wachstum auf SCD-ALT, somit konnte die *in vitro*-Interaktion *in vivo* nicht bestätigt werden, da es sich vermutlich, im Gegensatz zur Opi1-Sin3-Bindung, nur um eine vorübergehende, schwache Interaktion handelt. Es ist vorstellbar, dass weitere *in vivo*-Experimente, die auf einem anderen Prinzip beruhen, ein anderes Ergebnis liefern könnten.

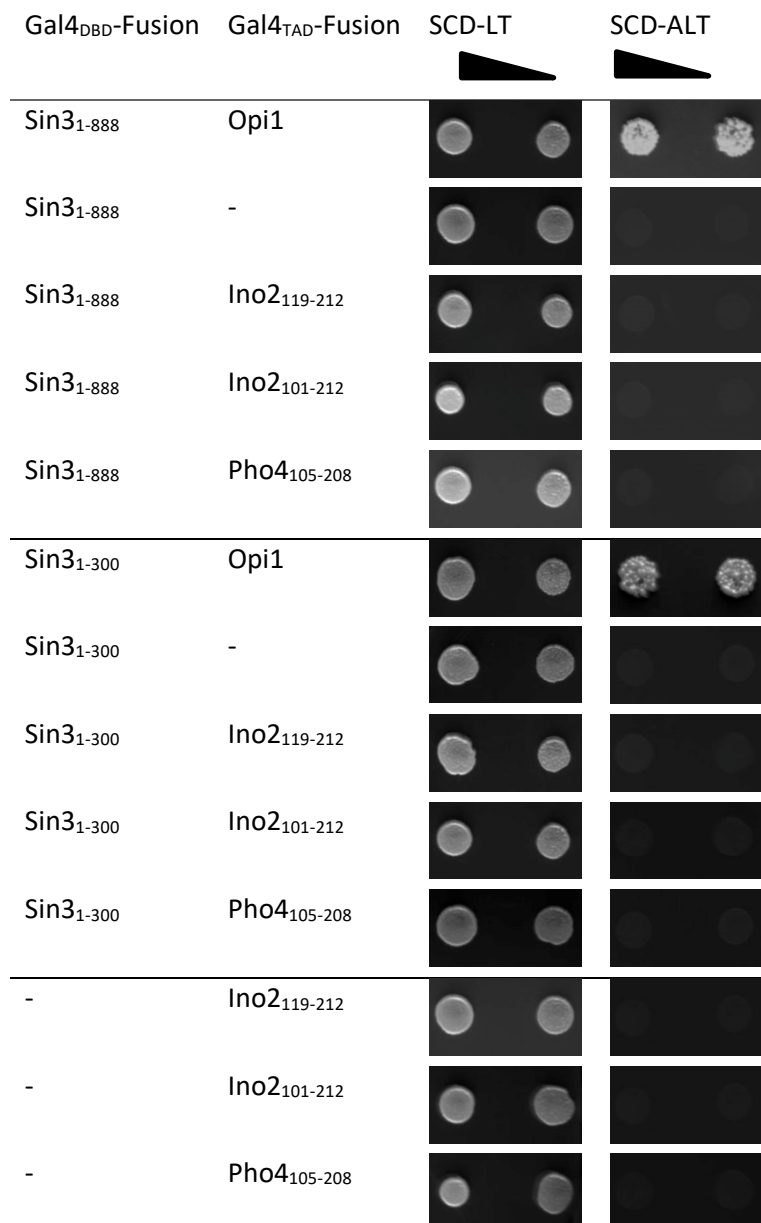


Abbildung 3.10: „Yeast-Two-Hybrid“ Experimente zum Test auf *in vivo*-Interaktion zwischen Sin3 und den Aktivatoren Ino2 und Pho4. Der Stamm PJ69-4A wurde mit Kombinationen aus Gal4_{TAD}- und Gal4_{DBD}-Fusionen cotransformiert. Die Cotransformanten wurden auf SCD-Leu-Trp (-LT)-Selektivmedium und SCD-Ade-Leu-Trp (-ALT)-Selektivmedium gestempelt und 3 Tage bei 30°C inkubiert. Wachstum auf SCD-LT war ein Nachweis für eine erfolgreiche Transformation. Wachstum auf SCD-ALT wies auf eine *in vivo*-Interaktion zwischen den potenziellen Interaktionspartnern hin. Die Kombination aus Sin3₁₋₃₀₀ (PAH1) bzw. Sin3₁₋₈₈₈ (PAH1+PAH2) mit Opi1 diente als Positivkontrolle. Für die Negativkontrollen wurde jeweils ein Leervektor (-) statt der Fusionsplasmide bei der Transformation eingesetzt.

3.2 Studien zur Promotorrekrutierung des Aktivators Ino2 durch den basalen Transkriptionsfaktor TFIID

Der Aktivator Ino2 ist für die Expression der Strukturgene der Phospholipid-Biosynthese (*INO1*, *CHO2*, *FAS1/FAS2*) verantwortlich (Schüller *et al.*, 1992a). Im Promotorbereich dieser Gene befindet sich zumindest ein sogenanntes ICRE-Motiv („inositol/choline-responsive element“), welches von einem Heterodimer aus Ino2/Ino4 erkannt und gebunden wird. Beide Proteine verfügen über ein basisches Helix-Loop-Helix-Motiv, welches für die DNA-Erkennung und -Bindung notwendig ist (Schüller *et al.*, 1992b; Ambroziak and Henry, 1994; Schwank *et al.*, 1995). Ino4 hat die Aufgabe des Kernimports (Kumme *et al.*, 2008), während Ino2 zwei TADs im N-Terminus besitzt, welche die Genaktivierung vermitteln (Schwank *et al.*, 1995). Mutationsanalysen der effektiveren TAD1 an in mehreren Hefen stark konservierten Stellen zeigten, dass die Kombination aus einer sauren und einer hydrophoben Aminosäure (Asparaginsäure an Stelle 20 und Phenylalanin an Stelle 21) wichtig für die aktivierende Wirkung von Ino2 ist. Ein Austausch dieser Aminosäuren zu Lysin und Arginin (im Folgenden als D20K F21R bezeichnet) führte zu einer Aufhebung der aktivierenden Wirkung (Dietz *et al.*, 2003).

In Eukaryoten gibt es verschiedene Möglichkeiten für die transkriptionale Aktivierung, zum einen die unterschiedliche Zugänglichkeit der DNA in Promotorbereichen durch Chromatinremodellierung, zum anderen die Rekrutierung genereller Transkriptionsfaktoren an Promotorbereiche und die damit einhergehende Erleichterung des PIC-Zusammenbaus (Präinitiationskomplex, Hahn und Young, 2011). Von zentraler Bedeutung für den Aufbau des PIC ist der generelle Transkriptionsfaktor TFIID, der als erster PIC-Bestandteil an Basalpromotoren bindet (z. B. an die TATA-Box und das Initiatorelement, Inr) und ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Transkriptionsaktivierung spielt (Lee *et al.*, 2000). Er besteht aus dem TATA-Box-Bindeprotein (TBP) und 14 weiteren Faktoren, den sogenannten Taf-Proteinen (Taf=“TBP-associated factor“); zusammen erkennen sie die erwähnten Basalpromotorsequenzen und unterstützen den PIC-Zusammenbau (Papai *et al.*, 2011). Einige der Taf-Untereinheiten (Taf5, Taf6, Taf9, Taf10 und Taf12) sind auch im SAGA-Komplex vertreten, was auf eine gewisse Redundanz beider Komplexe hinweist. Frühere Arbeiten differenzierten zwischen Taf-abhängigen Genen (besitzen zumeist grundlegende „house-keeping“-Funktionen und sind schwach reguliert) und SAGA-abhängigen Genen (betreffen zelluläre Stressreaktionen und sind stark vom Nährstoffangebot reguliert; Huisinga und Pugh, 2004), während neuere Ergebnisse eher eine weitreichende Redundanz beider Komplexe hervorheben (Baptista *et al.*, 2017; Warfield *et al.*, 2017; Donczew *et al.*, 2020). Bisherige Studien zu Transkriptionsfaktoren, die TADs von Aktivatoren kontaktieren, wurden zumeist mit den Hefe-Aktivatoren Gal4 und Gcn4 sowie dem viralen Aktivator VP16 durchgeführt. Studien zu Interaktionspartnern der TADs von Ino2 sind bisher nicht durchgeführt worden, obwohl die Aktivierung des Ino2-abhängigen Gens *INO1* sehr anfällig gegenüber Störungen innerhalb der generellen Transkriptionsmaschinerie ist.

3.2.1. Interaktionsstudien zwischen TFIID und Ino2

Hintze *et al.* (2017) beschrieben erstmals direkte Interaktionen zwischen fünf Taf-Proteinen und den TADs von Ino2, ebenso die Ino2-abhängige Rekrutierung einiger Tafs zu ICRE-enhaltenden Promotoren und die wichtige Rolle der Tafs für die Aktivierung des *INO1*-Gens. Von den 14 getesteten Taf-Proteinen der Hefe wurden fünf, nämlich Taf1, Taf4, Taf6, Taf10 und Taf12 durch „GST-Pulldown“-Experimente als direkte Interaktionspartner von Ino2 identifiziert. Taf5 kann nur indirekt an Ino2 binden. Die fünf direkten Interaktionen wurden weiterhin charakterisiert, wobei sich herausstellte, dass all diese Taf-Proteine mit der TAD1 von Ino2 und lediglich Taf10 zusätzlich mit der TAD2 von Ino2 interagieren. Bei weiteren GST-Pulldown-Studien, bei denen neben der Wildtyp-TAD1 auch die mutierte Variante mit den Aminosäure-Austauschen D20K F21R eingesetzt wurde, zeigte sich, dass keines der fünf Taf-Proteine mehr in der Lage war, Kontakt zur Ino2-TAD1 aufzunehmen. Diese Befunde sind eine Erklärung für den Verlust der aktivierenden Wirkung der TAD1 nach einem Austausch dieser Aminosäuren.

3.2.2 Charakterisierung der Interaktion zwischen Taf1 und Ino2

Taf1 ist in *S. cerevisiae* mit 120 kDa die zweitgrößte TFIID-Untereinheit und besitzt verschiedene Funktionen wie die strukturelle Organisation des Komplexes (Takahata *et al.*, 2003; Bai *et al.*, 1997), die Bindung an Promotoren (Wang *et al.*, 2014; Menica und Struhl, 2001) und möglicherweise die Histon-Acetylierung (Mizzen *et al.*, 1996; siehe aber auch Bhattacharya *et al.*, 2014). Im N-Terminus des Proteins liegen die sogenannten TANDs 1-3 (Taf1 N-terminal domain), welche eine negative Rolle bei der Genaktivierung spielen, indem sie an TBP binden und somit die Promotorerkennung verhindern (Mal *et al.*, 2004). Diese Autoinhibierung innerhalb des TFIID-Komplexes kann durch Interaktion mit Aktivatoren aufgehoben werden, sodass TBP freigelassen wird und Promotorstrukturen erkennen und binden kann (Kotani *et al.*, 2000). Tatsächlich konnten Hintze *et al.* (2017) im Aminosäurebereich 1-100 in Taf1 eine Interaktionsdomäne für Ino2-TAD1 kartieren. Dieser Bereich enthält die TAND1 und TAND2, aber nur einen Teil der TAND3 und wurde Aktivator-Bindedomäne (ABD) genannt. Taf1-Längenvarianten ohne diese ABD1 konnten aber weiterhin Kontakt zu Ino2 aufnehmen, sodass in weiteren Interaktionsstudien die ABD2 im Aminosäurebereich 182-250 gefunden wurde. Dieser Bereich wurde von Bai *et al.* (1997) als Taf-Taf-Interaktionsdomäne beschrieben.

3.2.2.1 Taf1-Sequenzvergleich zwischen *Saccharomyces*-Hefen

Für den ABD2-enhaltenden Bereich wurde ein Sequenzvergleich mit anderen *Saccharomyces*-Stämmen durchgeführt, wobei zu erkennen ist, dass in diesem Bereich mehr basische als saure Aminosäuren vorkommen, die zudem stärkere Ähnlichkeiten zwischen den unterschiedlichen Hefe-Stämmen aufweisen als die sauren Aminosäuren. Um die ABD2 präziser zu charakterisieren wurden Aminosäuren ausgewählt, die für eine gerichtete Mutagenese in Frage kommen: es handelt sich um Lysin und Tyrosin an den Stellen 206 und 207 (die allerdings nur moderat konserviert sind), Leucin an 208 und 209 und das darauffolgende Lysin an Stelle 210 (identisch bei allen *Saccharomyces*-Hefen) sowie Asparaginsäure (215) und Glutaminsäure (217). Diese Aminosäuren wurden jeweils gegen Alanin ausgetauscht.

<i>S. cerevisiae</i>	185	EP---DMSD	DKHKK	KATK	LDLIN	-----	HEKY	LLKK	YFF	DFE	217																																				
<i>S. mikatae</i>	184	ES---EILD	NKHKK	PTKL	LDLIN	-----	HEKY	LLKK	YFF	DFE	216																																				
<i>S. paradoxus</i>	186	EP---EIPD	NKHKK	PTKL	LDLIN	-----	HEKY	LLKK	YFF	DFE	218																																				
<i>S. uvarum</i>	184	EPQEYQMS	DNKHKK	PTKL	LDLIN	-----	HEKY	LLKK	YFF	DFE	219																																				
<i>S. bayanus</i>	184	EPQEYQMS	DNKHKK	PTKL	LDLIN	-----	HEKY	LLKK	YFF	DFE	219																																				
<i>S. castelii</i>	194	DAGSFSLS	NR	TNKL	LRSS	QE	I	IN	NEEL	KRIEQ	ERVANE	DKLL	KSY	YFD	FK	243																															
<i>S. kluyveri</i>	148	-----	LEEK	QRE	REK	Q	T	LL	Q	-----	EE	QL	LL	KY	YFF	Q	FQ	176																													
<i>S. cerevisiae</i>	218	KGKIL	LKWN	NKLI	IYRR	SV	YH	WHSE	EIS	SRV	---	KK	PF	MPL	NL	KFK	VQ	QDD	DK	RRL	264																										
<i>S. mikatae</i>	217	KGKTL	LKWN	NKLI	IYRR	LAP	YH	WHRD	AS	RLL	---	KK	PF	MPL	NL	KKI	IQ	QDD	DK	RRL	263																										
<i>S. paradoxus</i>	219	KGKIL	LKWN	NKLI	IYRR	YVP	YH	WHRE	T	SRV	---	KK	PF	MPL	NL	KFK	VQ	QDD	DK	RV	265																										
<i>S. uvarum</i>	220	KGKIL	LKWN	NKLI	IYRR	YAS	YH	WHRD	V	SRV	---	KK	PF	MPL	NL	KFR	VQ	QDD	DK	RRL	266																										
<i>S. bayanus</i>	220	KGKIL	LKWN	NKLI	IYRR	YAS	YH	WHRD	V	SRV	---	KK	PF	MPL	NL	KFR	VQ	QDD	DK	RRL	266																										
<i>S. castelii</i>	244	RGKIL	LKWN	KFI	IYR	KYGR	YQ	WHRD	A	T	I	M	G	E	V	L	K	P	L	F	S	N	L	K	F	K	V	G	R	D	T	R	K	S	293												
<i>S. kluyveri</i>	177	KGKVL	LKV	E	K	T	I	P	K	Q	V	S	R	Y	Q	W	Q	R	D	L	Y	L	A	N	R	Q	I	K	P	L	V	P	L	K	L	K	I	E	V	E	P	D	Q	K	R	I	226

Abbildung 3.11: Taf1-ABD2-Sequenzvergleich zwischen verschiedenen *Saccharomyces*-Hefen. Der Sequenzvergleich wurde nach ClustalW (www.yeastgenome.org) durchgeführt. Dargestellt ist der ABD2-enthaltende Taf1-Sequenzbereich. Aminosäuren, die in allen Stämmen identisch sind, sind gelb unterlegt. Rosa sind diejenigen mit starker Ähnlichkeit, während die grün markierten lediglich schwache Ähnlichkeiten aufweisen. Die rot umrandeten Aminosäuren wurden für eine gerichtete Mutagenese ausgewählt: K206 Y207, L208 L209 K210 sowie D215 E217.

3.2.2.2 Gerichtete Mutagenese ausgewählter Aminosäuren in Taf1

Für die gerichtete Mutagenese der ABD2 von Taf1 wurde eine PCR mit sequenzspezifischen Oligonucleotiden durchgeführt, welche neben identischen flankierenden Sequenzen auch die gewünschte Mutation auf Ebene der Nucleotide tragen. Als Matrize diente das Plasmid pLvD22, welches Wildtyp-Taf1₁₈₂₋₂₅₀ enthielt. Nach erfolgter Mutagenese-PCR wurden Plasmide, die ein korrektes Restriktionsmuster zeigten, durch DNA-Sequenzierung verifiziert (Firma LGC Genomics). Die hierbei entstandenen Plasmide enthielten Taf1₁₈₂₋₂₅₀ mit N-terminalem HA₃-Tag und den gewünschten Mutationen: pMS135 (K206A Y207A), pMS136 (L208A L209A K210A) und pMS137 (D215A E217A). Die Proteine wurden nach Transformation der Plasmide in *E. coli* BL21 exprimiert und der entstandene Gesamtzellproteinextrakt für einen „GST-Pulldown“ eingesetzt, um die Interaktion der veränderten Taf1-ABD2 mit der des Wildtyp-Taf1 zu vergleichen. Als Interaktionspartner diente die TAD1 von Ino2, die als GST-Fusion mit Hilfe des Plasmids pSH117 ebenfalls in *E. coli* BL21 exprimiert wurde. Als Negativkontrolle diente GST, welches mit Hilfe des Plasmids pGEX-SCS exprimiert werden konnte (Hintze *et al.*, 2017).

Komarnitsky *et al.* zeigten 1998, dass der Glucose-regulierte Aktivator Adr1 Kontakt zu Taf1, Taf5, Taf6 und TBP aufbauen kann. Adr1 besitzt vier TADs, von denen die TAD4 als Interaktionsdomäne mit den TFIID-Untereinheiten identifiziert wurde. Hintze *et al.* (2017) konnten nachweisen, dass die TAD1 von Ino2 und TAD4 von Adr1 die gleichen Domänen von Taf1 kontaktieren. Deshalb war es interessant zu sehen, ob nicht nur die Aktivatorbindedomänen übereinstimmen, sondern ob sogar die Mutationen

ähnliche Effekte haben. Dafür wurde das Plasmid pLvD28, welches die GST-Adr1-TAD4 codiert (AS 642-705), ebenfalls in *E. coli* BL21 transformiert und das erhaltene Fusionsprotein für „GST-Pulldown“-Studien eingesetzt.

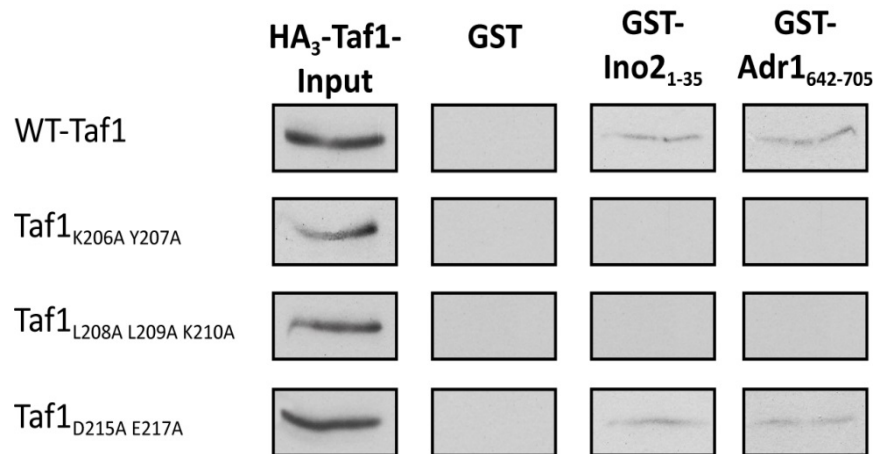


Abbildung 3.12: Charakterisierung der Taf1-ABD 2. Es wurden Interaktionsstudien zwischen HA₃-Taf1₁₈₂₋₂₅₀, der TAD1 von Ino2 und der TAD4 von Adr1 durchgeführt. Alle Proteinextrakte wurden aus *E. coli* BL21 gewonnen und für die „GST-Pulldown“-Studien eingesetzt. Dafür wurden die Expressionsplasmide pMS135 (HA₃-Taf1₁₈₂₋₂₅₀ K206A Y207A), pMS136(HA₃-Taf1₁₈₂₋₂₅₀ L208A L209A K210A), pMS137 (HA₃-Taf1₁₈₂₋₂₅₀ D215A E217A), pLvD22 (HA₃-Taf1₁₈₂₋₂₅₀), pSH117 (GST-Ino2₁₋₃₅), pLvD28 (GST-Adr1₆₄₂₋₇₀₅) und pGEX-SCS (GST) eingesetzt. Die GST-Proteine wurden an GSH-Sepharose immobilisiert und mit vorgeklärtem HA₃-Proteinextrakt inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit 1 x PBS wurden die GST-Proteine mittels freiem GSH von der Sepharose eluiert und das Eluat durch SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot und Immunodetektion analysiert.

Abbildung 3.12 zeigt, dass die Interaktion von Taf1 mit beiden Aktivatoren durch den Austausch der basischen Aminosäuren K206A Y207A und L208A L209A K210A beeinträchtigt wird, während der Austausch der sauren Aminosäuren D215A E217A keinen Interaktionsverlust im Vergleich zum Wildtyp-Taf1₁₈₂₋₂₅₀ zur Folge hat. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass basische und hydrophobe Aminosäuren eine relevante Rolle für die Taf1-TAD-Interaktion spielen.

3.2.2.3 Funktionelle Charakterisierung der Mutation LLK-AAA mittels „GST-Pulldown“

Nachdem die Taf1-ABD2 Dreifach-Mutante LLK-AAA nicht mehr an die Ino2 TAD1 binden konnte, stellte sich die Frage, ob man zwischen der Rolle der basischen und hydrophoben Aminosäuren für die Interaktion mit Ino2 unterscheiden kann. Dafür wurden zwei neue Taf1₁₈₂₋₂₅₀-Varianten durch gerichtete Mutagenese erzeugt: (1) Die hydrophoben Leucin-Reste wurden durch Alanin ersetzt, während Lysin unverändert blieb; (2) Die Leucin-Reste blieben unverändert, während das basische Lysin gegen Alanin ausgetauscht wurde. Als Matrize diente das Plasmid pSH128. Die hierbei entstandenen Plasmide hießen pMS110 (LLK-AAK) und pMS111 (LLK-LLA) und enthielten GST-Taf1₁₈₂₋₂₅₀ mit den entsprechenden, durch Sequenzierung verifizierten, Mutationen. Diese wurden wiederum in *E. coli* BL21 exprimiert und für einen GST-Pulldown eingesetzt. Als HA₃-markiertes Protein diente Ino2₁₋₁₃₅.

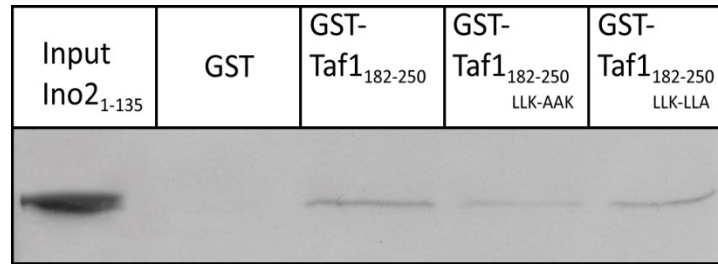


Abbildung 3.13: Charakterisierung der Taf1-Mutationen L208A L209A und K210A. Es wurde eine Interaktionsstudie zwischen Ino2-TADs und Taf1₁₈₂₋₂₅₀ Varianten durchgeführt. Hierzu wurden Wildtyp-Taf1 als GST-Fusion (codiert durch pSH128) sowie die Varianten GST-Taf1₁₈₂₋₂₅₀ L208A L209A (codiert durch pMS110) bzw. GST-Taf1₁₈₂₋₂₅₀ K210A (codiert durch pMS111) eingesetzt. Als Interaktionspartner diente HA₃-Ino2₁₋₁₃₅ (pSH148). Alle Proteine wurden in *E. coli* BL21 exprimiert und nach Elution von der GSH-Sepharose durch SDS-PAGE und darauffolgenden Western-Blot mit anschließender Immunodetektion analysiert.

Die Abbildung zeigt, dass beide Taf1-Varianten immer noch zur Interaktion mit Ino2 fähig sind. Dies deutet darauf hin, dass die Kombination aus basischen und hydrophoben Aminosäuren relevant für die Interaktion zwischen Taf1 und Ino2-TAD1 ist und nicht nur eine dieser Aminosäure-Eigenschaften allein.

3.2.2.4 Funktionelle Charakterisierung der Mutation KY-AA mittels „Plasmid Shuffling“

Nachdem gezeigt wurde, dass die in Taf1₁₈₂₋₂₅₀ eingeführte Mutation K206A Y207A zu einem Verlust der *in vitro*-Bindung an die TAD1 von Ino2 führt, stellte sich die Frage, ob diese Doppelmutation auch phänotypische Auswirkungen hat, wenn sie im vollständigen *TAF1*-Gen auftritt. Für diese Fragestellung wurde das sogenannte „Plasmid Shuffling“ angewendet (Sikorski und Boeke, 1991). Bei diesem Versuchsprinzip wird ein Stamm mit einer chromosomalen Nullmutation im zu untersuchenden Gen (hier: *TAF1*) mit Hilfe einer Gendisruptionscassette konstruiert. Da das zu testende Gen unverzichtbar für das Überleben der Hefe ist, ist ein sog. „Rescue Plasmid“ notwendig, welches zuvor in Form eines *ARS CEN URA3*-Plasmids mit dem gewünschten Gen in die Zelle transformiert wird (Abb. 3.14a). Im Anschluss wird die zu untersuchende Genvariante, die auf einem weiteren *ARS CEN LEU2*-Plasmid vorliegt, in die Zelle transformiert (Abb. 3.14b). Nach dem Anwachsen auf SCD-Ura-Leu-Doppelselektivmedium werden die Zellen auf SCD-Leu+FOA-Medium kultiviert. 5-Fluororotsäure (FOA) wird durch die vom intakten *URA3*-Gen codierte Orotidin-5'-phosphat Decarboxylase in die toxische Verbindung 5'-Fluoruracil umgewandelt, was dazu führt, dass Zellen mit *URA3*-Gen auf FOA-haltigem Medium abgetötet werden. Demnach haben Zellen, die auf ebensolchem Medium Wachstum zeigen, das *ARS CEN URA3*- „Rescue Plasmid“ verloren und können mit der mutierten Genvariante auf dem *ARS CEN LEU2*-Plasmid leben, die die Aufgabe des Wildtypgens übernimmt (Abb. 3.14c). Ist kein Wachstum auf diesem Medium möglich, hat die Mutation letale Auswirkungen auf die Zelle. Außerdem ist es möglich, dass ein konditionaler Phänotyp auftritt, weil ein teildefektes Protein gebildet wird (z. B. Wachstum bei 25°C, jedoch nicht mehr bei 37°C).

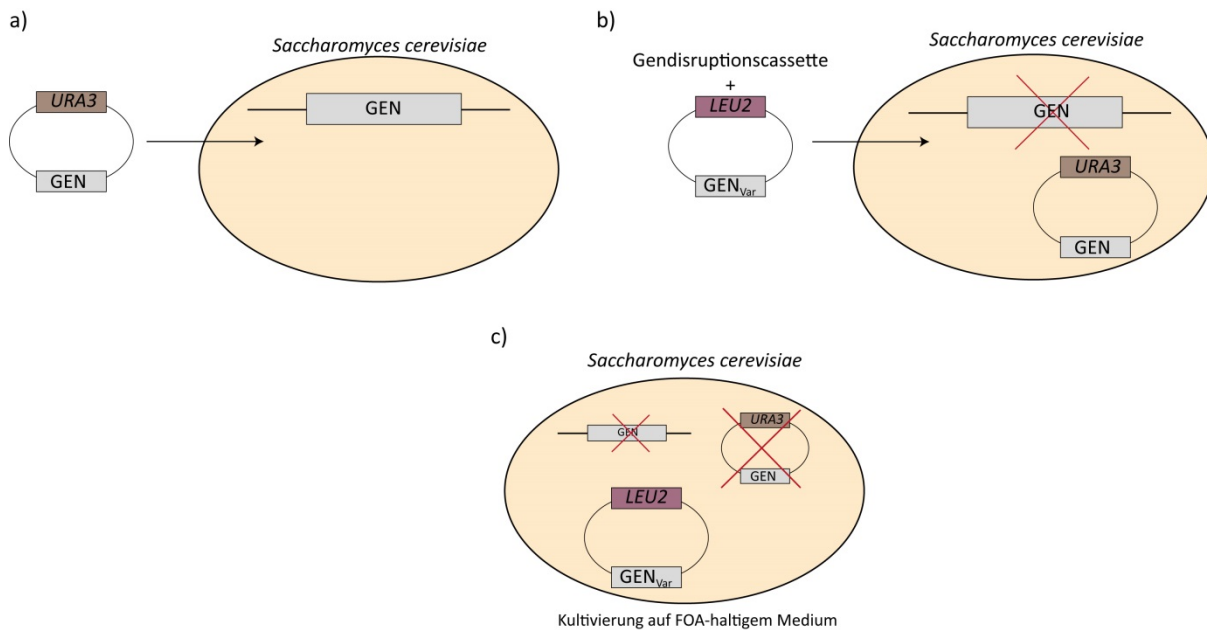


Abbildung 3.14: Prinzip des „plasmid shuffling“. Dargestellt ist das Prinzip des sog. „plasmid shuffling“, bei dem „in vivo“ die Auswirkung einer Mutation oder einer anderen Variation eines essenziellen Gens auf das Wachstumsverhalten der Zelle untersucht werden kann. Dafür wird eine Hefezelle zunächst mit einem „rescue plasmid“ transformiert und anschließend eine Gendisruption durchgeführt (a). Die gewünschte Genvariante wird ebenfalls in die Zelle transformiert (b). Nach Anwachsen auf Doppelselektivmedium werden die Zellen auf FOA-haltigem Medium kultiviert, um sicherzugehen, dass das „rescue plasmid“ mit *URA3*-Marker verlorengegangen ist. Kommt es zu Wachstum auf FOA-haltigem Medium, komplementiert die Genvariante die Nullmutation.

Konstruktion der Gendisruptionscassette für das chromosomale *TAF1*-Gen

Für die Konstruktion der $\Delta taf1::HIS3$ Gendisruptionscassette wurden flankierende Sequenzen des *TAF1*-Gens mittels PCR und sequenzspezifischen Oligonucleotiden amplifiziert und in den Vektor pUC19-HIS3, welcher einen *HIS3*-Selektionsmarker sowie zwei Polylinkerregionen enthält, kloniert. Die 5'-Flanke (340 bp) wurde mit Hilfe der Oligonucleotide TAF1_5F_EcoRI und TAF1_5F_SacI sowie chromosomaler Wildtyp-DNA als Matrize amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *SacI* geschnitten und in den mit den gleichen Enzymen linearisierten Vektor pUC19-HIS3 inseriert. Hierbei entstand das Plasmid pGE1. Für die 3'-Flanke wurde eine PCR mit chromosomaler Wildtyp-DNA und den Oligonucleotiden TAF1_3F_XbaI und TAF1_3F_SalI durchgeführt. Das entstandene 380 bp große Fragment wurde mit den Enzymen *XbaI* und *SalI* geschnitten und in das mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisierte Plasmid pGE1 inseriert. Hierbei entstand das Plasmid pGE2 mit der $\Delta taf1::HIS3$ Gendisruptionscassette, die durch Spaltung mit den Enzymen *EcoRI* und *SalI* als 2,5 kb-Fragment freigesetzt werden konnte.

Konstruktion des Stammes MSY5B

Zunächst musste das „rescue plasmid“ pGE3 konstruiert werden, ein Centromerplasmid, das *TAF1* unter Eigenpromotorkontrolle und einen *URA3*-Selektionsmarker enthält. Dafür wurden die Oligonucleotide TAF1_5'_SacI und TAF1_3'_XhoI für eine PCR mit chromosomaler WT-DNA verwendet. Hierbei entstand ein 3,6 kb großes Fragment, welches das vollständige *TAF1*-Gen mit flankierenden Sequenzen enthielt. Dieses wurde mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *XhoI*

geschnitten und in den mit den gleichen Enzymen linearisierten Vektor pRS416 inseriert. Das entstandene Plasmid pGE3 wurde in den Hefestamm JS91.15-23 transformiert. Nach erfolgreicher Selektion auf SCD-Ura-Medium wurde aus dem Plasmid pGE2 die Gendisruptionscassette für das chromosomale *TAF1*-Gen mittels Restriktionsspaltung mit *EcoRI* und *Sall* freigesetzt und cotransformiert. Die Selektion erfolgte auf SCD-His-Medium. Mit den erhaltenen His-prototrophen Transformanten wurde eine Verifizierungs-PCR unter Verwendung der sequenzspezifischen Oligonucleotide HIS3-P und *Taf1_ORF* durchgeführt, um die korrekte Insertion der Gendisruptionscassette (1100 bp-Fragment, nicht dargestellt) zu kontrollieren. Um das Fehlen des chromosomalen Wildtyp-*TAF1* zu kontrollieren, wurde eine weitere PCR mit den Oligonucleotiden *TAF1_ORF* und *TAF1_VER* durchgeführt, bei der erwartungsgemäß kein Fragment entstand (bei der Positivkontrolle zum Nachweis des *TAF1*-Wildtypgens entstand ein 815 bp großes Fragment). Der Stamm erhielt den Namen MSY5B.

Konstruktion weiterer *TAF1*-Centromerplasmide

Das Plasmid pSH191, ein *ARS CEN LEU2 TAF1*-Plasmid, lag bereits vor. Es beruht auf dem Vektor p415-MET25 und beinhaltet Wildtyp-*TAF1* unter Eigenpromotorkontrolle. Dieses Plasmid dient im Verlauf des „Plasmid Shufflings“ als Positivkontrolle, während der Leervektor als Negativkontrolle eingesetzt wird. Um den Einfluss der KY-AA-Variante zu untersuchen, sollte diese Mutation in das vollständige *TAF1*-Gen eingeführt werden. Dafür wurde aus pSH191 durch Restriktionsverdau mit *BamHI* und *XbaI* ein Fragment gewonnen (2,3 kb), welches unter anderem den zu verändernden Teil des *TAF1*-Gens enthielt. Dieses Fragment wurde in den Vektor pUC19 inseriert, wobei das Plasmid pSH192 entstand, welches mit insgesamt 5 kb geeignet für eine gerichtete Mutagenese war. Diese wurde mit Hilfe sequenzspezifischer Oligonucleotide wie bereits in Abschnitt 3.2.2.2 beschrieben durchgeführt, sodass das Plasmid pSH198 entstand (verifiziert durch Sequenzierung; Firma LGC Genomics). Dieses mutagenisierte Teilfragment sollte nun mit dem Rest des *TAF1*-Gens kombiniert werden, sodass eine vollständige *TAF1*_{K206A Y207A}-Variante entsteht. Dafür mussten pSH191 und pSH198 mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *XbaI* geschnitten werden. Bei der Spaltung von pSH191 entsteht ein 2,3 kb langes Fragment, welches durch das 2,3 kb lange Fragment mit eingeführter Mutation aus pSH198 ersetzt werden soll. Da der Austausch zweier gleich langer Fragmente schwer zu überprüfen ist, wurde pSH191 zunächst mit *BglII* enzymatisch verdaut, sodass das *BamHI/XbaI*-Fragment nun nicht mehr 2,3 kb, sondern 1,4 kb lang ist. Nun ergibt sich bei der Insertion des veränderten *TAF1*-Gens in das neue Plasmid pSH191Δ*BglII* ein sichtbarer Größenunterschied, sodass das neue Plasmid mit Sicherheit die gewünschte Mutation trägt. Dieses Plasmid trägt den Namen pMS109 (*ARS CEN LEU2 TAF1*_{K206A Y207A}).

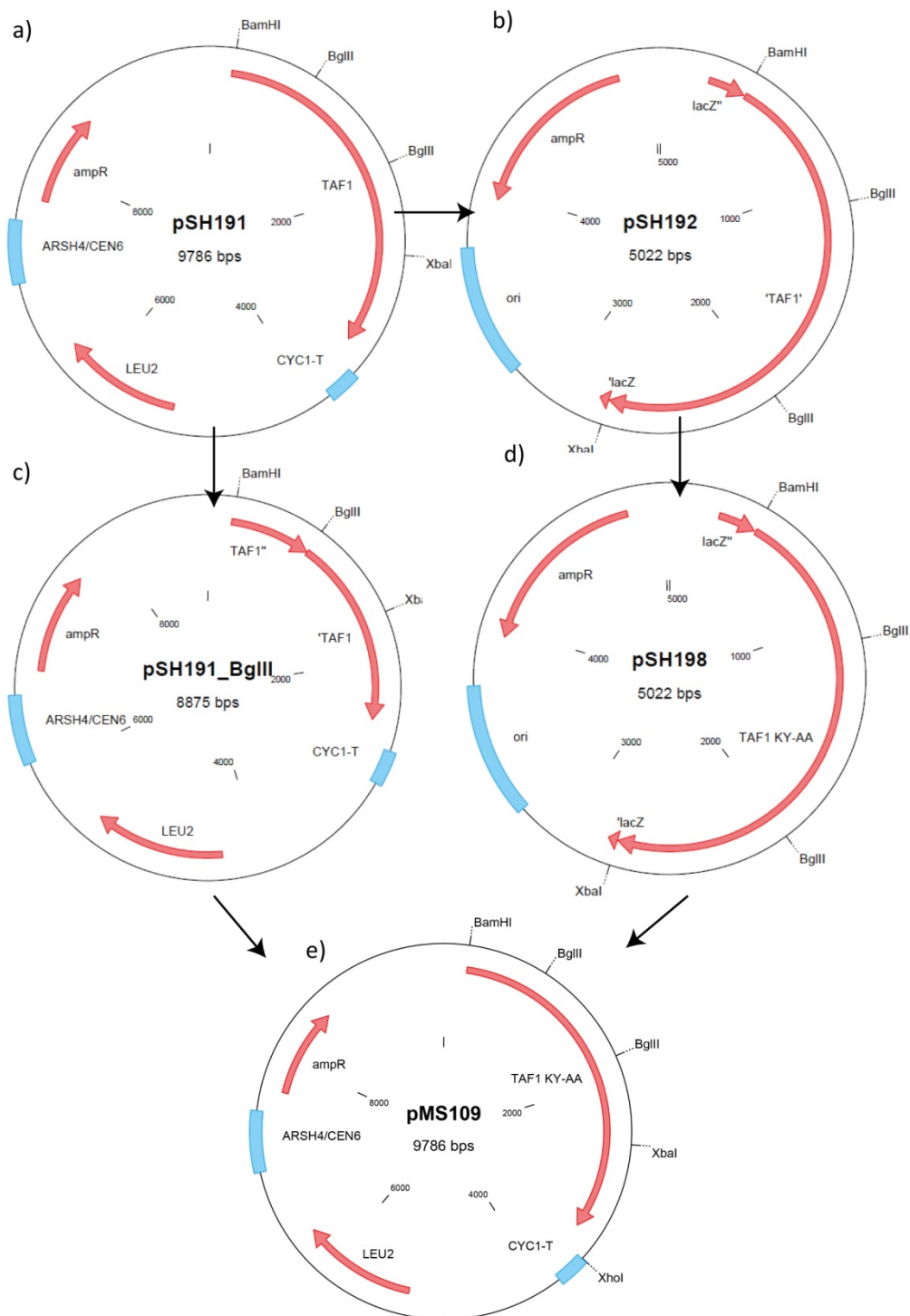


Abbildung 3.15: Konstruktion weiterer TAF1-Centromerplasmide. Darstellung der Klonierungsschritte für das Plasmid pMS109 mit dem Genotyp *ARS CEN LEU2 TAF1_{K206A Y207A}*. a) pSH191 enthält das TAF1 Wildtypgen unter Eigenpromotorkontrolle. b) Ein 2,3 kb-Fragment wurde mittels *BamHI/XbaI*-Verdau aus pSH191 in pUC19 kloniert, es entstand pSH192. c) pSH191 wurde mit *BglII* geschnitten, es entstand pSH191Δ*BglII*. d) pSH192 diente als Matrice für eine gerichtete Mutagenese, bei der KY an den Positionen 206 und 207 gegen Alanin-Reste ausgetauscht wurden; es entstand pSH198. e) Bei dem Verdau von pSH198 mit *BamHI/XbaI* entstand ein 2,3 kb langes Fragment, beim Verdau von pSH191Δ*BglII* mit *BamHI/XbaI* dagegen ein 1,4 kb langes Fragment. Diese Fragmente wurden gegeneinander ausgetauscht, sodass pMS109 entstand.

Durchführung des „Plasmid Shufflings“

Für das „Plasmid Shuffling“ wurde der Stamm MSY5B mit den Plasmiden p415-MET25 (Negativkontrolle), pSH191 (Positivkontrolle) und pMS109 transformiert. Die Selektion erfolgte bei 30°C für 3 Tage auf SCD-Ura-Leu-Doppelselektivmedium. Nach Anwachsen der Transformanden wurden diese auf SCD-Leu und SCD-Leu+FOA-Medium übertragen, um eine Selektion auf Verlust des *URA3*-Plasmids zu gewährleisten.

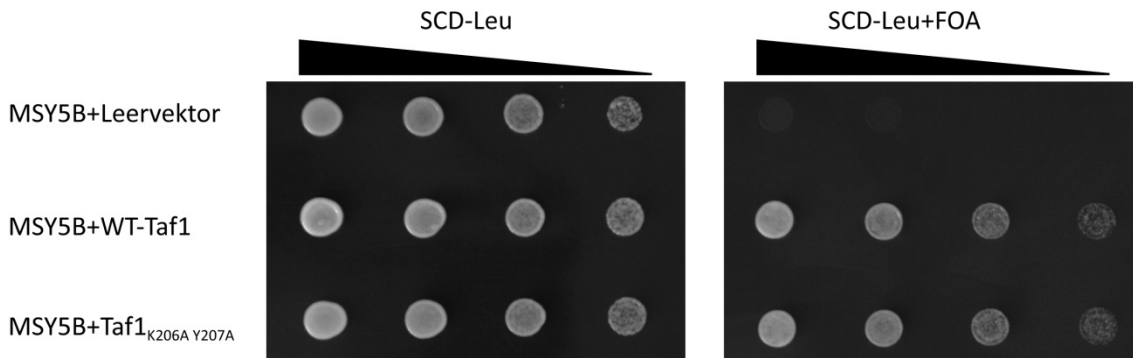


Abbildung 3.16: „Plasmid Shuffling“ mit *TAF1* K206A Y207A. Gezeigt ist das Wachstumsverhalten nach der Transformation des Stammes MSY5B mit p415-MET25 (Negativkontrolle), pSH191 (Positivkontrolle) und pMS109 (Taf1-Variante) auf SCD-Leu und SCD-Leu+FOA.

Allen Transformanden war es möglich, auf SCD-Leu-Medium zu wachsen, nur die Negativkontrolle (ohne *TAF1* Gen) war auf FOA-haltigem Medium nicht überlebensfähig. Die auf pMS109 codierte Taf1-Variante konnte den Verlust des chromosomalen Wildtyp-Taf1 ausgleichen.

Außerdem wurde der Einfluss von verfügbarem Inositol im Medium auf das Wachstum der Zellen untersucht. Dafür wurden die Zellen zum einen auf Inositol-freies Medium, zum anderen auf Inositol-haltiges Medium übertragen und 3 Tage bei 30°C inkubiert.

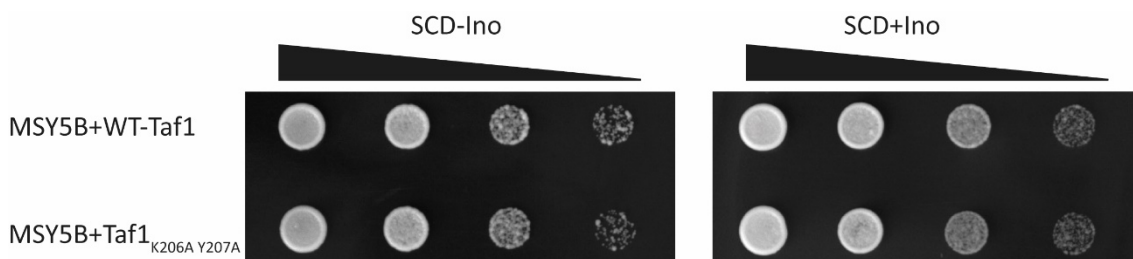


Abbildung 3.17: Einfluss von Inositol auf das Wachstum eines Stammes mit *TAF1* Genvariante. Gezeigt ist das Wachstumsverhalten nach der Transformation des Stammes MSY5B mit pSH191 (Positivkontrolle) und pMS109 (Taf1-Variante) auf SCD-Ino und SCD+Ino.

Die Abbildung zeigt, dass die Verfügbarkeit von Inositol im Medium keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Transformanden hat. Sowohl die Zellen mit Wildtyp-Taf1 als auch diejenigen mit Taf1-Variante konnten auf beiden Medien wachsen.

Zusätzlich wurde der Einfluss der Temperatur auf das Wachstumsverhalten getestet. Dafür wurden die Transformanden auf SCD-Leu+FOA-Medium für drei Tage bei 25°C bzw. 37°C inkubiert (nicht

gezeigt). Auch diese Bedingungen hatten keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen. Die Aminosäuren K206 Y207 scheinen daher keine essenzielle Funktion zu besitzen.

3.2.2.5 Einfluss der *TAF1*_{K206A Y207A}-Variante auf die Expression des *INO1*-Gens

Da die Mutation K206A Y207A auf qualitativer Ebene keine phänotypischen Effekte zeigte, stellte sich die Frage, ob es Effekte gibt, die zwar nicht zu einem Wachstumsverlust führen, aber dennoch Einfluss auf die Expression des *INO1*-Gens haben. Um das zu untersuchen, wurden die nach dem „Plasmid Shuffling“ erhaltenen Zellen auf Wachstum auf SCD-Ura Medium getestet. In Uracil-negativen Zellen ist das *ARS CEN URA3*-„rescue plasmid“ mit Sicherheit verloren gegangen und der *URA3*-Marker steht für weitere Transformationen wieder zur Verfügung. Die neu entstandenen Hefestämme MSY5B+pSH191 und MSY5B+pMS109 erhielten die Namen MSY5C (*Taf1*-Wildtyp) und MSY5D (*Taf1*_{K206A Y207A}). Sie wurden mit dem Plasmid pJS325, welches ein *INO1-lacZ*-Reportergen enthält, transformiert und auf SCD-Ura-Medium selektiert. Die Transformanten wurden in SCD-Ura-Flüssigmedium angezogen und auf β -Galactosidase-Aktivität im erhaltenen Rohextrakt getestet.

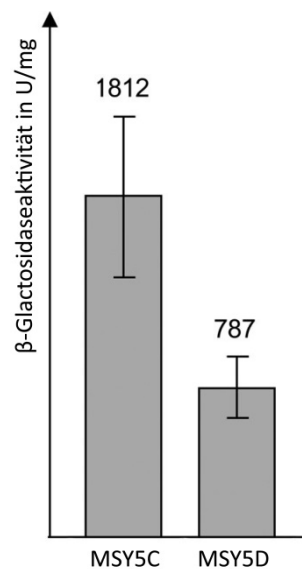


Abbildung 3.18: Quantifizierung der Effekte einer *Taf1*_{K206A Y207A}-Mutation. Gegenübergestellt sind der Wildtyp (MSY5C) und die *Taf1*-Variante (MSY5D). Sie enthalten jeweils ein Einzelkopie-*LEU2*-Plasmid (pSH191: *Taf1*-Wildtyp bzw. pMS109: *Taf1*_{K206A Y207A}), um die $\Delta taf1::HIS3$ - Nullmutation in dem Hefestamm aufzuheben. Die Stämme wurden mit dem Plasmid pJS325 transformiert (enthält ein *INO1-lacZ*-Reportergen) und unter dereprimierenden (Inositol-armen) Bedingungen in SCD-Ura-Medium angezogen. Anschließend wurde die spezifische β -Galactosidase-Aktivität gemessen, angegeben in U/mg Protein.

Der Stamm MSY5C (Wildtyp-*TAF1*) zeigte eine spezifische Enzymaktivität von 1812 U/mg, während für MSY5D (*Taf1*-Variante) nur eine Enzymaktivität von 787 U/mg ermittelt werden konnte. Dies bedeutet einen Abfall der Aktivierungsleistung für das *INO1*-Gen auf 44% im Vergleich zum Wildtyp-Niveau. Demnach hat die Mutation durchaus einen Effekt auf die Genaktivierung des *INO1*-Gens, die aber nicht zu einem Wachstumsverlust führt, was für eine funktionelle Redundanz beider ABDs innerhalb des *Taf1*-Proteins spricht.

3.2.3 Die Bromodomänenfaktoren Bdf1 und Bdf2

In höheren Eukaryoten hat Taf1 neben seiner Basalpromotor-bindenden Domäne und der eventuellen Acetyltransferase-Aktivität zusätzlich zwei Bromodomänen und Proteinkinase-Aktivität. Dem homologen Hefe-Taf1 fehlen jedoch die Bromodomänen und die Proteinkinase-Funktion. Matangkasombut *et al.* konnten 2000 den Bromodomänenfaktor Bdf1 und sein Homolog Bdf2 mittels eines Yeast-Two-Hybrid-Experiments zur Identifizierung von Interaktionspartnern von Taf7 isolieren. Beide besitzen zwei Bromodomänen, Bdf1 hat zusätzlich Proteinkinase-Aktivität. Im C-Terminus befindet sich die Interaktionsdomäne für Bindungen an TFIID-Untereinheiten. Bdf1 und Bdf2 sind genetisch redundant, jedoch ist das Vorhandensein eines der beiden Gene essenziell für das Überleben der Zelle. Die Funktion der beiden Faktoren beinhaltet neben Interaktionen mit Co-Aktivatoren und allgemeinen Transkriptionsfaktoren vor allem die Chromatinmodifizierung durch Kontaktaufnahme zu Histonen. Insbesondere Bdf1 hat vermutlich eine besonders hohe Affinität für Acetyllysine-Reste im Histon H4 (Hassan *et al.*, 2007). Nach Erkennung von acetylierten Lysinresten in Histonen interagiert Bdf1 mit Chromatinremodellierungskomplexen wie dem SWR1-Komplex und bewirkt so eine Auflockerung der Nucleosomen-Struktur in Promotorbereichen und unterstützt somit den Zusammenbau des PICs (Pattenden *et al.*, 2010). Betrachtet man Bdf1/Bdf2 nun als weitere Untereinheiten des TFIID, die zusätzlich positive Effekte auf die Transkriptionsinitiation haben, stellt sich die Frage, ob eine Interaktion mit Aktivatoren, insbesondere Ino2, stattfindet.

3.2.3.1 Konstruktion einer HA₃-Bdf1 Fusion und Interaktionsstudien mit Ino2

Für Interaktionsstudien zwischen Bdf1 und Ino2 wurden „GST-Pulldown“-Experimente durchgeführt. Dafür erfolgte zunächst die Konstruktion des HA₃-Bdf1-Volllängenproteins für die Expression in *E. coli* BL21. Für eine Amplifikation des vollständigen *BDF1*-Leserahmens durch PCR mit chromosomaler Wildtyp-DNA als Matrize wurden die sequenzspezifischen Oligonucleotide Bdf1 PstI 5F und Bdf1 XhoI 3R verwendet. Das erhaltene 2,1 kb-Fragment wurde mit *PstI* und *XhoI* geschnitten und in den mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisierten Vektor pASK-IBA5HA-XhoI inseriert. Es entstand das Plasmid pMS161. Nach erfolgreicher bakterieller Synthese des HA₃-Bdf1 Proteins wurde der aus der Anzucht in *E. coli* BL21 erhaltene Proteinextrakt für den „GST-Pulldown“ eingesetzt. Als zu testende Interaktionspartner dienten GST-Ino2₁₋₃₅ (Ino2-TAD1 codiert durch das Plasmid pSH117) und GST-Ino₁₀₁₋₁₃₅ (Ino2-TAD2 codiert durch das Plasmid pSH118). Als Negativkontrolle diente GST, codiert vom Vektor pGEX-SCS.

Wie die Abbildung 3.19 zeigt, ist Bdf1 zur Interaktion mit der TAD2 von Ino2 fähig. Damit ist es der zweite Faktor, der neben Taf10 diese eher schwächere TAD kontaktiert. Daneben wurde eine HA₃-markierte Variante des Bdf2-Proteins hergestellt (codiert durch das Plasmid pMS228), welche nach der gleichen Strategie auf Interaktion mit den Ino2-TADs untersucht wurde. Hierbei ergab sich, dass Bdf2 nicht in der Lage ist, an Ino2 zu binden (nicht gezeigt); in den weiteren Versuchen wurde daher die Ino2-Bdf1-Interaktion genauer charakterisiert.


Input Bdf1	Pulldown		
	GST	GST- Ino2 ₁₋₃₅	GST- Ino2 ₁₀₁₋₁₃₅
			

Abbildung 3.19: Interaktionsstudien zwischen Ino2 und Bdf1. Für den „GST-Pull-down“ wurden Proteinextrakte mit HA₃-Bdf1 (pMS161, aufgetragen als Input-Kontrolle) sowie GST-Ino2₁₋₃₅ (pSH117) und GST-Ino2₁₀₁₋₁₃₅ (pSH118) eingesetzt. Als Negativkontrolle diente GST (pGEX-SCS). Die GST-Proteine wurden an GSH-Sepharose immobilisiert, mit vorgeklärtem HA₃-Proteinextrakt inkubiert und nach mehrmaligem Waschen mit 1 x PBS mittels 20 mM GSH eluiert. Die Eluate wurden durch SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot und Immunodetektion analysiert.

3.2.3.2 Konstruktion von HA₃-Bdf1-Längenvarianten und Interaktionsstudien mit Ino2

Um die Interaktion zwischen Bdf1 und Ino2 präziser zu charakterisieren, wurden HA₃-Bdf1-Proteinverkürzungen konstruiert und auf Interaktion mit der Ino2-TAD2 getestet. Dafür wurden PCRs mit sequenzspezifischen Oligonucleotiden und chromosomaler Wildtyp-DNA durchgeführt. Die Fragmente wurden mit *Pst*I und *Xho*I geschnitten und in den mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisierten Vektor pASK-IBA5HA-*Xho*I inseriert. Dabei entstanden die in Tabelle 3.2 dargestellten Plasmide mit den verschiedenen Bdf1-Längenvarianten.

Tabelle 3.2: Konstruierte Plasmide mit den zugehörigen Bdf1-Längenvarianten

Plasmidname	Bdf1-Längenvariante
pMS176	AS 1-272
pMS177	AS 273-436
pMS178	AS 437-686
pMS189	AS 1-131
pMS190	AS 132-272
pMS191	AS 273-349
pMS192	AS 350-436
pMS193	AS 437-512
pMS194	AS 513-600
pMS195	AS 601-686

Die Fragmente wurden mittels PCR mit sequenzspezifischen Oligonucleotiden amplifiziert, mit *Pst*I und *Xho*I geschnitten und in den linearisierten Vektor pASK-IBA5HA-*Xho*I inseriert. Plasmide mit dem korrekten Restriktionsmuster wurden zum Test auf Synthese in *E. coli* BL21 eingesetzt.

3 Ergebnisse

Sekundärstrukturvorhersagen und Sequenzvergleiche zwischen verschiedenen Hefe-Stämmen dienten der Orientierung, um geeignete Längenvarianten zu konstruieren. Nach Transformation der Plasmide in *E. coli* BL21 und erfolgreicher Expression wurden „GST-Pulldown“-Studien durchgeführt. Als zu testender Interaktionspartner diente die GST-Fusion mit der TAD2 von Ino2, codiert durch das Plasmid pSH118, als Negativkontrolle diente das Plasmid pGEX-SCS, welches GST exprimiert.

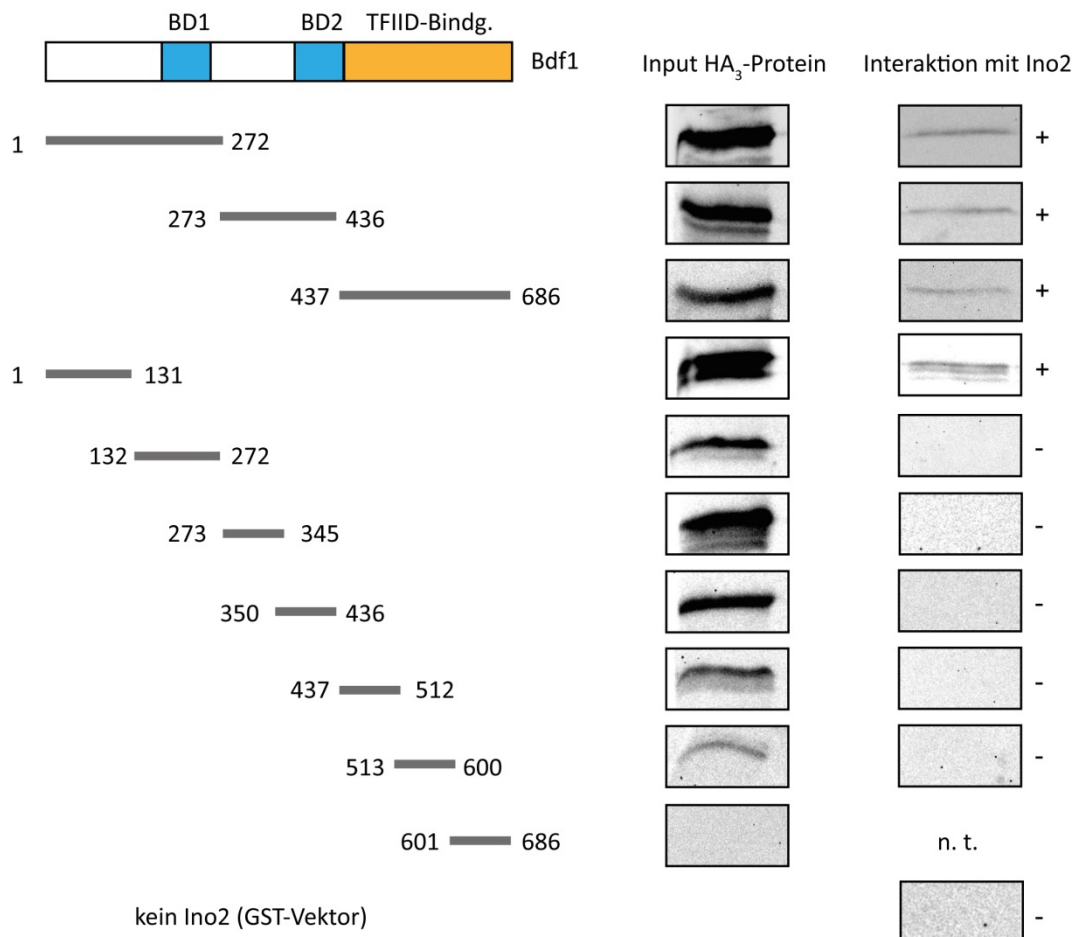


Abbildung 3.20: Interaktionsstudien zwischen Ino2-TAD2 und Bdf1-Längenvarianten. Dargestellt ist Bdf1 mit den Bromodomänen (BD) und der TFIIID-Bindestelle. Für den „GST-Pulldown“ wurden diverse Proteinextrakte mit HA₃-Bdf1-Längenvarianten eingesetzt: AS 1-272 (pMS176), AS 273-436 (pMS177), AS 437-686 (pMS178), AS 1-131 (pMS189), AS 132-272 (pMS190), AS 273-349 (pMS191), AS 350-436 (pMS192), AS 437-512 (pMS193), AS 513-600 (pMS194) und AS 601-686 (pMS195). Als GST-Fusion diente GST-Ino2₁₀₁₋₁₃₅ (pSH118) sowie GST (pGEX-SCS) als Negativkontrolle. Die GST-Proteine wurden an GSH-Sepharose immobilisiert, mit vorgeklärtem HA₃-Proteinextrakt inkubiert und nach mehrmaligem Waschen mit 1 x PBS mittels 20 mM GSH eluiert. Die Eluate wurden durch SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot und Immunodetektion analysiert.

In Abbildung 3.20 ist das Protein Bdf1 mit seinen beiden Bromodomänen im AS-Bereich 154-253 und 321-420 sowie der TFIIID-Interaktionsdomäne im AS-Bereich 421-686 dargestellt. Die Abbildung zeigt, dass alle Längenvarianten (bis auf AS 601-686) erfolgreich in *E. coli* BL21 exprimiert werden konnten. Interessanterweise waren drei relativ große Bereiche in der Lage, Interaktionen mit Ino2 einzugehen: AS 1-272, AS 273-436 und AS 437-686. Diese Bereiche decken das gesamte Protein ab, weshalb

versucht wurde, eine weitere Feinkartierung innerhalb dieser drei Abschnitte vorzunehmen. Auf diese Weise wurde im N-terminalen Bereich von Bdf1 (AS 1-131) eine Domäne identifiziert, die mit Ino2 interagieren kann, aber keine Sequenzen der Bromodomäne enthält. Alle weiteren exprimierbaren Verkürzungen waren nicht mehr zur Interaktion mit Ino2 fähig.

3.2.3.3 Charakterisierung einer Bdf1-Ino2-Interaktionsdomäne durch gerichtete Mutagenese

Zur weiteren Charakterisierung der Interaktion zwischen Bdf1 und Ino2 wurde in dem AS-Bereich 1-131 ein Sequenzvergleich zwischen verschiedenen Hefe-Stämmen durchgeführt (vgl. Taf1). Hierbei ergab sich, dass in diesem Bereich kaum konservierte Aminosäuren liegen. Lediglich ein Lysinrest an Position 102 innerhalb der Sequenz LKK (Pos. 101-103) ist hochkonserviert, sodass ein Muster entsteht, das dem aus dem Ino2-Taf1-Interaktionsbereich sehr ähnelt (LLK, vgl. Abschnitt 3.2.2). Diese Aminosäuren wurden für eine gerichtete Mutagenese (Austausch gegen Alanin) ausgewählt. Des Weiteren wurden die Aminosäuren Glutaminsäure und Asparagin an den Positionen 84 und 85 gegen Alanin ausgetauscht. Hierfür wurden sequenzspezifische Oligonucleotide für eine PCR verwendet, bei der das Plasmid pMS189 (HA₃-Bdf1₁₋₁₃₁) als Matrize diente. Die hierbei entstandenen Plasmide pMS222 und pMS223 enthalten HA₃-Bdf1₁₋₁₃₁ Fusionen sowie die gewünschten Mutationen (E84A N85A; L101A K102A K103A), die durch DNA-Sequenzierung bestätigt wurden (Firma LGC Genomics). Die in *E. coli* BL21 hergestellten Proteinextrakte wurden für ein „GST-Pulldown“-Experiment mit GST-Ino2-TAD2 (pSH118) und GST als Negativkontrolle (pGEX-SCS) eingesetzt.

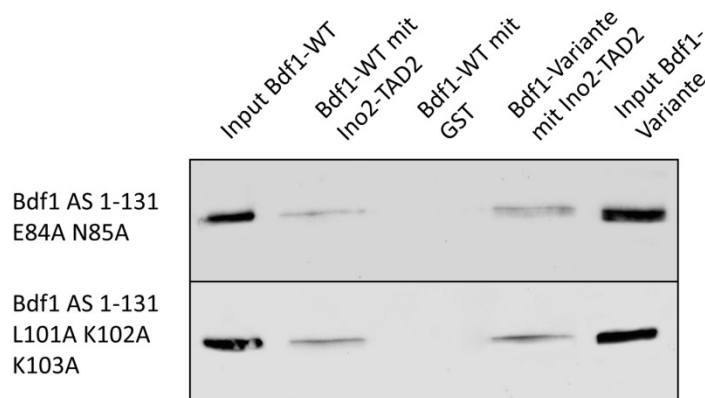


Abbildung 3.21: Interaktionsstudien zwischen Ino2-TAD2 und Bdf1-Varianten. Für den „GST-Pulldown“ wurden Proteinextrakte mit HA₃-Bdf1₁₋₁₃₁ eingesetzt, die die gewünschten Mutationen EN-AA (pMS222) und LKK-AAA (pMS223) enthalten (jeweils links). Als Positivkontrolle diente die HA₃-Bdf1₁₋₁₃₁ Fusion mit der Wildtypsequenz (pMS189, rechts). GST-Ino2₁₀₁₋₁₃₅ (pSH118) diente als zu testender Interaktionspartner und GST (pGEX-SCS) als Negativkontrolle. Die GST-Proteine wurden an GSH-Sepharose immobilisiert, mit vorgeklärtem HA₃-Proteinextrakt inkubiert und nach mehrmaligem Waschen mit 1 x PBS mittels 20 mM GSH eluiert. Die Eluate wurden durch SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot und Immunodetektion analysiert.

Abbildung 3.21 zeigt, dass die Bdf1-Längenvarianten trotz der Aminosäureaustausche noch zur Interaktion mit Ino2-fähig sind. Das Muster aus hydrophoben und basischen Aminosäuren, die für die Interaktion zwischen Taf1 und Ino2 eine wichtige Rolle spielen, scheint für die TAD1 von höherer Bedeutung zu sein als für die TAD2. Dass die Mutation EN-AA nicht zu einem Interaktionsverlust führte, entspricht den Erwartungen, da hier keine Konservierung zwischen den verglichenen Hefe-Stämmen vorlag.

3.2.4 Charakterisierung der Interaktion zwischen Taf12 und Ino2

Taf12 ist eine essenzielle Untereinheit sowohl des TFIID- als auch des SAGA-Komplexes, enthält 539 Aminosäuren und hat vielfältige Aufgaben. Es gehört zu den Proteinen mit einer „histone-fold“ Domäne (HFD), die sich im Bereich der Aminosäuren 413-490 befindet. Zusammen mit der SAGA-Untereinheit Ada1 oder mit der TFIID-Untereinheit Taf4 bilden Taf6, Taf9 und Taf12 einen Komplex, der strukturelle Ähnlichkeiten mit einem Histon-Oktamer hat. Dadurch trägt Taf12 zur Chromatin-modifizierung durch Histonacetylierung bei (Grant *et al.*, 1998). Taf12 wird von zahlreichen TADs von Aktivatoren wie Gal4, Gcn4 und Rap1 kontaktiert (Fishburn *et al.*, 2005; Reeves und Hahn, 2005; Garbett *et al.*, 2007). Damit trägt Taf12 zur RNA Polymerase II-abhängigen Transkriptionsinitiation bei. Hintze *et al.* (2017) konnten zeigen, dass auch Ino2 zur Liste der Aktivatoren gehört, die Taf12 kontaktieren, wobei die Ino2-TAD1 Kontakt zu Taf12 aufnimmt. Hintze *et al.* (2017) konnten außerdem zwei ABDs in Taf12 identifizieren. Während der C-Terminus, der die HFD enthält, nicht zur Interaktion mit Ino2 fähig war, liegen im N-Terminus die beiden nicht überlappenden Abschnitte ABD1 (AS 1-100) und ABD2 (AS 100-178). Bei Taf12-Interaktionsstudien mit einer mutierten Ino2 TAD1 (Ino2₁₋₁₃₅ D20K F21R) konnte dagegen keine Interaktion mehr nachgewiesen werden (ähnlich wie bei entsprechenden Studien mit Taf1). Demnach liegt die Vermutung nahe, dass Aminosäuren mit den gleichen Eigenschaften wie bei Taf1 (basisch in Kombination mit hydrophob) essenziell für die Ino2-Taf12-Wechselwirkung sind.

3.2.4.1 Taf12-Sequenzvergleich zwischen *Saccharomyces*-Hefen

Um einen Überblick über die Aminosäureeigenschaften in dem Bereich der ABD1 und ABD2 von Taf12 zu bekommen, wurde wiederum ein Sequenzvergleich zwischen verschiedenen *Saccharomyces*-Hefen durchgeführt. Hierbei stellte sich heraus, dass die ABD1 nur wenige konservierte Bereiche besitzt (nicht gezeigt), während viele identische Bereiche innerhalb der ABD2 auftreten, die tatsächlich zum großen Teil basische Aminosäuren betreffen. In diesem Bereich wurden in früheren Untersuchungen (Spierling, 2014) bereits vier Stellen für eine gerichtete Mutagenese ausgewählt und die entsprechenden Aminosäuren durch Alanin ersetzt. Es handelte sich um Threonin und Arginin an den AS-Stellen 125 und 126 (T125 R126), Lysin-131 und Phenylalanin-132 (K131 F132), Isoleucin-136 und Lysin-137 (I136 K137) sowie Lysin-137 mit dem darauffolgenden Glutamin-138 (K137 Q138). Da diese Varianten keinen Effekt auf die Interaktion mit Ino2 hatten, wurden im Zuge dieser Arbeit weitere ausgewählte Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht. Hierbei handelt es sich um Serin-129 und Asparagin-130 (S129 N130), Valin-139 und Leucin-140 (V139 L140), Lysin-150 und Leucin-151 (K150 L151), Leucin-169 und Lysin-170 (L169 K170), Isoleucin-173 und Asparaginsäure-174 (I173 D174) sowie Arginin-175 mit Leucin-176 (R175 L176).

<i>S. cerevisiae</i>	98	- S N S S N P A S I P T E N V P N S S Q - - Q Q Q Q Q Q Q Q T R N N S N K F S N M I K Q V L T P E E	144
<i>S. mikatae</i>	36	N S N S N N P V T M C T E K T W N S S Q Q H Q Q Q H Q Q Q Q T R N Y S N K F S S M I K Q V L T L E E	85
<i>S. paradoxus</i>	98	- P N P S N S A S V S T E N A P N T S Q - - Q Q Q Q Q - - - T R N N S N K F S N M I K Q V L T P E E	141
<i>S. uvarum</i>	99	T P N A G N P V S L P T E K P P S L S Q - - - - Q Q Q Q Q Q A R S N S N K F S N M I K Q V L T S E E	144
<i>S. bayanus</i>	89	S N N D N V T T N N S F A S P S S P P T - - - - - S G S T I S N S S S T Q L A N I M R Q V L T D E Q	133
<i>S. castelii</i>	101	N P N P S N L A S L P T D K A P N P S Q - Q Q Q Q Q Q Q Q Q A R N N S N K F S N M I K Q V L T P E E	149
<i>S. kluyveri</i>	101	N S N S N N P V T M S T E K T S N S S Q Q H Q Q Q H Q Q Q Q T R N N S N K F S S M I K Q V L T P E E	150
<i>S. cerevisiae</i>	145	N Q E Y E K L W Q N F Q V R H T S I K E K E T Y L K Q N I D R L E Q E I N K Q T D E G - P K Q Q L Q	193
<i>S. mikatae</i>	86	N Q E Y E K L W Q N F Q A R H T S I K E K E T F L K Q N I D R L E Q E I N K Q T E E G - A K Q Q L Q	134
<i>S. paradoxus</i>	142	N Q E Y E K L W Q N F Q G R H T S I K E R E T Y L K Q N I D R L E Q E I N K Q T D E G - S K Q Q L Q	190
<i>S. uvarum</i>	145	N Q Q Y E K L W Q N F Q V R A T S M K E K D T F L K Q N I D R L V Q E V N K Q T D E A - T K K Q L E	193
<i>S. bayanus</i>	134	N A N F D K L D Q T F R S R A S A L K D K H T F L K Q N I E R L T Q E I N K Q A D N V N A R K Q L E	183
<i>S. castelii</i>	150	N Q E Y E K L W Q N F Q V R H T S I K E R E A F L K Q N V D R L E Q E I N K Q T D E G - T K Q Q L E	198
<i>S. kluyveri</i>	151	N Q E Y E K L W Q N F Q A R H T S I K E K E T F L K Q N I D R L E Q E I N K Q T E E G - A K Q Q L Q	199

Abbildung 3.22: Taf12-Sequenzvergleich verschiedener *Saccharomyces*-Hefen. Der Sequenzvergleich wurde nach ClustalW (www.yeastgenome.org) durchgeführt. Dargestellt ist der ABD2-enthaltende Taf12-Sequenzbereich. Aminosäuren, die in allen Stämmen identisch sind, sind gelb unterlegt. Rosa sind diejenigen mit starker Ähnlichkeit, während die grün markierten lediglich schwache Ähnlichkeiten aufweisen. Die rot umrandeten Aminosäuren wurden für eine gerichtete Mutagenese ausgewählt: S129 N130, V139 L140, K150 L151, L169 K170, I173 D174 und R175 L176.

3.2.4.2 Gerichtete Mutagenese ausgewählter Aminosäuren in Taf12

Für die gerichtete Mutagenese durch PCR mit sequenzspezifischen Oligonucleotiden diente das Plasmid pMS16 mit der Wildtypsequenz Taf12₁₀₀₋₁₇₈ als Matrize. Die hierbei entstandenen Plasmide enthielten eine GST-Taf12₁₀₀₋₁₇₈ Fusion mit den gewünschten Mutationen: pMS40 (S129A N130A), pMS41 (V139A L140A), pMS42 (K150A L151A), pMS43 (L169A K170A), pMS44 (I173A D174A) und pMS45 (R175A L176A), die durch DNA-Sequenzierung verifiziert wurden (LGC Genomics). Die Proteine wurden nach Transformation der Plasmide in *E. coli* BL21 synthetisiert und der entstandene Gesamtzellproteinextrakt für einen „GST-Pulldown“ eingesetzt, um die Interaktion der veränderten Taf12-Varianten mit dem Wildtyp-Taf12 zu vergleichen. Als zu testender Interaktionspartner diente HA₃-Ino2₁₋₁₃₅, codiert vom Plasmid pSH148 und exprimiert in *E. coli* BL21. Als Negativkontrolle diente GST, codiert vom Leervektor pGEX-SCS.

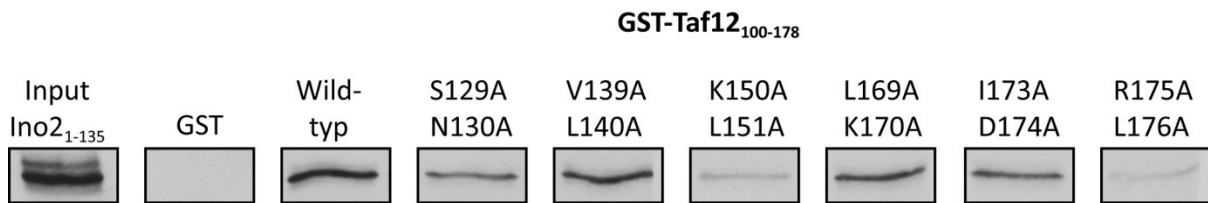


Abbildung 3.23: Charakterisierung der Taf12-ABD 2. Es wurden Interaktionsstudien zwischen HA₃-Ino2₁₋₁₃₅ und verschiedenen Taf12-ABD2-Varianten durchgeführt. Alle Proteinextrakte wurden aus *E. coli* BL21 gewonnen und für die „GST-Pulldown“-Experimente eingesetzt. Dafür wurden die Expressionsplasmide pSH148 (HA₃-Ino2₁₋₁₃₅), pGEX-SCS (GST), pMS40 (GST-Taf12₁₀₀₋₁₇₈ S129A N130A), pMS41 (GST-Taf12₁₀₀₋₁₇₈ V139A L140A), pMS42 (GST-Taf12₁₀₀₋₁₇₈ K150A L151A), pMS43 (GST-Taf12₁₀₀₋₁₇₈ L169A K170A), pMS44 (GST-Taf12₁₀₀₋₁₇₈ I173A D174A) und pMS45 (GST-Taf12₁₀₀₋₁₇₈ R175A L176A) eingesetzt. Die GST-Proteine wurden an GSH-Sepharose immobilisiert und mit vorgeklärtem HA₃-Proteinextrakt inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit 1 x PBS wurden die GST-Proteine mittels freiem GSH von der Sepharose eluiert und die Eluate durch SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot und Immunodetektion analysiert.

Da keine der Taf12-ABD2-Varianten zu einem vollständigen Interaktionsausfall, aber zumindest teilweise zu einer Schwächung der Interaktion führte, wurde eine weitere Variante mittels gerichteter Mutagenese hergestellt, die eine Kombination aus den Varianten K150A L151A und R175A L176A darstellte. Hier wurde pMS42 als Matrize für eine Mutagenese-PCR mit sequenzspezifischen Oligonucleotiden verwendet. Die aus *E. coli* BL21 erhaltenen Rohextrakte wurden erneut für einen „GST-Pulldown“ mit HA₃-Ino2₁₋₁₃₅ eingesetzt.

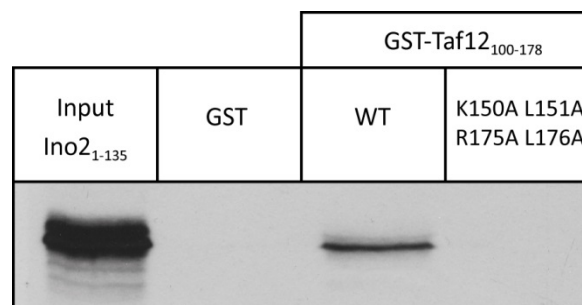


Abbildung 3.24: Charakterisierung der Taf12-ABD 2 durch eine Vierfach-Mutante. Es wurde eine Interaktionsstudie zwischen HA₃-Ino2₁₋₁₃₅ und einer weiteren Taf12-ABD2-Variante durchgeführt. Alle Proteinextrakte wurden aus *E. coli* BL21 gewonnen und für die „GST-Pulldown“-Experimente eingesetzt. Dafür wurden die Expressionsplasmide pSH148 (HA₃-Ino2₁₋₁₃₅), pGEX-SCS (GST) und pMS51 (GST-Taf12₁₀₀₋₁₇₈ K150A L151A R175A L176A) eingesetzt. Die GST-Proteine wurden an GSH-Sepharose immobilisiert und mit vorgeklärtem Proteinextrakt inkubiert, der HA₃-Ino2₁₋₁₃₅ enthielt. Nach mehrmaligem Waschen mit 1 x PBS wurden die GST-Proteine mittels freiem GSH von der Sepharose eluiert und die Eluate durch SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot und Immunodetektion analysiert.

Abbildung 3.24 zeigt, dass die Vierfachmutation im Bereich der ABD2 zu einem Interaktionsausfall zwischen Ino2 und Taf12 führt. Die Ergebnisse aller Interaktionsstudien sprechen für eine gewisse funktionelle Redundanz unter den Aminosäuren der Taf12-ABD2. Ähnlich wie bei den Interaktionsstudien zwischen Taf1 und Ino2 scheinen vor allem basische und hydrophobe Aminosäuren in Kombination miteinander starken Einfluss auf die Ino2-Taf12-Wechselwirkungen zu haben.

3.2.4.3 Einfluss einer Taf12-Teildeletion auf die *INO1*-Genaktivierung

Moqtaderi *et al.* zeigten 1996, dass *TAF12* ein für das Überleben der Zelle essenzielles Gen ist, dass aber trotz dessen auf Sequenzen, die den N-Terminus codieren, verzichtet werden kann. In diesem Bereich liegen die von Hintze *et al.* (2017) identifizierten ABDs, weshalb es besonders interessant ist, Untersuchungen durchzuführen, die den Einfluss einer verkürzten Taf12-Variante (ohne N-Terminus) auf die Genaktivierung von *INO1* zeigen. Für diese Untersuchungen wurde erneut das „Plasmid Shuffling“ angewendet (vgl. Abschnitt 3.2.2.4).

Konstruktion einer Gendisruptionscassette für das chromosomale *TAF12*-Gen

Für die Konstruktion einer $\Delta taf12::HIS3$ Gendisruptionscassette wurden flankierende Sequenzen des *TAF12*-Gens mittels PCR und sequenzspezifischen Oligonucleotiden amplifiziert und in den Vektor pUC19-HIS3, welcher einen *HIS3*-Selektionsmarker sowie zwei Polylinkerregionen enthält, kloniert. Für die Amplifikation der 5'-Flanke dienten die Oligonucleotide TAF12_5F_EcoRI und TAF12_5F_SacI sowie chromosomale Wildtyp-DNA als Matrize. Das 440 bp große Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *SacI* geschnitten und in den mit den gleichen Enzymen linearisierten Vektor pUC19-HIS3 inseriert. Hierbei entstand das Plasmid pMS128. Für die Amplifikation der 3'-Flanke wurde eine PCR mit chromosomaler Wildtyp-DNA sowie den Oligonucleotiden TAF12_3F_XbaI und TAF12_3F_SalI durchgeführt. Das entstandene 400 bp große Fragment wurde mit den Enzymen *XbaI* und *SalI* geschnitten und in das mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisierte Plasmid pMS128 inseriert. Hierbei entstand das Plasmid pMS129 ($\Delta taf12::HIS3$).

Konstruktion des Stammes MSY6B

Zunächst wurde das „Rescue Plasmid“ pMS124 konstruiert, ein Centromerplasmid, das *TAF12* unter Eigenpromotorkontrolle und einen *URA3*-Selektionsmarker enthält. Dafür wurden zunächst die Oligonucleotide TAF12_XbaI_For und TAF12_BamHI_Rev für eine PCR mit chromosomaler Wildtyp-DNA verwendet. Hierbei entstand ein 0,6 kb großes Fragment, welches den Promotorbereich des *TAF12*-Gens enthält. Dieser wurde mit *XbaI* und *BamHI* geschnitten und in den mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisierten Vektor pRS416 inseriert, wodurch das Plasmid pMS123 entstand. Anschließend wurde in einer weiteren PCR, bei der die Oligonucleotide TAF12_BamHI_For und TAF12_KpnI_Rev verwendet wurden, der *TAF12*-Leserahmen amplifiziert (1,8 kb-Fragment). Das Fragment wurde mit *BamHI* und *KpnI* geschnitten und in das mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisierte Plasmid pMS123 inseriert. Das nun entstandene Plasmid pMS124 enthält das komplette *TAF12*-Gen mit flankierenden Sequenzen und wurde in den Hefestamm JS91.15-23 transformiert. Nach erfolgreicher Selektion auf SCD-Ura-Medium wurde aus dem Plasmid pMS129 die Gendisruptionscassette für das chromosomale *TAF12*-Gen mittels Restriktionsspaltung mit *EcoRI* und *SalI* freigesetzt und cotransformiert. Die Selektion erfolgte auf SCD-His-Medium. Mit den erhaltenen His-prototrophen Transformanden wurde eine Verifizierungs-PCR unter Verwendung der sequenzspezifischen Oligonucleotide HIS3-P und Taf12_ORF durchgeführt, um die korrekte Insertion der Gendisruptionscassette (1100 bp-Fragment, nicht dargestellt) zu kontrollieren. Um das Fehlen des chromosomalen Wildtyp-*TAF12* zu kontrollieren, wurde eine weitere PCR mit den Oligonucleotiden

TAF12_ORF und TAF12_VER durchgeführt, bei der erwartungsgemäß kein Fragment entstanden ist (bei der Positivkontrolle zum Nachweis des *TAF12*-Wildtypgens entstand ein 800 bp großes Fragment). Der Stamm erhielt den Namen MSY6B.

Konstruktion weiterer *TAF12*-Centromerplasmide

Als nächstes wurden die *ARS CEN LEU2*-Plasmide pMS126 und pMS127 konstruiert. pMS126 enthält das vollständige *TAF12*-Gen unter Eigenpromotorkontrolle und wurde beim „Plasmid Shuffling“ als Positivkontrolle eingesetzt. Das Plasmid pMS127 codiert für eine verkürzte Version von Taf12, nämlich den C-Terminus mit den Aminosäuren 278-539. Für die Konstruktion wurde zunächst der Promotorbereich von *TAF12* mittels PCR anhand chromosomaler WT-DNA und den Oligonucleotiden TAF12_XbaI_For und TAF12_KpnI_Rev amplifiziert und mit *XbaI* und *Bam*HI geschnitten. Anschließend wurde das 0,6 kb große Fragment in den mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisierten Vektor YCp111 inseriert. Das entstandene Plasmid trägt den Namen pMS125. Nun wurden unterschiedlich lange *TAF12*-Genbereiche mit Hilfe der Oligonucleotide TAF12_BamHI_For bzw. TAF12_BamHI_For_279 und TAF12_KpnI_Rev amplifiziert. Die Fragmente (1,8 kb für die Volllänge; 0,95 kb für die verkürzte Variante) wurden mit *Bam*HI und *KpnI* geschnitten und in das mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisierte Plasmid pMS125 inseriert. Es entstanden pMS126 und pMS127.

Durchführung des „Plasmid Shufflings“

Der Stamm MSY6B wurde mit den Plasmiden YCp111 (Negativkontrolle), pMS126 (Positivkontrolle) und pMS127 transformiert (Selektion auf SCD-Ura-Leu-Doppelselektivmedium). Nach dem Anwachsen der Transformanden erfolgte eine Übertragung der Zellen auf FOA-haltiges Selektivmedium. Durch den Zusatz von FOA zum Medium geht das Plasmid mit *URA3*-Selektionsmarker verloren, sodass man den Einfluss der auf dem verbleibenden *ARS CEN LEU2*-Plasmid vorhandenen *TAF12*-Variante untersuchen kann.

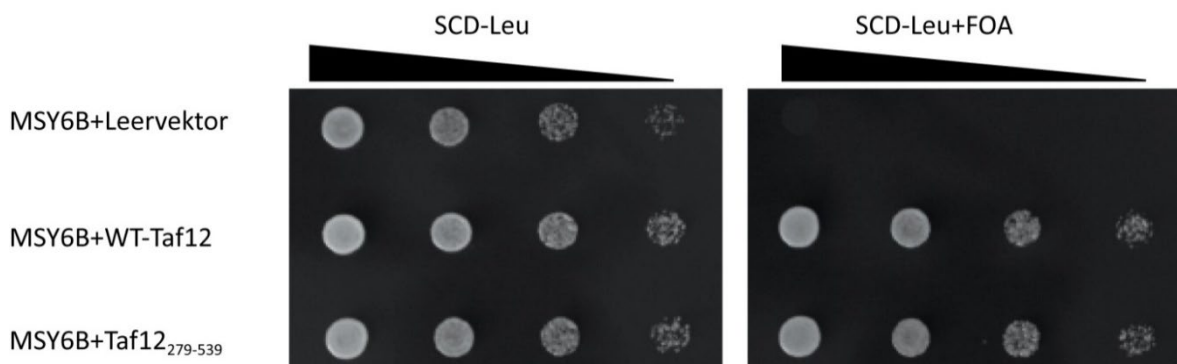


Abbildung 3.25: „Plasmid Shuffling“ mit der Längenvariante *TAF12*₂₇₉₋₅₃₉. Gezeigt ist das Wachstum nach der Transformation des Stammes MSY6B mit YCp111 (Negativkontrolle), pMS126 (Positivkontrolle; *TAF12*) und pMS127 (Verkürzung *TAF12*₂₇₉₋₅₃₉) auf SCD-Leu und SCD-Leu+FOA (Inkubation: 3 Tage bei 30°C).

In Abbildung 3.25 ist zu sehen, dass die Zellen auf dem SCD-Leu-Selektivmedium wachsen können, während die Negativkontrolle kein Wachstum mehr auf FOA-haltigem Medium zeigt. Die Zellen, die die Taf12-Volllänge bzw. die Taf12-Verkürzung besitzen, zeigen jedoch ein identisches Wachstum, sodass die verkürzte Variante keinen letalen Einfluss auf die Zellen zu hat.

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss der Inositol-Verfügbarkeit im Medium auf das Wachstumsverhalten der Zellen untersucht. Dafür wurden die Zellen, die zum einen die Taf12-Volllänge bzw. die verkürzte Variante besitzen, auf SCD-Ino bzw. SCD+Ino-Selektivmedium übertragen und drei Tage bei 30°C inkubiert.

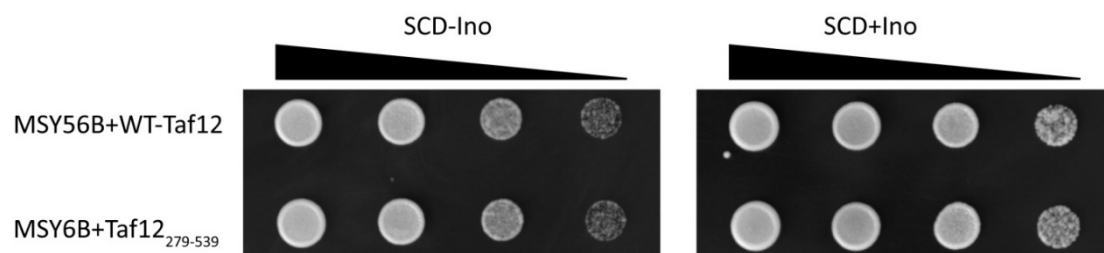


Abbildung 3.26: Test auf Inositol-abhängiges Wachstum von Zellen mit einer *TAF12*-Längenvariante. Gezeigt ist das Wachstum nach der Transformation des Stammes MSY6B mit pMS126 (Positivkontrolle; *TAF12*) und pMS127 (Verkürzung *TAF12*₂₇₉₋₅₃₉) auf SCD-Ino und SCD+Ino.

Die Abbildung zeigt, dass die Inositol-Verfügbarkeit im Medium keinen Einfluss auf das Wachstum hat, unabhängig davon, welche Taf12-Variante in den Zellen vorliegt. Zusätzlich wurde der Einfluss der Temperatur auf das Wachstumsverhalten getestet. Dafür wurden die Transformanten auf SCD-Leu+FOA-Medium für drei Tage bei 25 °C bzw. 37 °C inkubiert (nicht gezeigt). Auch diese Bedingungen hatten keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen. Die ABDs von Taf12 scheinen daher keine für das Überleben der Zelle notwendige Funktion zu besitzen.

Da die Verkürzung von Taf12 qualitativ keine phänotypischen Auswirkungen hat, sollte, ähnlich wie bei den Untersuchungen zur Taf1-Funktion, der Einfluss der Taf12-Variante auf die Expression des *INO1*-Gens untersucht werden. Dafür wurde überprüft, ob die Zellen nach Wachstum auf SCD-Leu+FOA-Medium die Fähigkeit verloren haben, auf SCD-Ura-Medium zu wachsen. War dieser Wachstumstest negativ, ist das *ARS CEN URA3*-„rescue plasmid“ mit Sicherheit verloren gegangen und der *ura3*-Marker steht wieder für eine weitere Transformation zur Verfügung. Die neu entstandenen Hefestämme MSY6B+pMS126 und MSY6B+pMS127 erhielten die Namen MSY6C (*TAF12*-Wildtyp) und MSY6D (*TAF12*₂₇₉₋₅₃₉). Sie wurden mit dem Plasmid pJS325, welches ein *INO1-lacZ*-Reportergen enthält, transformiert und auf SCD-Ura-Medium selektiert. Die Transformanten wurden in SCD-Ura-Flüssigmedium angezogen und auf β -Galactosidase-Aktivität im erhaltenen Rohextrakt getestet.

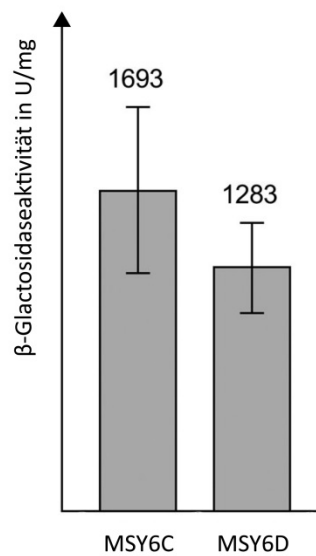


Abbildung 3.27: Quantifizierung der Effekte einer Taf12-Verkürzung. Gegenübergestellt sind der Wildtyp (MSY6C) und die Taf12-Variante mit deletierten ABDs (MSY6D). Sie enthalten jeweils ein Einzelkopie-*LEU2*-Plasmid (pMS126: Taf12-Wildtyp und pMS127: Taf1₂₇₉₋₅₃₉), um die $\Delta taf12::HIS3$ -Nullmutation in dem Hefestamm aufzuheben. Die Stämme wurden mit dem Plasmid pJS325 transformiert (enthält ein *INO1-lacZ*-Reportergen) und unter dereprimierenden (Inositol-armen) Bedingungen in SCD-Ura-Medium angezogen. Anschließend wurde die spezifische β -Galactosidase-Aktivität gemessen, angegeben in U/mg Protein.

Der Stamm MSY6C mit dem *TAF12*-Wildtypgen zeigte eine Enzymaktivität von 1693 U/mg, während für MSY6D (*TAF12*-Verkürzung) nur eine Enzymaktivität von 1283 U/mg ermittelt werden konnte. Dies bedeutet einen Abfall der Aktivierungsleistung für das *INO1*-Gen auf 76% im Vergleich zum Wildtyp-Niveau. Demnach hat die Verkürzung zwar einen geringen Effekt auf die Aktivierung des *INO1*-Gens, führt aber nicht zu einem Wachstumsverlust. Außerdem war der Effekt der Taf1-„missense“-Mutation auf die *INO1*-Genexpression stärker (Abfall auf 44% des Wildtypniveaus), was bedeuten könnte, dass Taf1 für die Expression Ino2-abhängiger Gene wichtiger ist als Taf12.

3.3 Promotorrekrutierung des basalen Transkriptionsfaktors TFIIA durch den Aktivator Ino2

Der basale Transkriptionsfaktor TFIIA der Hefe besteht aus den zwei Untereinheiten Toa1 (32 kDa) und Toa2 (13,5 kDa). Beide Proteine sind essenziell für das Überleben der Zelle (Ranish *et al.*, 1992). Humanes TFIIA besteht dagegen aus drei Untereinheiten mit Molekulargewichten von 35, 19 und 12 kDa (Cortes *et al.*, 1992; Coulombe *et al.*, 1992), wobei die 35 kDa- und die 19 kDa-Untereinheiten Ähnlichkeiten zum N- bzw. C-Terminus des Hefe-Toa1 aufweisen (DeJong und Roeder, 1993; Ma *et al.*, 1993; Yokomori *et al.*, 1993). Deletionsanalysen zeigten, dass die Sequenz zwischen den homologen Regionen innerhalb von Hefe-Toa1 nicht essenziell ist (Kang *et al.*, 1995). Die beiden Untereinheiten Toa1 und Toa2 treten als Heterodimer auf und bilden zusammen strukturell eine „ β -barrel“-Domäne, die mit TBP (TATA-Box-Bindeprotein) und der DNA interagiert. Außerdem finden sich Toa1 und Toa2 zu einer „four-helix-bundle“-Domäne zusammen, die den Initiationskomplex für die Transkription rekrutiert und vermutlich für die Dimerisierung der beiden TFIIA-Untereinheiten verantwortlich ist (Geiger *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 1996; Stargell *et al.*, 2001). Es wird vermutet, dass TFIIA eine Funktion als Antirepressor besitzt, denn der Komplex geht eine Bindung mit der TFIID-Untereinheit TBP ein und entfernt Inhibitoren vom Promotorbereich (Cortes *et al.*, 1992; Auble *et al.*, 1994; Meisterernst und Roeder, 1991). Ferner kann TFIIA als Coaktivator bezeichnet werden, denn durch Interaktionen mit diversen Aktivatoren (z. B. Yap1 und Rap1) unterstützt der Komplex die Transkriptionsaktivierung (Buratowski *et al.*, 1989; Maldonado *et al.*, 1990; Papai *et al.*, 2010). TFIIA spielt demnach eine bedeutende Rolle bei der Transkriptionsaktivierung und steht in engem Kontakt mit TFIID, welcher bereits als Interaktionspartner von Ino2 identifiziert wurde. Demnach liegt es nahe, auch die TFIIA-Untereinheiten, die bekanntermaßen mit anderen Aktivatoren interagieren, auch auf Interaktion mit Ino2 zu untersuchen.

3.3.1 Interaktionsstudien zwischen Ino2 und den TFIIA-Untereinheiten

In früheren Arbeiten (Hintze, unveröffentlicht) wurden bereits Hinweise auf Interaktionen zwischen TFIIA und Ino2 erhalten, die im Rahmen dieser Arbeit verifiziert werden sollten. Um eine mögliche Interaktion zwischen dem Aktivator und den Untereinheiten des Transkriptionsfaktors festzustellen, wurden „GST-Pulldown“-Experimente durchgeführt. Dafür wurden HA₃-Toa1- und HA₃-Toa2-Fusionsplasmide hergestellt, indem die entsprechenden Gene mittels PCR und sequenzspezifischen Oligonucleotiden amplifiziert wurden. Sie wurden in den Vektor pASK-IBA5HA-XhoI inseriert, der eine Expression der Hefe-Proteine in *E. coli* BL21 erlaubt. Die hierbei entstandenen Plasmide pMS67 (HA₃-Toa1) und pMS76 (HA₃-Toa2) wurden verwendet, um bakterielle Proteinextrakte aus BL21-Transformanten zu erhalten. Diese wurden für „GST-Pulldown“-Studien eingesetzt, bei denen als zu testende Interaktionspartner vollständiges Ino2 und die einzelnen Ino2-TADs dienen. Diese wurden durch die GST-Fusionsplasmide pSS56 (GST-Ino2), pSH117 (GST-Ino2₁₋₃₅) und pSH118 (GST-Ino2₁₀₁₋₁₃₅) codiert.

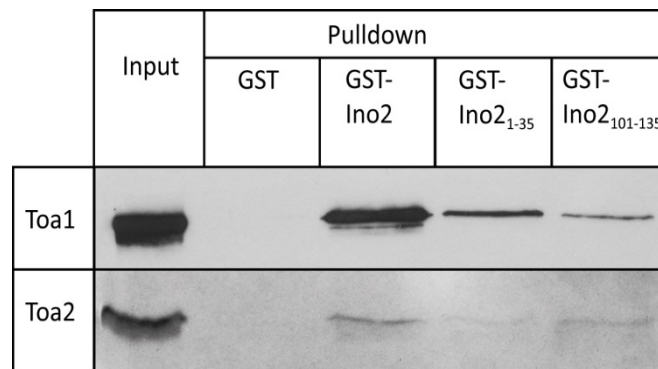


Abbildung 3.28: Interaktionsstudien zwischen Ino2 und den TFIIA-Untereinheiten. Dargestellt sind die Ergebnisse des „GST-Pulldowns“ zur Untersuchung der Interaktion zwischen HA₃-Toa1 (pMS67) bzw. HA₃-Toa2 (pMS76) und der GST-Ino2-Volllänge (pSS56), GST-Ino2-TAD1 (pSH117) bzw. GST-Ino2-TAD2 (pSH118). Die GST-Proteine wurden an GSH-Sepharose immobilisiert und mit vorgeklärten Proteinextrakten inkubiert, die HA₃-Fusionen enthielten. Nach mehrmaligem Waschen mit 1 x PBS wurden die GST-Proteine mittels freiem GSH von der Sepharose eluiert und die Eluate durch SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot und Immunodetektion analysiert.

Abbildung 3.28 zeigt zunächst, dass beide TFIIA-Untereinheiten erfolgreich in *E. coli* BL21 exprimiert werden konnten. Außerdem ließ sich eine intensive Interaktion zwischen allen drei getesteten GST-Ino2 Varianten (Volllänge sowie minimale TAD1 bzw. TAD2) und HA₃-Toa1 nachweisen. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Stefan Hintze überein. Anders als von ihm beschrieben, konnte aber auch HA₃-Toa2 an diese Ino2-Sequenzen binden, wenngleich mit geringerer Intensität.

3.3.2 Eingrenzung der Ino2-Interaktionsdomäne in Toa1

Für die Konstruktion weiterer Längenvarianten des aus 286 Aminosäuren bestehenden Toa1 wurden die Sekundärstrukturvorhersage und der Sequenzvergleich der Toa1 Proteine verschiedener *Saccharomyces*-Hefen berücksichtigt. Toa1 wurde zunächst in zwei etwa gleich große Hälften geteilt (AS 1-143 bzw. AS 144-286). Die durch PCR mit sequenzspezifischen Oligonucleotiden entstandenen Fragmente wurden in den Vektor pASK-IBA5HA-XhoI inseriert und die entstandenen Plasmide pMS69 und pMS70 für die Expression in *E. coli* BL21 verwendet. Die entstandenen HA₃-Protein-haltigen Gesamtzellextrakte wurden für „GST-Pulldown“-Experimente mit GST-Ino2 eingesetzt.

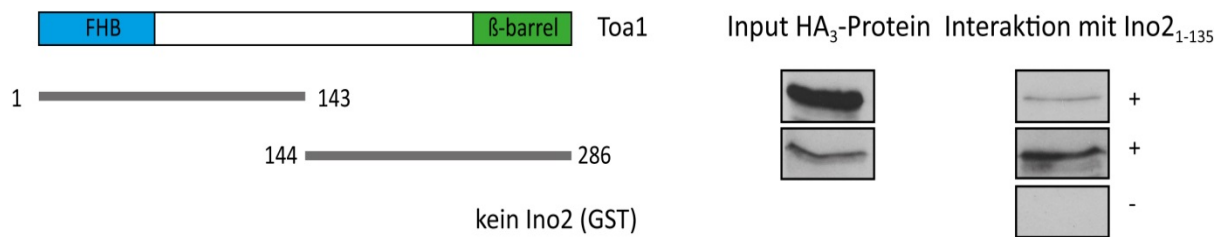


Abbildung 3.29: Interaktionsstudien zwischen Ino2 und Toa1-Längenvarianten. Dargestellt ist die Unterteilung des Toa1-Proteins mit seinen Strukturmotiven „Four-Helix-Bundle“ (FHB) und β-barrel-Domäne in zwei etwa gleich große Hälften. Gezeigt sind die Ergebnisse eines „GST-Pulldown“-Experiments zur Untersuchung der Interaktion zwischen HA₃-Toa1₁₋₁₄₃ (pMS69) bzw. HA₃-Toa1₁₄₄₋₂₈₆ (pMS70) und GST-Ino2 (pSS56). Als Negativkontrolle diente GST (pGEX-SCS). Alle Proteinextrakte wurden aus *E. coli* BL21 gewonnen. Die GST-Proteine wurden an GSH-Sepharose immobilisiert und mit vorgeklärten Proteinextrakten inkubiert, die HA₃-Fusionen enthielten. Nach mehrmaligem Waschen mit 1 x PBS wurden die GST-Proteine mittels freiem GSH von der Sepharose eluiert und die Eluate durch SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot und Immunodetektion analysiert.

Wie in Abbildung 3.29 dokumentiert, konnten beide Proteinhälften in *E. coli* BL21 exprimiert werden und zeigten im „GST-Pulldown“ die Fähigkeit, an Ino2 zu binden. Da bei gleicher Expressionsstärke der beiden Längenvarianten die Intensität des Signals für die Interaktion mit GST-Ino2 bei Toa1₁₋₁₄₃ deutlich schwächer war als bei Toa1₁₄₄₋₂₈₆ wurden zusätzliche kürzere Längenvarianten des C-Terminus hergestellt. Deren Ende lag einheitlich bei Aminosäure 286, während die Position des N-Terminus sukzessive nach hinten rückt. Dabei entstanden die Plasmide pMS71 (AS 210-286), pMS72 (AS 215-286), pMS73 (AS 220-286), pMS74 (AS 226-286) und pMS75 (AS 232-286). Diese Plasmide dienten zur Synthese HA₃-markierter Toa1-Längenvarianten, die ebenfalls für Interaktionsstudien mit GST-Ino2 eingesetzt wurden.

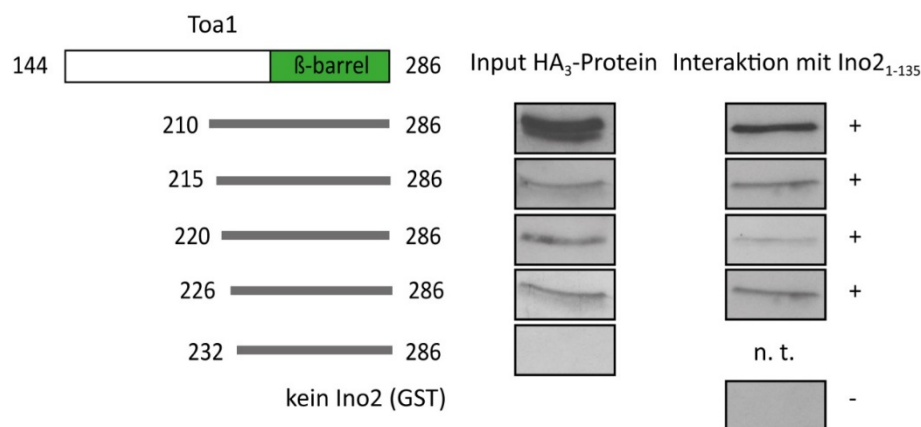


Abbildung 3.30: Interaktionsstudien zwischen Ino2 und C-terminalen Toa1-Längenvarianten. Dargestellt sind die Ergebnisse der „GST-Pulldown“-Experimente mit GST-Ino2 (pSS56) und HA₃-Toa1₂₁₀₋₂₈₆ (pMS71), HA₃-Toa1₂₁₅₋₂₈₆ (pMS72), HA₃-Toa1₂₂₀₋₂₈₆ (pMS73), HA₃-Toa1₂₂₆₋₂₈₆ (pMS74) bzw. HA₃-Toa1₂₃₂₋₂₈₆ (pMS75). Alle Proteinextrakte wurden aus *E. coli* BL21 gewonnen. Die GST-Proteine wurden an GSH-Sepharose immobilisiert und mit vorgeklärten Proteinextrakten inkubiert, die HA₃-Fusionen enthielten. Nach mehrmaligem Waschen mit 1 x PBS wurden die GST-Proteine mittels freiem GSH von der Sepharose eluiert und die Eluate durch SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot und Immunodetektion analysiert.

Abbildung 3.30 zeigt, dass alle Längenvarianten bis auf AS 232-286 erfolgreich in *E. coli* BL21 synthetisiert werden konnten und in der Lage waren, Kontakt zu Ino2 aufzunehmen. Demnach konnte eine minimale Ino2-Interaktionsdomäne im Bereich der Aminosäuren 226-286 von Toa1 identifiziert werden. Aufgrund der effektiveren Expressionsstärke wurden nachfolgende Untersuchungen jedoch mit der Längenvariante AS 210-286 durchgeführt.

3.3.2.1 Untersuchungen zur Toa1-Interaktion mit Ino2-TAD1 und Ino2-TAD2

Da bereits gezeigt werden konnte, dass die Toa1-Volllänge mit beiden TADs von Ino2 interagieren kann, stellte sich die Frage, welche der TADs jeweils von den AS-Bereichen 1-143 und 226-286 kontaktiert wird. Dafür wurden erneut „GST-Pulldown“-Experimente durchgeführt, bei denen GST-Ino2₁₋₃₅ (TAD1; codiert durch das Plasmid pSH117) und GST-Ino2₁₀₁₋₁₃₅ (TAD2; codiert durch das Plasmid pSH118) als zu testende Interaktionspartner für HA₃-Toa1₁₋₁₄₃ (pMS69) und HA₃-Toa1₂₁₀₋₂₈₆ (pMS71) dienen.

Abbildung 3.31 zeigt, dass der N-Terminus von Toa1 lediglich die TAD1 kontaktiert, während die Ino2-Interaktionsdomäne im C-Terminus an beide TADs binden kann. Damit werden die Ergebnisse von Stefan Hintze vervollständigt, der den AS-Bereich 144-286 positiv auf Interaktion lediglich mit der Ino2-TAD1 testete.



Abbildung 3.31: Interaktionsstudien zwischen den Ino2-TADs und Toa1. Dargestellt sind die Ergebnisse des „GST-Pulldown“-Experimente zwischen GST-Ino2₁₋₃₅ (pSH117) bzw. GST-Ino2₁₀₁₋₁₃₅ (pSH118) sowie HA₃-Toa1₂₁₀₋₂₈₆ (pMS71) bzw. HA₃-Toa1₁₋₁₄₃ (pMS69). Alle Proteinextrakte wurden aus *E. coli* BL21 gewonnen. Die GST-Proteine wurden an GSH-Sepharose immobilisiert und mit vorgeklärten Proteinextrakten inkubiert, die HA₃-Fusionen enthielten. Nach mehrmaligem Waschen mit 1 x PBS wurden die GST-Proteine mittels freiem GSH von der Sepharose eluiert und die Eluate durch SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot und Immunodetektion analysiert.

3.3.3 Gerichtete Mutagenese innerhalb der Interaktionsdomänen von Toa1

Stefan Hintze führte bereits Untersuchungen zur Charakterisierung der Ino2-Toa1-Interaktion durch, bei denen er überprüfte, ob Toa1 an Ino2-Varianten, die Mutationen im TAD1-Bereich tragen, binden kann. Hierbei handelte es sich um die Aminosäureaustausche Asparaginsäure an Stelle 20 durch Lysin (D20K) und Phenylalanin an Stelle 21 durch Arginin (F21R). „GST-Pulldown“-Experimente zeigten, dass eine Interaktion zwischen mutiertem Ino2 und Toa1 nun nicht mehr möglich war. Identische Befunde waren mit den Taf-Proteinen erhalten worden, von denen keines der vorher positiv auf Interaktion

getesteten weiterhin an die Ino2-Varianten binden konnte (Hintze *et al.*, 2017). Demnach ergibt sich die Hypothese, dass auch in Toa1 die Kombination aus basischen und hydrophoben Aminosäuren eine wichtige Rolle für die Interaktion mit dem Aktivator spielen könnte. Dementsprechend wurden vorrangig konservierte Aminosäuren für eine gerichtete Mutagenese ausgewählt. Da im N-Terminus vor allem der AS-Bereich 1-59 stark konserviert ist (vgl. Abbildung 3.32) wurden hier Aminosäuren für eine gerichtete Mutagenese ausgewählt. Hierbei handelt es sich um Tyrosin-10 und Glutaminsäure-11 (Y10 E11), Valin-21 und Arginin-22 (V21 R22), Glutaminsäure-26 und Asparagin-27 (E26 N27), Leucin-38 und Lysin-39 (L38 K39), Lysin-44 und Leucin-45 (K44 L45) sowie Lysin-50 und Valin-51 (K50 V51).

<i>S. cerevisiae</i>	1	-----	MSNAEASRVYEIIVES	16
<i>S. mikatae</i>	1	-----MAYYRGQAQKIKAIVVQRSDHREENSLDV	MSNAEASRAYEIIVES	45
<i>S. paradoxus</i>	1	-----	MSNAEASRVYEIIVES	16
<i>S. uvarum</i>	1	MDKAIRCTIGDKPRRKSDSRTGIEATQKGRSLDT	MSNAEASRAYEIIVES	50
<i>S. bayanus</i>	1	-----	MSNAEASRAYEIIVES	16
<i>S. castellii</i>	1	-----	MSNPEASKVYELIVDS	16
<i>S. kluyveri</i>	1	-----	MSNVEACRIYETVVES	16
<i>S. cerevisiae</i>	17	VVNEVREDFENAGIDEQTLQDLKNIWQKKLTETKVTTFPSWDNQFNEGNIN	66	
<i>S. mikatae</i>	46	VVNEVREDFENAGIDEQTLQDLKNIWQKKLTETKVTTFPSWDNQFNEGTVN	95	
<i>S. paradoxus</i>	17	VVNEVREDFENAGIDEQTLQDLKNIWQKKLTETKVTTFPSWDNQFNEGNIN	66	
<i>S. uvarum</i>	51	VVNEVREDFENAGIDEQTLQDLKNIWQKKLTETKVTTFPSWDNQFNEGNVN	100	
<i>S. bayanus</i>	17	VVNEVREDFENAGIDEQTLQDLKNIWQKKLTETKVTTFPSWDNQFNEGNVN	66	
<i>S. castellii</i>	17	VINEVREDFENAGIDEQTLQDLKRVWQTKLTETKVTNFTWDDPELLPDLQQ	66	
<i>S. kluyveri</i>	17	VVNEVREDFENAGIDEQTLQDLRRVWQSKLSDSGVCKFSWDPEPEQRSIT	66	

Abbildung 3.32: Vergleich der N-terminalen Toa1-Sequenzen verschiedener *Saccharomyces*-Hefen. Der Sequenzvergleich wurde nach ClustalW (www.yeastgenome.org) durchgeführt. Aminosäuren, die in allen Stämmen identisch sind, sind gelb unterlegt. Rosa sind diejenigen mit starker Ähnlichkeit, während die grün markierten lediglich schwache Ähnlichkeiten aufweisen. Die rot umrandeten Aminosäuren wurden für eine gerichtete Mutagenese ausgewählt: Y10 E11, V21 R22, E26 N27, L38 K39, K44 L45 und K50 V51.

Auch der C-Terminus von Toa1 ist stark konserviert. Da bei den „GST-Pulldown“-Experimenten der Aminosäurebereich 226-286 als minimale Interaktionsdomäne identifiziert wurde, wurden in diesem Bereich geeignete Aminosäuren für eine gerichtete Mutagenese ausgewählt. Dieser Bereich ist in Abbildung 3.33 dargestellt. Hierbei handelt es sich um Lysin-250 und Valin-251 (K250 V251), außerdem um ein basisches Arginin-Lysin-Arginin-Lysin-Motiv an den Stellen 253, 255, 257 und 259 (R253 K255 R257 K259). Des Weiteren wurden Leucin-263 und Lysin-264 (L263 K264), Isoleucin-269 und Arginin-271 (I269 R271) sowie Phenylalanin-276 und Lysin-278 (F276 K278) mutagenisiert.

<i>S. cerevisiae</i>	215	T	D	E	V	G	S	E	L	D	D	S	D	D	D	Y	L	I	S	E	G	E	E	D	G	P	D	E	N	L	M	L	C	L	Y	D	K	V	T	R	T	K	A	R	W	K	C	S	L	K	D	264
<i>S. mikatae</i>	239	T	D	E	V	G	S	E	L	D	D	S	D	D	D	Y	L	I	S	E	G	E	E	D	G	P	D	E	N	L	M	L	C	L	Y	D	K	V	T	R	T	K	A	R	W	K	C	S	L	K	D	288
<i>S. paradoxus</i>	215	T	D	E	V	G	S	E	L	D	D	S	D	D	D	Y	L	I	S	E	G	E	E	D	G	P	D	E	N	L	M	L	C	L	Y	D	K	V	T	R	T	K	A	R	W	K	C	S	L	K	D	264
<i>S. uvarum</i>	243	T	D	E	V	G	S	E	L	D	D	S	D	D	D	Y	L	I	S	E	G	E	E	D	G	P	D	E	N	L	M	L	C	L	Y	D	K	V	T	R	T	K	A	R	W	K	C	S	L	K	D	292
<i>S. bayanus</i>	209	T	D	E	V	G	S	E	L	D	D	S	D	D	D	Y	L	I	S	E	G	E	E	D	G	P	D	E	N	L	M	L	C	L	Y	D	K	V	T	R	T	K	A	R	W	K	C	S	L	K	D	258
<i>S. castellii</i>	171	N	D	E	V	G	S	E	L	D	D	S	D	D	D	Y	L	I	S	E	G	E	D	D	G	P	D	E	N	L	M	L	C	L	Y	D	K	V	T	R	T	K	A	R	W	K	C	S	L	K	D	220
<i>S. kluyveri</i>	141	T	D	E	I	N	S	D	L	D	D	S	E	D	D	Y	L	N	S	S	G	D	E	E	T	A	D	E	N	I	V	L	C	L	Y	E	K	V	L	R	V	K	N	K	W	K	C	N	L	K	D	190

<i>S. cerevisiae</i>	265	G	V	V	T	I	N	R	N	D	Y	T	F	Q	K	A	Q	V	E	A	E	W	V	286
<i>S. mikatae</i>	289	G	V	V	T	I	N	R	N	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	297
<i>S. paradoxus</i>	265	G	V	V	T	I	N	R	N	D	Y	T	F	Q	K	A	Q	V	E	A	E	W	V	286
<i>S. uvarum</i>	293	G	V	V	T	I	N	R	N	D	Y	T	F	Q	K	A	Q	V	E	A	E	W	V	314
<i>S. bayanus</i>	259	G	V	V	T	I	N	R	N	D	Y	T	F	Q	K	A	Q	V	E	A	E	W	V	280
<i>S. castellii</i>	221	G	I	V	T	I	N	H	R	D	Y	S	F	Q	K	A	Q	V	E	A	E	W	V	242
<i>S. kluyveri</i>	191	G	I	A	T	I	N	H	R	D	Y	A	F	Q	K	A	Q	G	E	S	E	W	-	211

Abbildung 3.33: Vergleich der C-terminalen Toa1-Sequenzen verschiedener *Saccharomyces*-Hefen. Der Sequenzvergleich wurde nach ClustalW (www.yeastgenome.org) durchgeführt. Aminosäuren, die in allen Stämmen identisch sind, sind gelb unterlegt. Rosa sind diejenigen mit starker Ähnlichkeit, während die grün markierten lediglich schwache Ähnlichkeiten aufweisen. Die rot umrandeten Aminosäure-Bereiche wurden für eine gerichtete Mutagenese ausgewählt: K250 V251, R253 K255 R257 K259, L263 K264, I269 R271, F276 K278.

3.3.4 *In vitro*-Interaktionsstudien zwischen Ino2 und Toa1-Varianten

Um die in vorhergegangenen Untersuchungen identifizierten Interaktionsdomänen im Aminosäurebereich 1-143 bzw. 226-286 genauer zu charakterisieren, wurden die in Abschnitt 3.3.3 benannten Aminosäuren mittels Mutagenese-PCR mit sequenzspezifischen Oligonucleotiden ausgetauscht. Als Matrize dienten die Plasmide pMS69 (HA₃-Toa1₁₋₁₄₃) bzw. pMS71 (HA₃-Toa1₂₁₀₋₂₈₆). Bei mutierten Plasmiden mit korrektem Restriktionsmuster wurde die gewünschte Mutation durch DNA-Sequenzierung verifiziert (LGC Genomics). Hierbei entstanden die in Tabelle 3.3 aufgeführten Plasmide mit den entsprechenden Toa1-Varianten.

Tabelle 3.3: Plasmide für Interaktionsstudien mit den zugehörigen Toa1-Sequenzvarianten

Plasmidname	Toa1-Längenvariante
pMS181	HA ₃ -Toa1 ₁₋₁₄₃ V21A R22A
pMS183	HA ₃ -Toa1 ₁₋₁₄₃ L38A K39A
pMS209	HA ₃ -Toa1 ₂₁₀₋₂₈₆ K250A V251A
pMS210	HA ₃ -Toa1 ₂₁₀₋₂₈₆ R253A K255A R257A K259A
pMS211	HA ₃ -Toa1 ₂₁₀₋₂₈₆ L263A K264A
pMS212	HA ₃ -Toa1 ₂₁₀₋₂₈₆ I269A R271A
pMS213	HA ₃ -Toa1 ₂₁₀₋₂₈₆ F276A K278A

Mit sequenzspezifischen Oligonucleotiden und pMS69 (HA₃-Toa1₁₋₁₄₃) bzw. pMS71 (HA₃-Toa1₂₁₀₋₂₈₆) als Matrizen wurden zunächst Mutagenese-PCRs durchgeführt. Plasmide mit korrektem Restriktionsmuster wurden durch DNA-Sequenzierung verifiziert und für spätere Expressionstests eingesetzt.

Für die „GST-Pulldown“-Experimente wurden neben den sequenzveränderten Toa1-Varianten die entsprechenden Wildtyp-Längenvarianten (codiert durch pMS69 bzw. pMS71) als Positivkontrollen eingesetzt. Als zu untersuchende Interaktionspartner dienen die TADs von Ino2 (GST-Ino2₁₋₃₅, codiert durch pSH117 und GST-Ino2₁₀₁₋₁₃₅, codiert durch pSH118). Da in vorhergegangenen Untersuchungen der N-Terminus lediglich an die TAD1 von Ino2 binden konnte, wurde für die folgenden Interaktionsstudien auch nur dieser Bereich von Ino2 berücksichtigt. Der C-Terminus bindet an beide TADs, weshalb auch beide auf Bindung an Toa1-Varianten untersucht wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.34 dargestellt.

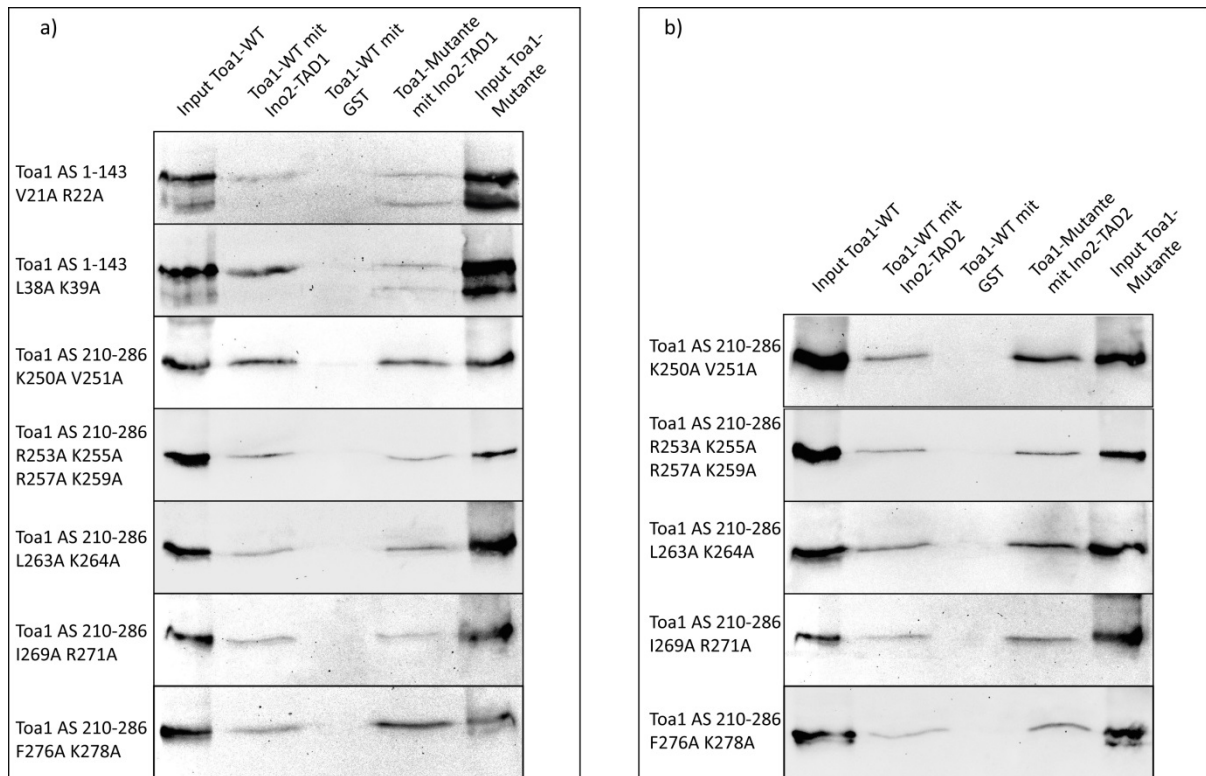


Abbildung 3.34: Interaktionsstudien zwischen Ino2 und Toa1-Varianten.

a) Interaktionsstudien mit GST-Ino2₁₋₃₅ (TAD1; pSH117).

b) Interaktionsstudien mit GST-Ino2₁₀₁₋₁₃₅ (TAD2; pSH118).

Für die „GST-Pulldown“-Experimente wurden Proteinextrakte mit HA₃-Toa1₁₋₁₄₃ (pMS69) bzw. HA₃-Toa1₂₁₀₋₂₈₆ (pMS71) eingesetzt (jeweils links). Die Toa1-Varianten mit den gewünschten Mutationen sind jeweils rechts aufgetragen. GST (pGEX-SCS) diente jedes Mal als Negativkontrolle (Mitte). Die GST-Proteine wurden an GSH-Sepharose immobilisiert und mit vorgeklärten Proteinextrakten inkubiert, die HA₃-Fusionen enthielten. Nach mehrmaligem Waschen mit 1 x PBS wurden die GST-Proteine mittels freiem GSH von der Sepharose eluiert und die Eluate durch SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot und Immunodetektion analysiert.

Die Abbildung zeigt, dass alle Toa1-Varianten beider Verkürzungen noch mit den Ino2-TADs interagieren können. Möglicherweise sind die veränderten Positionen im Toa1 für die Bindung an eine der TADs von Ino2 nicht relevant. Aber auch eine funktionelle Redundanz innerhalb des Proteins ist denkbar, sodass eine Interaktion zwischen Aktivator und Toa1 selbst dann noch gewährleistet ist, wenn eine einzelne Kontaktstelle wegfällt (vgl. die in Abschnitt 3.2.4.2 beschriebenen Befunde mit TAF12 „missense“-Mutanten).

3.3.5 Phänotypische Charakterisierung ausgewählter *Toa1*-Varianten mittels „Plasmid Shuffling“

Um die Ergebnisse der *in vitro*-Interaktionsstudien mit *Toa1*-Teildomänen zu verifizieren, wurden die zuvor getesteten Varianten im Kontext des vollständigen Proteins mit Hilfe der „Plasmid Shuffling“-Strategie untersucht (vgl. Abschnitt 3.2.2.4). Hierbei wird deutlich, ob die in die Sequenz eingeführten Veränderungen auch phänotypische Auswirkungen auf das Wachstum der Hefe haben.

3.3.5.1 Konstruktion des Hefe-Stammes MSY8

Konstruktion des „rescue plasmids“ pMS114

Für diese Untersuchungen musste zunächst ein Hefe-Stamm mit einer *toa1* Nullmutation hergestellt werden. Da *TOA1* ein essenzielles Gen ist, wurde zunächst das sog. „Rescue Plasmid“ pMS114 konstruiert, ein *ARS CEN URA3*-Plasmid mit *TOA1*-Gencassette. Diese wurde mittels PCR und den sequenzspezifischen Oligonucleotiden *Toa1_SacI* 5F und *Toa1_SalI* 3R amplifiziert. Das ca. 1,5 kb große Fragment wurde mit den Enzymen *SacI* und *SalI* geschnitten und in den mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisierten Vektor pRS416 inseriert. Nach Transformation in den Hefe-Stamm JS91.15-23 erfolgte die Selektion auf SCD-Ura-Medium.

Konstruktion der Gendisruptionscassette

Um die $\Delta toa1::LEU2$ -Gendisruptionscassette zu konstruieren, waren zwei PCR-Ansätze notwendig, um die zum *TOA1*-Genort homologen Flanken zu amplifizieren. Dafür dienten zunächst die sequenzspezifischen Oligonucleotide *Toa1_SacI* 5F und *Toa1_BamHI* 3R (Flanke 1, 324 bp). Das Fragment wurde mit *SacI* und *BamHI* geschnitten und in den ebenso linearisierten Vektor pJS491, welcher einen *LEU2*-Selektionsmarker umgeben von zwei Polylinkerregionen enthält, inseriert, wobei das Plasmid pMS112 entstand. Die Flanke 2 (343 bp) wurde mit den Oligonucleotiden *Toa1_BglII* 5F und *Toa1_SalI* 3R amplifiziert und nach Behandlung mit *BglII* und *SalI* in das Plasmid pMS112 inseriert. Das entstandene Plasmid pMS113 enthält nun die $\Delta toa1::LEU2$ -Gendisruptionscassette. Diese wurde mittels Restriktionsspaltung mit *SacI* und *SalI* aus dem Plasmid freigesetzt und in den Hefe-Stamm JS91.15-23, welcher bereits das Plasmid pMS114 trug, transformiert. Die Zerstörung des *TOA1*-Gens und die Insertion der Gendisruptionscassette am richtigen Genort wurde durch eine PCR mit den Oligonucleotiden *LEU2*-ORF und *TOA1*-Veri sowie chromosomaler DNA der Transformanden verifiziert (ergab ein 669 bp großes Fragment). Auf diese Weise entstand der Hefe-Stamm MSY7.

Rückgewinnung des *LEU2*-Selektionsmarkers („marker rescue“)

Da für den weiteren Verlauf des „Plasmid Shuffling“ der *LEU2*-Selektionsmarker wieder zur Verfügung stehen musste, war es notwendig, ein sog. „marker rescue“ durchzuführen. Dafür wurde das Plasmid pSH62 (Güldener *et al.*, 1996) in den Stamm MSY7 transformiert. Dieses Plasmid codiert für die cre-Rekombinase unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors und trägt das *HIS3*-Gen als Selektionsmarker. Nach Transformation des Plasmids in MSY7 und Kultivierung auf SCGal-His Medium wurden die loxP-Stellen, die den *LEU2*-Selektionsmarker flankieren, durch die cre-Rekombinase erkannt und gebunden, wodurch der *LEU2*-Marker herausgeschnitten und die entstandene Lücke wieder geschlossen wird.

(Sauer *et al.*, 1987). Der Verlust des *LEU2*-Selektionsmarkers wurde durch Replikplattierung auf SCD-His (Wachstum) und SCD-Leu (kein Wachstum) überprüft. Nach Kultivierung auf Vollmedium ging auch das Plasmid pSH62 wieder verloren, sodass kein Wachstum auf SCD-His-Selektionsmedium mehr möglich war. Dieser Stamm erhielt den Namen MSY8.

3.3.5.2 Insertion der zu testenden *TOA1*-Varianten in ein *LEU2*-Centromerplasmid

Konstruktion der Positivkontrolle pMS115

Sowohl die *TOA1*-Varianten als auch die Positivkontrolle mit dem *TOA1*-Wildtypgen wurden für das „Plasmid Shuffling“ in ein *ARS CEN LEU2*-Plasmid eingesetzt. Um das vollständige *TOA1*-Gen unter Eigenpromotorkontrolle zu amplifizieren, wurden die Oligonucleotide Toa1_SacI 5F und Toa1_SalI 3R für eine PCR eingesetzt, bei der ein 1,5 kb großes Fragment entstand. Dieses wurde mit den Enzymen *SacI* und *SalI* geschnitten und in den mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisierten Vektor YCp111 inseriert. Das so entstandene Plasmid pMS115 diente als Positivkontrolle im Verlauf des „Plasmid Shuffling“.

Konstruktion von *TOA1* Varianten im Bereich der Aminosäuren 1-143

Da es nicht gelang, Mutagenese-PCRs mit sequenzspezifischen Oligonucleotiden und pMS115 (7,6 kb) als Matrize durchzuführen, wurde eine andere Strategie mit einem kleineren Mutageneseplasmid verfolgt. Dafür wurde das *TOA1*-Fragment mit den Enzymen *EcoRI* und *PstI* aus dem Plasmid pMS115 herausgeschnitten und in den Vektor pUC19 inseriert, der zuvor mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisiert worden war. Es entstand das Plasmid pMS196, welches mit einer Größe von 4,2 kb geeigneter für eine Mutagenese-PCR war. Nach erfolgreicher Konstruktion von pMS196-Varianten durch Oligonucleotid-vermittelte Mutagenese und Verifizierung der gewünschten Mutationen durch DNA-Sequenzierung (LGC Genomics) wurden die *TOA1*-Sequenzen aus den konstruierten Plasmiden mittels *EcoRI* und *PstI*-Verdau herausgeschnitten und in den Vektor YCp111 inseriert. Es entstanden die in Tabelle 3.4 dargestellten *ARS CEN LEU2*-Plasmide.

Tabelle 3.4: *ARS CEN LEU2*-Plasmide mit *TOA1*-Sequenzvariationen im N-Terminus

Plasmidname	Toa1-Sequenzvariante
pMS203	Toa1 ₁₋₁₄₃ Y10A E11A
pMS204	Toa1 ₁₋₁₄₃ V21A R22A
pMS205	Toa1 ₁₋₁₄₃ E26A N27A
pMS206	Toa1 ₁₋₁₄₃ L38A K39A
pMS207	Toa1 ₁₋₁₄₃ K44A L45A
pMS208	Toa1 ₁₋₁₄₃ K50A V51A

Mit sequenzspezifischen Oligonucleotiden und pMS196 als Matrize wurde zunächst eine Mutagenese-PCR durchgeführt. Plasmide mit korrektem Restriktionsmuster wurden durch DNA-Sequenzierung verifiziert. Anschließend wurden die *TOA1*-Varianten als *EcoRI/PstI*-Fragmente in den Vektor YCp111 inseriert, wobei die Plasmide pMS203-208 entstanden.

Konstruktion von *TOA1* Varianten im Bereich der Aminosäuren 210-286

Die Oligonucleotid-vermittelte Einführung von Sequenzveränderungen in den für den C-Terminus codierenden Teil des *TOA1* Gens gelang mit pMS115 als Mutagenesematrize. Plasmidvarianten mit korrektem Restriktionsmuster wurden wiederum durch DNA-Sequenzierung kontrolliert (LGC Genomics). Die konstruierten *ARS CEN LEU2*-Plasmide sind in Tabelle 3.5 aufgelistet.

Tabelle 3.5: *ARS CEN LEU2*-Plasmide mit *TOA1*-Sequenzvariationen im C-Terminus

Plasmidname	Toa1-Sequenzvariante
pMS147	Toa1 ₂₁₀₋₂₈₆ K250A V251A
pMS148	Toa1 ₂₁₀₋₂₈₆ R253A K255A R257A K259A
pMS149	Toa1 ₂₁₀₋₂₈₆ L263A K264A
pMS150	Toa1 ₂₁₀₋₂₈₆ I269A R271A
pMS151	Toa1 ₂₁₀₋₂₈₆ F276A K278A

Mit sequenzspezifischen Oligonucleotiden und pMS115 als Matrize wurde eine Mutagenese-PCR durchgeführt. Plasmide mit korrektem Restriktionsmuster wurden durch DNA-Sequenzierung verifiziert. Es entstanden die Plasmide pMS147-pMS151.

3.3.5.3 Phänotypische Charakterisierung der *TOA1*-Varianten

Der Stamm MSY8 wurde mit den Plasmiden YCp111 (Negativkontrolle), pMS115 (Positivkontrolle) und pMS147-pMS151 bzw. pMS203-pMS208 transformiert und auf SCD-Ura-Leu Medium selektiert. Nach dem Anwachsen der Transformanden erfolgte eine Übertragung der Zellen auf FOA-haltiges Selektivmedium. Durch den Zusatz von FOA zum Medium geht das Plasmid mit *URA3*-Selektionsmarker verloren, sodass man den Einfluss der auf dem verbleibenden *ARS CEN LEU2*-Plasmid vorhandenen *TOA1*-Varianten untersuchen kann.

3 Ergebnisse

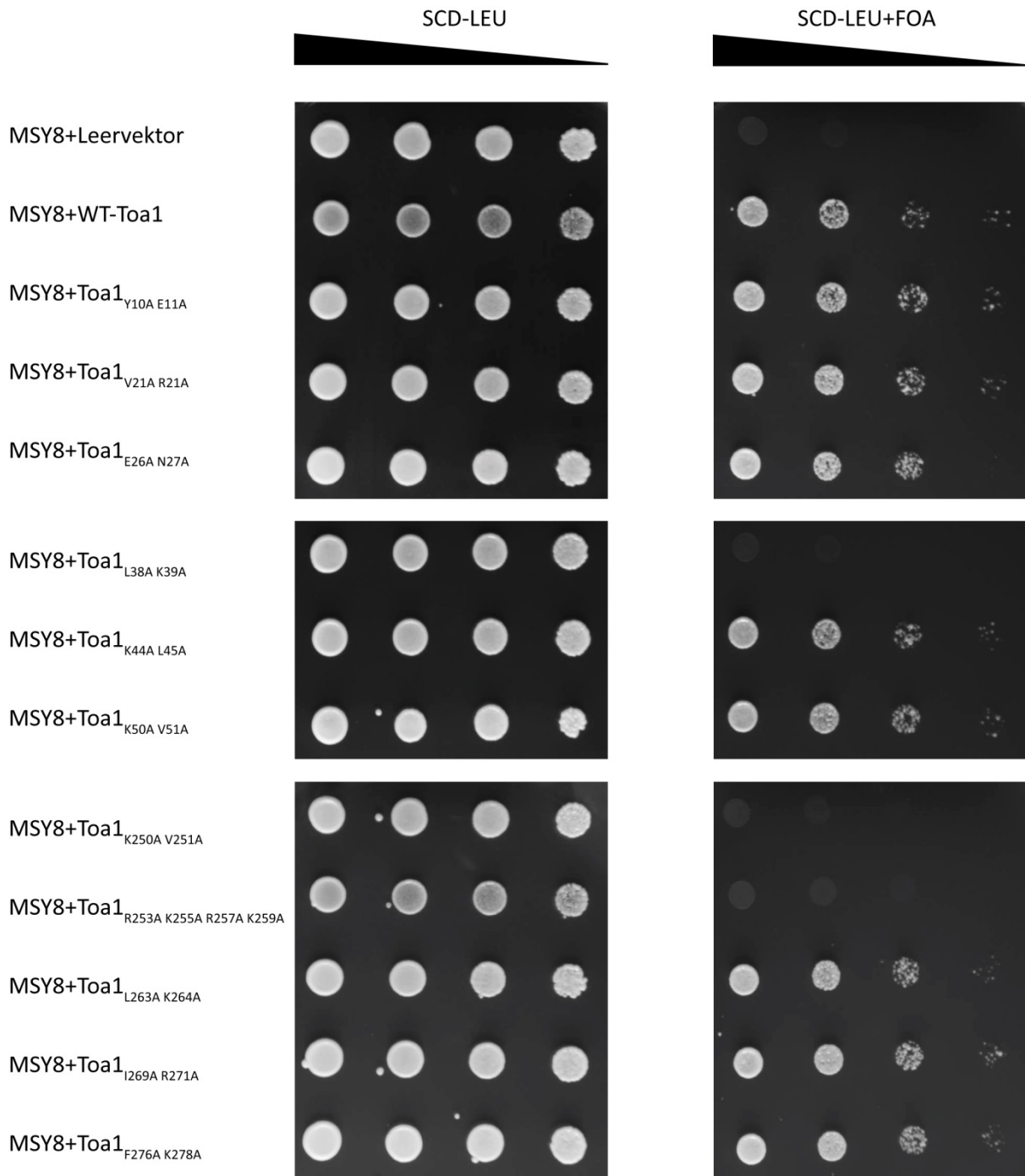


Abbildung 3.35: „Plasmid Shuffling“ mit *TOA1*-Varianten. Gezeigt ist das Wachstumsverhalten nach der Transformation des Stammes MSY8 mit YCp111 (Negativkontrolle), pMS115 (Positivkontrolle) und diversen *TOA1*-Varianten, codiert durch die Plasmide pMS203 (Y10A E11A), pMS204 (V21A R22A), pMS205 (E26A N27A), pMS206 (L38A K39A), pMS207 (K44A L45A), pMS208 (K50A V51A), pMS147 (K250A V251A), pMS148 (R253A K255A R257A K259A), pMS149 (L263A K264A), pMS150 (I269A R271A) und pMS151 (F276A K278A) auf SCD-Leu und SCD-Leu+FOA.

Abbildung 3.35 zeigt das Wachstumsverhalten der *TOA1*-Varianten im Stamm MSY8 auf verschiedenen Selektionsmedien, wobei alle Plasmide ein Wachstum auf SCD-Leu-Medium ermöglichen. Um den Einfluss der auf diesen Plasmiden vorliegenden *TOA1*-Varianten zu untersuchen, wurden die

Zellen auf FOA-haltigem Medium kultiviert. Hier ist zu sehen, dass Zellen, welche lediglich den Leervektor enthalten, nicht mehr lebensfähig sind, weil das *ARS CEN URA3*-„Rescue Plasmid“ (pMS114), welches den *TOA1*-Wildtyp trug, verloren ging. Dementsprechend lässt sich folgern, dass die Mutationen L38A K39A, K250A V251A und R253A K255A R257A K259A zu *Toa1*-Varianten führen, welche den Verlust des „rescue plasmids“ nicht ausgleichen können. Um einen eventuellen Einfluss der Inositol-Verfügbarkeit auf diesen Effekt zu untersuchen, wurden die Zellen zusätzlich auf FOA-haltiges Medium mit bzw. ohne Inositol-Zusatz transferiert.

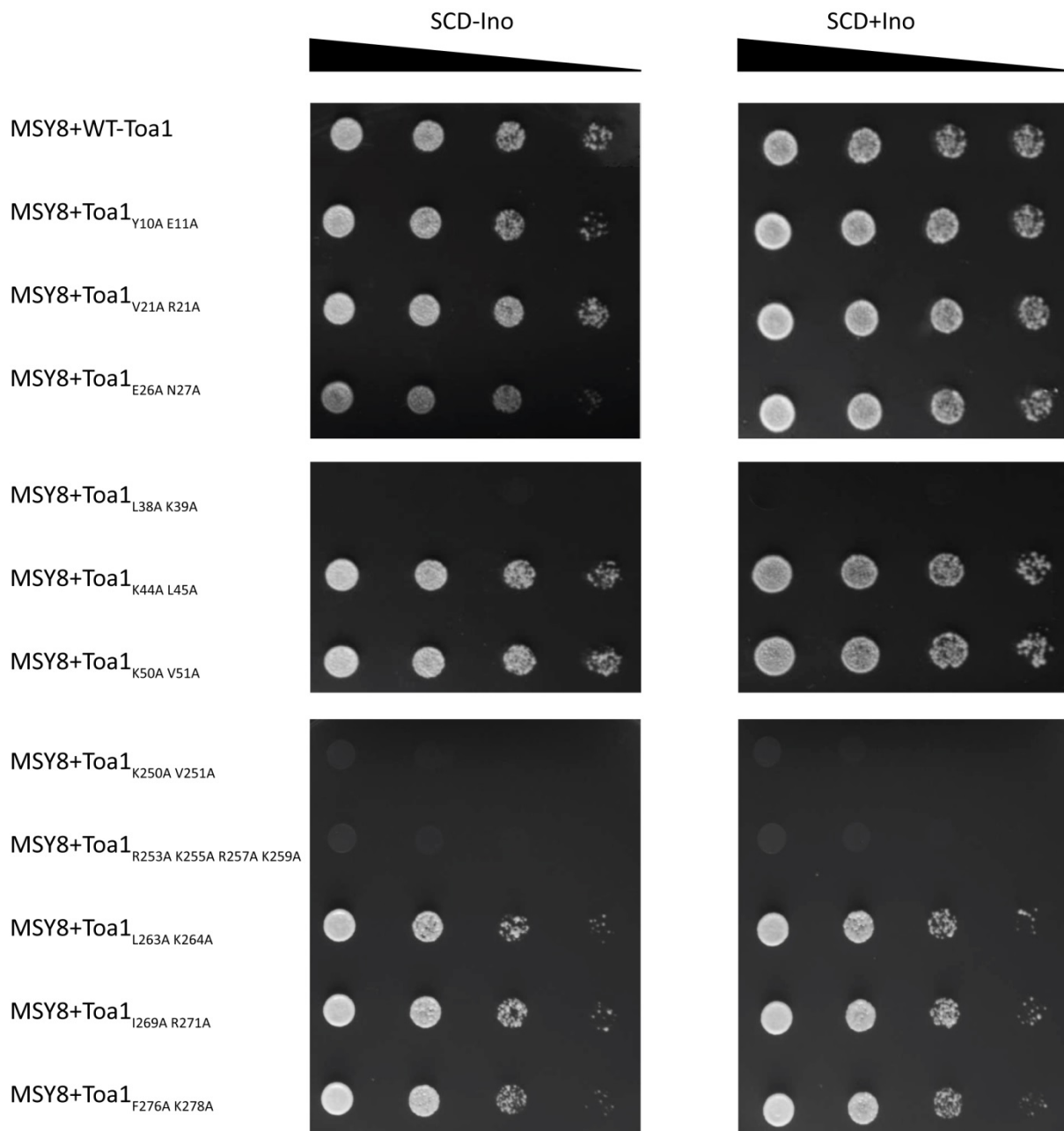


Abbildung 3.36: Untersuchungen zur Inositolabhängigkeit der im „Plasmid Shuffling“ untersuchten *TOA1*-Varianten. Gezeigt ist das Wachstumsverhalten nach der Transformation des Stammes MSY8 mit pMS115 (Positivkontrolle) und diversen *TOA1*-Varianten, codiert durch die Plasmide pMS203 (Y10A E11A), pMS204 (V21A R22A), pMS205 (E26A N27A), pMS206 (L38A K39A), pMS207 (K44A L45A), pMS208 (K50A V51A), pMS147 (K250A V251A), pMS148 (R253A K255A R257A K259A), pMS149 (L263A K264A), pMS150 (I269A R271A) und pMS151 (F276A K278A) auf SCD-Leu+FOA mit bzw. ohne Inositol-Zusatz.

Abbildung 3.36 zeigt, dass die Verfügbarkeit von Inositol keinen Einfluss auf das Wachstum der Transformanden hat. Solche, die schon in vorherigen Versuchen kein Wachstum auf FOA-haltigem Medium zeigten, sind auch durch Zugabe der Phospholipid-Vorstufe nicht lebensfähig.

Für die basischen Reste R/K 253 255 257 259 konnten Geiger *et al.* (1996) zeigen, dass sie wichtig für die Bildung des TFIIA-TBP-TATA-Box-Komplexes sind. Demnach konnte mit dieser Arbeit bestätigt werden, dass eine solche Mutation zu einem funktionsdefekten Protein führt, wenn auch nicht durch fehlende Interaktion mit dem Aktivator Ino2.

Um auch hier, ähnlich wie für Taf1 und Taf12, einen eventuellen Einfluss auf die Expression des *INO1*-Gens zu ermitteln, wurden die lebensfähigen *TOA1*-Genvarianten quantitativ charakterisiert (vgl. Abschnitt 3.2.2.5). Hefezellen, die nach Selektion auf FOA-haltigem Medium das *ARS CEN URA3*-„Rescue Plasmid“ verloren hatten, sollten wieder Uracil-negativ sein (kein Wachstum auf SCD-Ura-Selektivmedium). Nach Transformation mit dem Plasmid pJS325 (enthält ein *INO1-lacZ*-Reporter gen) wurden Zellextrakte der Transformanden für einen β -Galactosidasetest eingesetzt. Im Falle der *Toa1*-Varianten konnte jedoch kein Unterschied der Reporter genaktivierung im Vergleich zum *Toa1*-Wildtyp detektiert werden (Daten nicht gezeigt), sodass zusammengefasst werden kann, dass die untersuchten *Toa1*-Varianten entweder zu einem Wachstumsverlust führten (letale Mutation) oder keinen Einfluss, weder auf den Phänotyp noch den Genotyp der Hefe, hatten.

3.3.6 Eingrenzung der Ino2-Interaktionsdomäne in Toa2

Neben *Toa1* wurde auch die zweite TFIIA-Untereinheit *Toa2* in kleinere Abschnitte geteilt, auf stabile Expression getestet und für Tests auf Interaktion mit Ino2 verwendet. *Toa2* besitzt lediglich 122 Aminosäuren und wurde unter Berücksichtigung einer Sekundärstrukturvorhersage und einem Sequenzvergleich zwischen verschiedenen Hefe-Stämmen in unterschiedliche Abschnitte geteilt. Zur Konstruktion HA₃-markierter *Toa2*-Längenvarianten wurden die entsprechenden Gensegmente mittels PCR und sequenzspezifischer Oligonucleotide amplifiziert und die entstandenen Fragmente in den Vektor pASK-IBA5HA-XhoI (zur Expression in *E. coli* BL21) bzw. p426-MET25HA (zur Expression in der Hefe *S. cerevisiae*) inseriert. Die hierbei entstandenen Plasmide sind in Tabelle 3.6 dargestellt.

Tabelle 3.6: Konstruierte Plasmide mit den zugehörigen Toa2-Längenvarianten

Plasmidname	Toa2-Längenvariante	Vektor
pMS84	AS 1-55	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS85	AS 56-122	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS98	AS 1-55	p426-MET25HA
pMS99	AS 1-65	p426-MET25HA
pMS102	AS 1-80	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS103	AS 81-122	pASK-IBA5HA-XhoI

Die Fragmente wurden mittels PCR mit sequenzspezifischen Oligonucleotiden amplifiziert, mit BamHI und HindIII geschnitten und in die linearisierten Vektoren pASK-IBA5HA-XhoI bzw. p426-MET25HA inseriert. Verifizierte Plasmide wurden weiterhin zur Transformation und für Expressionstests in *E. coli* BL21 oder der Hefe *S. cerevisiae* C13-ABY.S86 eingesetzt.

Leider konnte von den in Tabelle 3.6 aufgeführten Plasmiden nur für die von pMS85 codierte HA₃-Toa2₅₆₋₁₂₂ Fusion in *E. coli* BL21 eine erfolgreiche Synthese festgestellt werden, sodass mit diesem Proteinabschnitt auch ein „GST-Pulldown“ durchgeführt wurde. Alle anderen Proteinvarianten waren weder in Hefe noch in *E. coli* synthetisierbar. Für die Interaktionsstudie wurde die vom Plasmid pSS56 codierte GST-Ino2 Fusion mit dem vollständigen Ino2 eingesetzt. Die Abbildung 3.37 zeigt, dass der C-Terminus von Toa2 mit Ino2 interagieren kann.

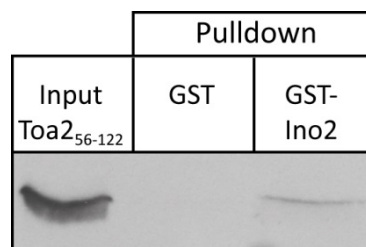


Abbildung 3.37: Interaktionsstudie zwischen Ino2 und einer Toa2-Längenvariante. Gezeigt sind die Ergebnisse des „GST-Pulldowns“ zur Untersuchung der Interaktion zwischen HA₃-Toa2₅₆₋₁₂₂ (pMS85) und GST-Ino2 (pSS56). Als Negativkontrolle diente GST (pGEX-SCS). Alle Proteinextrakte wurden aus *E. coli* BL21 gewonnen. Die GST-Proteine wurden an GSH-Sepharose immobilisiert und mit vorgeklärtem Proteinextrakt inkubiert, der die genannte HA₃-Fusion enthielt. Nach mehrmaligem Waschen mit 1 x PBS wurden die GST-Proteine mittels freiem GSH von der Sepharose eluiert und die Eluate durch SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot und Immunodetektion analysiert.

3.4 Promotorrekrutierung der ATPasen Sug1, Sug2 und Swi2 durch den Aktivator

Ino2

ATPasen (Adenosintriphosphatasen) stellen eine wichtige Enzymklasse dar, die die Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) in Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat katalysieren und die dabei freigesetzte Energie für weitere Reaktionen, z. B. veränderte Interaktionsmuster oder Konformationen bei Proteinen, nutzen können. Es handelt sich häufig um hoch abundante Proteine, die viele verschiedene Funktionen aufweisen und in fast jedem Stoffwechselweg zu finden sind (Rappas *et al.*, 2004).

3.4.1 *In vitro*-Interaktion von Sug1 und Sug2 mit Ino2

Sug1 (Rpt6) und Sug2 (Rpt4) sind Untereinheiten des 26S Proteasoms, welches ubiquitär in Eukaryoten vorkommt. Dieses besteht aus einem 20S Partikel mit 14 verschiedenen Untereinheiten, welche einen Hohlzylinder formen und die eigentliche Proteaseaktivität besitzen, sowie zwei 19S regulatorische Partikeln, die den Zylinder als „Deckel“ („lid“) an beiden Öffnungen verschließen (Finley *et al.*, 2016). Sie erkennen ubiquitinierte Proteine und sind bei der Einfädung solcher in den 20S Zylinder behilflich, in dem die proteolytische Degradation erfolgt. Die 19S Partikel bestehen aus bis zu 18 Untereinheiten, von denen Rpt1-6 (also auch Sug1 und Sug2) zur Familie der AAA-ATPasen gehören („ATPasen associated with various cellular activities“; Baumeister *et al.*, 1998). Sie besitzen eine konservierte, 230 Aminosäuren lange Region, das sog. AAA-Modul, welche die ATPase-Aktivität vermittelt und die Nukleotid-bindenden Motive Walker A und Walker B enthält (Confalonieri und Duguet, 1995; Walker *et al.*, 1982). Fraser *et al.* beschrieben 1997, dass Sug1 neben der ATPase-Aktivität eine spezifische 3'-5'-Helicase-Aktivität besitzt, was darauf hindeutet, dass die Energie, die bei der Hydrolyse von ATP entsteht, genutzt werden kann, um Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren der DNA-Helix aufzulösen. Außerdem haben die 19S Partikel auch regulatorische Funktionen bei der Transkriptionsinitiation und -elongation (Ferdous *et al.*, 2001), wobei noch unklar ist, durch welchen Mechanismus die Transkription beeinflusst wird. Archer *et al.* (2008) vermuteten, dass der Kontakt zwischen ATPasen und Aktivatoren, der keine Proteolyse zur Folge hat, dazu beiträgt, den Übergang des Präinitiationskomplexes in den Elongationskomplex zu vermitteln. Durch Selektion auf wiederhergestellte Galaktoseverwertung einer *gal4* Mutante wurden *sug1* und *sug2* („suppressor for Gal“) ursprünglich als rezessive Suppressormutationen identifiziert (Matsumoto *et al.*, 1980). 1992 konnten Swaffield *et al.* eine Interaktion zwischen Gal4 und Sug1 nachweisen. 1996 identifizierten Rubin *et al.* Sug1 und Sug2 als Untereinheiten des 26S Proteasoms. Es konnte nachgewiesen werden, dass die 19S ATPasen Sug1, Sug2 und Rpt5 kurze Zeit nach Galaktose-Induktion Gal4-abhängig am Promotor des *GAL1* Gens präsent waren (Gonzalez *et al.*, 2002). Nun stellte sich die Frage, ob Sug1 und Sug2 auch mit anderen Hefe-Aktivatoren interagieren können und somit regulatorischen Einfluss auf die Expression weiterer Gene haben. Dafür wurden im Zuge dieser Arbeit Interaktionsstudien zwischen Sug1 bzw. Sug2 und dem Aktivator Ino2 durchgeführt.

3.4.1.1 Expression von HA₃-Sug1 und HA₃-Sug2 und Interaktionsstudien mit Ino2

Um den für Interaktionsstudien nötigen „GST-Pulldown“ durchführen zu können, war es zunächst nötig, die Vollängenproteine Sug1 und Sug2 mit einer Epitopmarkierung zu versehen. Dafür wurden sequenzspezifische Oligonucleotide für eine PCR eingesetzt, um die entsprechenden Gene zu amplifizieren. Das erhaltene *SUG1* Leserahmenfragment wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xho*I verdaut und dann in die mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisierten Vektoren p426-MET25HA und pASK-IBA5HA-*Xho*I inseriert. Die entstandenen Plasmide pMS77 und pMS82 konnten die Synthese der HA₃-markierten Sug1-Vollängenproteine in dem *S. cerevisiae*-Stamm C13-ABY.S86 bzw. in *E. coli* BL21 gewährleisten. Das mittels PCR amplifizierte *SUG2*-Gen wurde zum einen mit *Clal* und *Xho*I verdaut und dann in den linearisierten Vektor p426-MET25HA inseriert. Das Plasmid pMS78 diente zur Synthese des vollständigen HA₃-markierten Sug2-Proteins in Hefe. Für die Expression in *E. coli* BL21 wurde das Fragment mit den Enzymen *Pst*I und *Xho*I verdaut und in den Vektor pASK-IBA5HA-*Xho*I, ebenfalls mit diesen Enzymen linearisiert, inseriert. Das hier entstandene Plasmid pMS83 diente zur Synthese des vollständigen HA₃-markierten Sug2-Proteins im heterologen System. Für den „GST-Pulldown“ wurden GST-Ino2₁₋₁₃₅ (codiert vom Plasmid pWTH12, enthält TAD1 und TAD2 von Ino2) und GST-Gal4₇₈₆₋₈₈₁ (codiert vom Plasmid pES20, umfasst den Bereich der Gal4-TAD) eingesetzt. Als Negativkontrolle diente GST, codiert vom Plasmid pGEX-SCS.

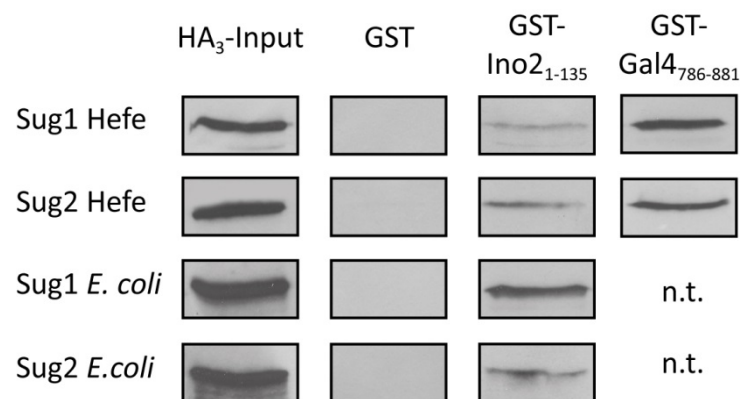


Abbildung 3.38: Interaktion zwischen den Aktivatoren Ino2 bzw. Gal4 und Sug1 bzw. Sug2. Dargestellt (jeweils links) ist zunächst die erfolgreiche Synthese von HA₃-Sug1 in *S. cerevisiae* (pMS77) und *E. coli* BL21 (pMS82) sowie HA₃-Sug2 in *S. cerevisiae* (pMS78) und *E. coli* BL21 (pMS83). Für den „GST-Pulldown“ wurden die Proteine GST-Ino2₁₋₁₃₅ (pWTH12) und GST-Gal4₇₈₆₋₈₈₁ (pES20) eingesetzt. Als Negativkontrolle diente GST aus dem Vektor pGEX-SCS. Die GST-Proteine wurden an GSH-Sepharose immobilisiert und mit vorgeklärten Proteinextrakten inkubiert, die HA₃-Fusionen enthielten. Nach mehrmaligem Waschen mit 1 x PBS wurden die GST-Proteine mittels freiem GSH von der Sepharose eluiert und die Eluate durch SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot und Immunodetektion analysiert.

Abbildung 3.38 zeigt, dass Sug1 und Sug2 sowohl in Hefe als auch in *E. coli* erfolgreich exprimiert werden konnten. Die Interaktionsstudien führten zu dem Ergebnis, dass beide Proteine an die TADs von Ino2 binden können. Außerdem konnte die Bindung von Sug1 und Sug2 an den Aktivator Gal4 bestätigt werden. Die Interaktionsstudien mit Proteinextrakten aus *E. coli* BL21 zeigen außerdem, dass Sug1 und Sug2 ohne Beteiligung weiterer Hefe-Proteine direkt an den Aktivator Ino2 binden.

Um die Bedeutung der beiden TADs für die Interaktion zwischen Ino2 und Sug1 bzw. Sug2 weiter zu charakterisieren, wurden weitere „GST-Pulldown“-Experimente durchgeführt, bei denen GST-Ino2-TAD1 (pSH117) und GST-Ino2-TAD2 (pSH118) eingesetzt wurden.

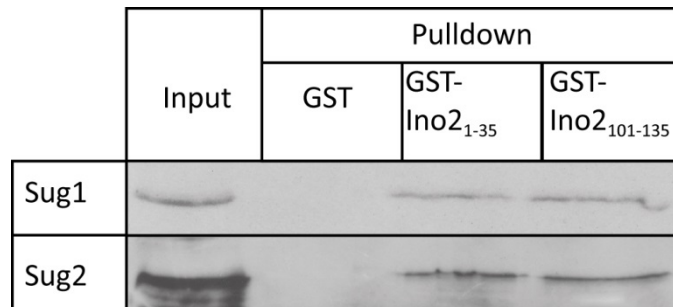


Abbildung 3.39: Interaktion zwischen Ino2-TAD1 bzw. Ino2-TAD2 und Sug1 bzw. Sug2. Für den „GST-Pulldown“ wurden die Proteine GST-Ino2₁₋₃₅ (pSH117) und GST-Ino2₁₀₁₋₁₃₅ (pSH118) eingesetzt. Als Negativkontrolle diente GST aus dem Vektor pGEX-SCS. Als HA₃-Proteine dienten HA₃-Sug1 (codiert durch das Plasmid pMS82) und HA₃-Sug2 (codiert durch das Plasmid pMS83). Die GST-Proteine wurden an GSH-Sepharose immobilisiert und mit vorgeklärten Proteinextrakten inkubiert, die HA₃-Fusionen enthielten. Nach mehrmaligem Waschen mit 1 x PBS wurden die GST-Proteine mittels freiem GSH von der Sepharose eluiert und die Eluate durch SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot und Immunodetektion analysiert.

Abbildung 3.39 zeigt, dass Sug1 und Sug2 die Fähigkeit haben, an beide TADs von Ino2 mit vergleichbarer Intensität zu binden. Hier wird ähnlich wie von Taf10 nicht nur die stärkere TAD1 bevorzugt, sondern es werden beide kontaktiert.

3.4.1.2 Konstruktion von Sug1-Längenvarianten für die Kartierung einer minimalen Interaktionsdomäne

Um den für die Interaktion mit Ino2 verantwortlichen Bereich innerhalb des Sug1-Proteins präziser einzugrenzen, wurden Sug1-Verkürzungen hergestellt und für weitere „GST-Pulldown“-Experimente eingesetzt. Verschiedene Längenvarianten des *SUG1*-Gens wurden mittels PCR und sequenzspezifischer Oligonucleotide amplifiziert und mit BamHI und XhoI endonucleolytisch geschnitten. Die Ligation der Fragmente in den mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisierten Vektor pASK-IBA5HA-XhoI führte zu den in Tabelle 3.7 aufgelisteten Plasmiden. Die konstruierten Plasmide codieren für HA₃-markierte Sug1-Längenvarianten und wurden zum Test auf erfolgreiche Proteinsynthese in *E. coli* BL21 verwendet. Mit den Plasmiden pMS94, pMS95, pMS117, pMS118 und pMS130 konnte eine erfolgreiche Expression der entsprechenden Sug1-Längenvarianten in *E. coli* nachgewiesen werden. Die Plasmide pMS131-pMS134 führten nicht zu einer erfolgreichen bakteriellen Proteinsynthese, weshalb eine Genexpression in *S. cerevisiae* versucht wurde. Die entsprechenden Fragmente wurden in den Hefe-Expressionsvektor p426-MET25HA inseriert, wobei die Plasmide pMS139, pMS140, pMS141 und pMS142 entstanden. Allerdings konnte nur die Längenvariante AS 1-116 (pMS139) als HA₃-markiertes Protein erfolgreich in der Hefe *S. cerevisiae* synthetisiert werden. Daher wurden weitere *SUG1*-Fragmente mit variierenden Endstellen in den Vektor pASK-IBA5HA-XhoI inseriert, um andere Sug1-Längenvarianten mit HA₃-Markierung in *E. coli* BL21 herstellen zu können.

Tabelle 3.7: Plasmide für die Synthese von HA₃-Sug1-Längenvarianten in *E. coli*

Plasmidname	Sug1-Längenvariante	Vektor	Expression
pMS94	AS 1-200	pASK-IBA5HA-XhoI	+
pMS95	AS 201-405	pASK-IBA5HA-XhoI	+
pMS117	AS 1-310	pASK-IBA5HA-XhoI	+
pMS118	AS 117-405	pASK-IBA5HA-XhoI	+
pMS130	AS 117-310	pASK-IBA5HA-XhoI	+
pMS131	AS 1-116	pASK-IBA5HA-XhoI	+
pMS132	AS 117-200	pASK-IBA5HA-XhoI	-
pMS133	AS 201-310	pASK-IBA5HA-XhoI	-
pMS134	AS 311-405	pASK-IBA5HA-XhoI	-
pMS139	AS 1-116	p426-Met25HA	+
pMS140	AS 117-200	p426-Met25HA	-
pMS141	AS 201-310	p426-Met25HA	-
pMS142	AS 311-405	p426-Met25HA	-
pMS152	AS 117-190	pASK-IBA5HA-XhoI	-
pMS153	AS 191-310	pASK-IBA5HA-XhoI	+
pMS154	AS 117-250	pASK-IBA5HA-XhoI	+
pMS155	AS 146-310	pASK-IBA5HA-XhoI	-
pMS156	AS 1-180	pASK-IBA5HA-XhoI	+
pMS157	AS 1-160	pASK-IBA5HA-XhoI	-
pMS158	AS 1-140	pASK-IBA5HA-XhoI	+
pMS167	AS 321-405	pASK-IBA5HA-XhoI	n. t.

Die Fragmente wurden mittels PCR mit sequenzspezifischen Oligonucleotiden amplifiziert, mit BamHI und XhoI geschnitten und in die linearisierten Vektoren pASK-IBA5HA-XhoI bzw. p426-Met25HA inseriert. Plasmide mit dem korrekten Restriktionsmuster wurden zum Test auf Synthese in *E. coli* BL21 eingesetzt.

Die dargestellten Längenvarianten konnten zum größten Teil in *E. coli* BL21 exprimiert werden und wurden für nachfolgende „GST-Pulldown“-Experimente eingesetzt. Die Ergebnisse der Expressionstests und Interaktionsstudien sind in Abbildung 3.40 dargestellt.

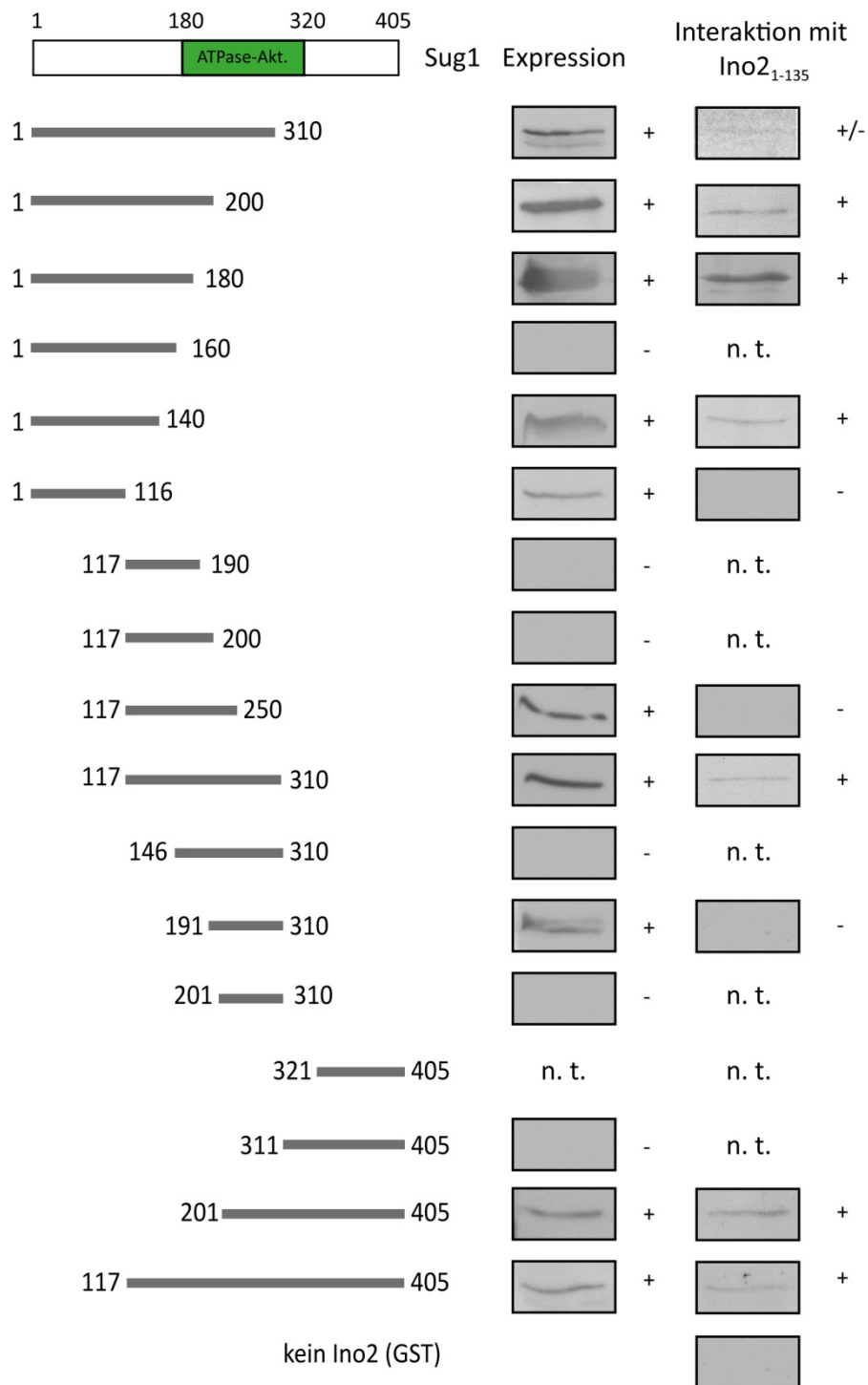


Abbildung 3.40: Kartierung der mit Ino2 interagierenden Sug1-Abschnitte. Links sind die Sug1-Längenvarianten dargestellt, daneben deren Expression und rechts das entsprechende Interaktionssignal mit Ino2. Für den „GST-Pulldown“ wurden das Fusionsprotein GST-Ino2₁₋₁₃₅ (pWTH12) eingesetzt. Als Negativkontrolle diente GST aus dem Vektor pGEX-SCS. Als HA₃-Proteine dienen HA₃-Sug1₁₋₂₀₀ (pMS94), HA₃-Sug1₂₀₁₋₄₀₅ (pMS95), HA₃-Sug1₁₋₃₁₀ (pMS117), HA₃-Sug1₁₁₇₋₄₀₅ (pMS118), HA₃-Sug1₁₁₇₋₃₁₀ (pMS130), HA₃-Sug1₁₋₁₁₆ (pMS139), HA₃-Sug1₁₁₇₋₁₉₀ (pMS152), HA₃-Sug1₁₉₁₋₃₁₀ (pMS153), HA₃-Sug1₁₁₇₋₂₅₀ (pMS154), HA₃-Sug1₁₄₆₋₃₁₀ (pMS155), HA₃-Sug1₁₋₁₈₀ (pMS156) und HA₃-Sug1₁₋₁₄₀ (pMS158). Die GST-Proteine wurden an GSH-Sepharose immobilisiert und mit vorgeklärten Proteinextrakten inkubiert, die HA₃-Fusionen enthielten. Nach mehrmaligem Waschen mit 1 x PBS wurden die GST-Proteine mittels freiem GSH von der Sepharose eluiert und die Eluate durch SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot und Immunodetektion analysiert. In Grün ist die Domäne, welche ATPase-Aktivität vermittelt, dargestellt.

Abbildung 3.40 zeigt, dass die meisten der Längenvarianten in *E. coli* (bzw. im Falle von Sug1₁₋₁₁₆ in Hefe) exprimiert werden konnten, wenn auch zum Teil nur sehr schwach. Die synthetisierten Proteine wurden im Anschluss für Interaktionsstudien mit Ino2₁₋₁₃₅ (enthält TAD1 und TAD2) eingesetzt. Hierbei wurden zwei Bereiche im Sug1 eingegrenzt, die eine Interaktion mit Ino2 vermitteln konnten. Durch Überlappung der Bereiche AS 1-140 und AS 117-310 lässt sich im Bereich AS 117-140 eine Aktivatorbindedomäne vermuten. Die Längenvariante AS 117-250 konnte zwar nicht an Ino2 binden, was aber durch veränderte Faltung der Proteinvariante im Unterschied zum Volllängenprotein erklärt werden könnte. Eine zweite ABD ist im C-Terminus des Proteins lokalisiert. Dafür spricht die Interaktion zwischen Sug1₂₀₁₋₄₀₅ und Ino2 und die fehlende Interaktion zwischen dem Sug1-ATPase Bereich (Sug1₁₉₁₋₃₁₀) und dem Aktivator. Demnach könnte der AS-Bereich 311-405 die Aktivatorbindedomäne 2 enthalten. Leider konnte diese Schlussfolgerung nicht direkt bestätigt werden, weil es nicht gelang, die entsprechende Sug1-Teilsequenz stabil zu synthetisieren.

3.4.1.4 Interaktion von Ino2 mit Sug2-Längenvarianten

Für die Charakterisierung der Interaktion zwischen Sug2 und Ino2 wurden Sug2-Längenvarianten hergestellt und für weitere „GST-Pulldowns“ eingesetzt. Mittels PCR und sequenzspezifischen Oligonucleotiden wurden die für die Aminosäuren 1-327, 123-437 und 1-122 codierenden Bereiche des *SUG2*-Gens amplifiziert und mit *Pst*I und *Xho*I geschnitten. Es erfolgte die Ligation mit dem ebenso linearisierten Vektor pASK-IBA5HA-*Xho*I, wobei die Plasmide pMS119, pMS120 und pMS138 entstanden sind. Diese wurden auf Expression der HA₃-markierten Proteine in *E. coli* BL21 überprüft, wobei sich herausstellte, dass alle Längenvarianten der ATPase im heterologen System synthetisiert werden können. Mit diesen wurden „GST-Pulldown“-Experimente durchgeführt, wobei GST-Ino2₁₋₃₅ (pSH117) und GST-Ino2₁₀₁₋₁₃₅ (pSH118) als zu untersuchende Interaktionspartner dienten.

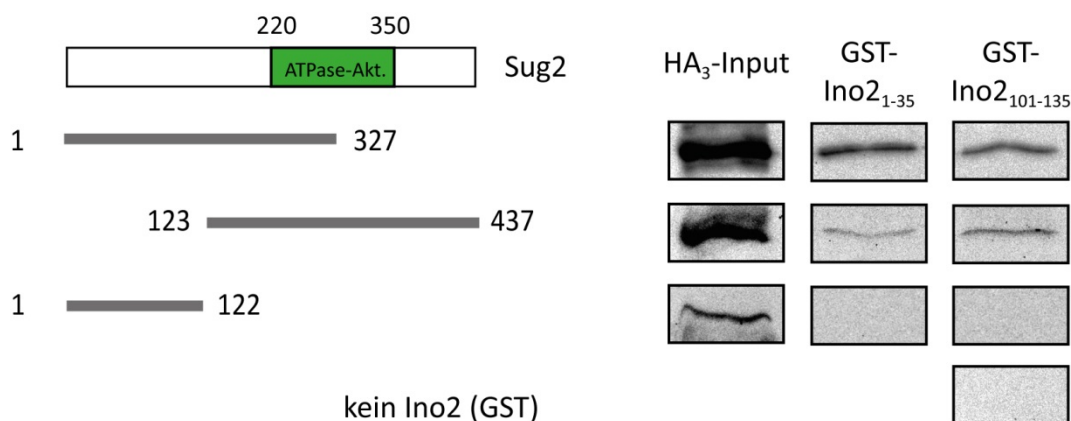


Abbildung 3.41: Interaktion zwischen Ino2 und Sug2-Längenvarianten. Für den „GST-Pulldown“ wurden die Proteine GST-Ino2₁₋₃₅ (pSH117) und GST-Ino2₁₀₁₋₁₃₅ (pSH118) eingesetzt. Als Negativkontrolle diente GST aus dem Vektor pGEX-SCS. Als HA₃-Proteine dienten HA₃-Sug2₁₋₃₂₇ (codiert durch das Plasmid pMS119), HA₃-Sug2₁₂₃₋₄₃₇ (pMS120) und HA₃-Sug2₁₋₁₂₂ (pMS138). Die GST-Proteine wurden an GSH-Sepharose immobilisiert und mit vorgeklärten Proteinextrakten inkubiert, die HA₃-Fusionen enthielten. Nach mehrmaligem Waschen mit 1 x PBS wurden die GST-Proteine mittels freiem GSH von der Sepharose eluiert und die Eluate durch SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot und Immunodetektion analysiert. In Grün ist die Domäne, welche ATPase-Aktivität vermittelt, dargestellt.

Abbildung 3.41 zeigt, dass sowohl der verkürzte N-Terminus als auch der verkürzte C-Terminus mit beiden TADs von Ino2 interagieren kann. Leider gelang es nicht, den überlappenden Bereich (AS 123-327) stabil zu synthetisieren, sodass nicht abschließend gesagt werden kann, ob sich eine ABD im überlappenden Bereich (AS 123-327) befindet, oder, ähnlich wie bei Sug1, zwei nicht überlappende ABDs vorliegen. Da es nicht möglich war weitere verkürzte Sug2-Varianten stabil zu exprimieren bleibt die Frage offen. Die intensive Interaktion zwischen den TADs von Ino2 und der Längenvariante AS 1-327 belegt allerdings, dass hierfür keine vollständige ATPase-Domäne erforderlich ist.

3.4.2 *In vitro*-Interaktion von Swi2 mit Aktivoren der Hefe

Der Chromatinremodellierungskomplex SWI/SNF ist ein großer Komplex aus zwölf Untereinheiten, von denen vor allem Swi2/Snf2 (im Folgenden Swi2 genannt) sowie Snf5 und Swi3 hochkonserviert sind (Kingston und Narlikar, 1999). Swi2 ist mit 194 kDa die größte Untereinheit und besitzt ATPase-Aktivität, die notwendig für das Verschieben von Nucleosomen entlang der DNA ist. Außerdem bindet Swi2 unspezifisch an DNA, erkennt acetylierte Histone mithilfe seiner Bromo-Domäne und interagiert mit weiteren Untereinheiten des SWI/SNF-Komplexes (Peterson und Workman, 2000; Euskirchen *et al.*, 2012). Durch Interaktionen mit unterschiedlichen Aktivoren (z. B. Gal4, Lim *et al.*, 2007; Gcn4, Hap4, Neely *et al.*, 1999 und Rap1, Tomar *et al.*, 2008) erhält der SWI/SNF-Komplex Zugang zu Promotorregionen und ermöglicht nach einer Verschiebung von Nucleosomen den Eintritt weiterer Transkriptionsfaktoren, sodass Swi2 eine positive Wirkung auf die Transkriptionsinitiation besitzt. In vorhergehenden Arbeiten konnten die N-terminalen 450 Aminosäuren von Swi2 (Gesamtlänge des Proteins: 1703 AS) heterolog in *E. coli* exprimiert und für Interaktionsstudien eingesetzt werden. Neben vielen anderen TADs wurden auch die TAD1 von Ino2 sowie die TADs von Aro80 und Gal4 als Interaktionspartner von Swi2 ermittelt (Grigat, 2016). Aro80 ist wie Gal4 ein Zinkclusterprotein und fungiert als Aktivator von Genen zur Verwertung aromatischer Aminosäuren (Iraqi *et al.*, 1999). Im Zuge dieser Arbeit sollten die Interaktionen zwischen diesen Aktivoren und Swi2 genauer untersucht werden.

3.4.2.1 *In vitro*-Interaktion des Gal4 Aktivators mit dem N-Terminus von Swi2

Das für die Synthese des epitopmarkierten N-terminalen Bereichs von Swi2 (AS 1-450) benötigte Plasmid pMG140 lag bereits vor (Grigat, 2016). Ein damit erhaltener bakterieller Gesamtproteinextrakt wurde für Interaktionsstudien mit Gal4 eingesetzt. Für ein „GST-Pulldown“-Experiment wurde das ebenfalls bereits vorhandene Plasmid pES20 (GST-Gal4₇₆₈₋₈₈₁) verwendet, das für eine GST-Fusion der TAD des Aktivators Gal4 codiert.

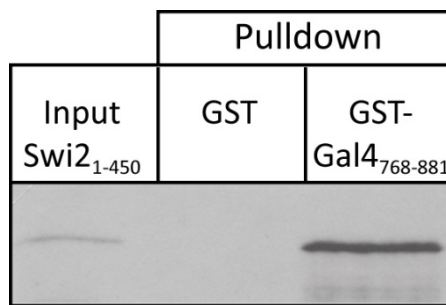


Abbildung 3.42: Interaktion zwischen Gal4 und Swi2. Für den “GST-Pulldown“ wurde GST-Gal4₇₆₈₋₈₈₁ (pES20) eingesetzt, als Negativkontrolle diente GST aus dem Vektor pGEX-SCS. Als HA₃-Protein diente HA₃-Swi2₁₋₄₅₀ (codiert durch das Plasmid pMG140). Die GST-Proteine wurden an GSH-Sepharose immobilisiert und mit einem vorgeklärten Proteinextrakt inkubiert, der die HA₃-Fusion enthielt. Nach mehrmaligem Waschen mit 1 x PBS wurden die GST-Proteine mittels freiem GSH von der Sepharose eluiert und die Eluate durch SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot und Immunodetektion analysiert.

Abbildung 3.42 bestätigt den Befund aus der Arbeit von M. Grigat (2016), dass die TAD des Aktivators Gal4 effizient mit dem N-Terminus von Swi2 interagiert.

3.4.2.2 Kartierung einer Aktivator-Interaktionsdomäne im Swi2-Protein

Um die Aktivator-Interaktionsdomäne innerhalb des Swi2-Proteins möglichst genau eingrenzen zu können, wurden verschiedene HA₃-markierte Längenvarianten konstruiert und in *E. coli* BL21 synthetisiert. Dafür wurden die entsprechenden *SWI2*-Genbereiche mittels PCR anhand sequenzspezifischer Oligonucleotide zunächst amplifiziert und anschließend mit *Bam*HI und *Hind*III geschnitten. Die Fragmente wurden in den mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisierten Vektor pASK-IBA5HA-XhoI inseriert; dabei entstanden die in Tabelle 3.8 aufgelisteten Plasmide.

Tabelle 3.8: Expressionsplasmide für die Synthese von HA₃-Swi2-Längenvarianten in *E. coli*

Plasmidname	Swi1-Längenvariante
pIB1	AS 1-160
pIB2	AS 1-300
pIB3	AS 161-450
pIB4	AS 161-300
pIB5	AS 301-450
pIB7	AS 1-100
pIB8	AS 101-450
pIB9	AS 206-307
pIB12	AS 238-307

Die Fragmente wurden mittels PCR mit sequenzspezifischen Oligonucleotiden amplifiziert, mit *Bam*HI und *Hind*III geschnitten und in den linearisierten Vektor pASK-IBA5HA-XhoI für die Expression in *E. coli* inseriert. Nach Transformation in *E. coli* DH5 α wurde ein Miniscreening durchgeführt, und die Klone mittels Restriktionsspaltung verifiziert. Richtige Klone wurden weiterhin für Expressionstests in *E. coli* BL21 eingesetzt.

Nach Transformation der Plasmide in *E. coli* BL21 wurden die hergestellten Gesamtproteinextrakte mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot auf Expression der Swi2-Varianten überprüft. Bei erfolgreicher Expression wurden die Zellextrakte für „GST-Pulldown“-Experimente eingesetzt, um die Längenvarianten auf Interaktion mit der Gal4-TAD zu testen. Dabei diente GST-Gal4₇₆₈₋₈₈₁ (codiert vom Plasmid pES20) als potenzieller Interaktionspartner.

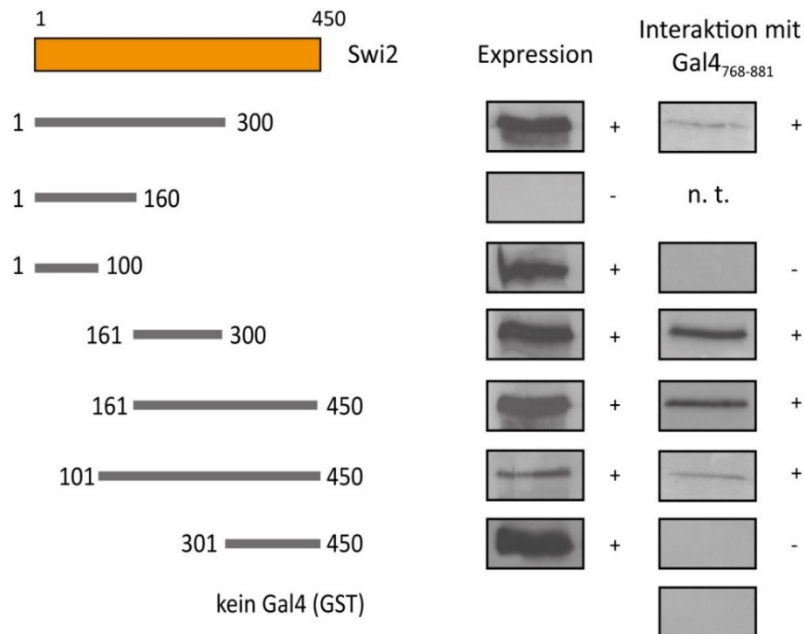


Abbildung 3.43: Interaktionsstudien mit der Gal4-TAD und Swi2-Längenvarianten. Für die „GST-Pulldown“-Experimente wurde das Fusionsprotein GST-Gal4₇₆₈₋₈₈₁ (pES20) eingesetzt. Als Negativkontrolle diente GST aus dem Vektor pGEX-SCS. Als HA₃-Proteine dienten HA₃-Swi2₁₋₁₆₀ (pIB1), HA₃-Swi2₁₋₃₀₀ (pIB2), HA₃-Swi2₁₆₁₋₄₅₀ (pIB3), HA₃-Swi2₁₆₁₋₃₀₀ (pIB4), HA₃-Swi2₃₀₁₋₄₅₀ (pIB5), HA₃-Swi2₁₋₁₀₀ (pIB7) und HA₃-Swi2₁₀₁₋₄₅₀ (pIB8). Die GST-Proteine wurden an GSH-Sepharose immobilisiert und mit vorgeklärten Proteinextrakten inkubiert, die HA₃-Fusionen enthielten. Nach mehrmaligem Waschen mit 1 x PBS wurden die GST-Proteine mittels freiem GSH von der Sepharose eluiert und die Eluate durch SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot und Immunodetektion analysiert.

Aus Abbildung 3.43 geht hervor, dass im Bereich der AS 161-300 eine Aktivatorbindedomäne (ABD) liegt, während der C-terminal gelegene Swi2-Bereich (AS 301-450) als Interaktionsdomäne ausgeschlossen werden kann. Zwar ließ sich der N-terminale Swi2-Bereich (AS 1-160) nicht stabil synthetisieren, aber die ausgebliebene Interaktion mit der Längenvariante AS 1-100 spricht gegen eine weitere ABD im N-Terminus des Proteins. Deshalb wurde der ABD-enthaltende Bereich auch auf Interaktion mit den TADs von Ino2 und Aro80 untersucht. Dafür wurden GST-Ino2₁₋₃₅ (pSH117), GST-Ino2₁₀₁₋₁₃₅ (pSH118) und Aro80₈₄₆₋₉₅₀ (pMG50) für weitere „GST-Pulldown“-Experimente eingesetzt.

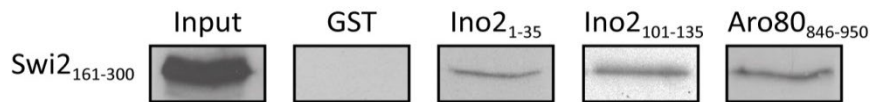


Abbildung 3.44: Interaktion zwischen Hefeaktivatoren und Swi2₁₆₁₋₃₀₀. Für den „GST-Pulldown“ wurden die Proteine GST-Ino2₁₋₃₅ (pSH117), GST-Ino2₁₀₁₋₁₃₅ (pSH118) und Aro80₈₄₆₋₉₅₀ (pMG50) eingesetzt. Als Negativkontrolle diente GST aus dem Vektor pGEX-SCS. Als HA₃-Protein diente HA₃-Swi2₁₆₁₋₃₀₀ (pIB4). Die GST-Proteine wurden an GSH-Sepharose immobilisiert und mit vorgeklärtem Proteinextrakt inkubiert, der die HA₃-Fusion enthielt. Nach mehrmaligem Waschen mit 1 x PBS wurden die GST-Proteine mittels freiem GSH von der Sepharose eluiert und die Eluate durch SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot und Immunodetektion analysiert.

Wie Abbildung 3.44 zeigt, können auch die Aktivatoren Ino2 und Aro80 an die zuvor mit der Gal4-TAD kartierte Domäne innerhalb des Swi2-Proteins binden. Um eine weitere Eingrenzung vornehmen zu können, wurden in diesem Bereich zwei zusätzliche Verkürzungen vom N-Terminus her vorgenommen, die wie oben beschrieben kloniert wurden und zu denen in Tabelle 3.9 aufgeführten Plasmiden pIB9 und pIB12 führten. Die Plasmide wurden in *E. coli* BL21 transformiert und für Expressionstests kultiviert. Dabei dienten GST-Ino2₁₋₃₅ (pSH117), GST-Ino2₁₀₁₋₁₃₅ (pSH118), GST-Aro80₈₄₆₋₉₅₀ (pMG50) und GST-Gal4₇₆₈₋₈₈₁ (pES20) als zu untersuchende Interaktionspartner.

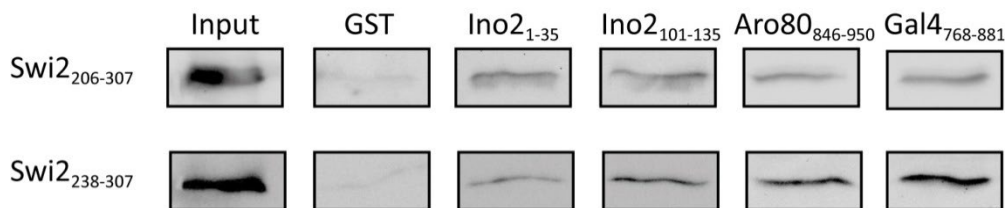


Abbildung 3.45: Interaktionsstudien zwischen der Minimaldomäne von Swi2 und Hefeaktivatoren. Für den „GST-Pulldown“ wurden folgende Proteine eingesetzt: GST-Gal4₇₆₈₋₈₈₁ (pES20), GST-Aro80₈₄₆₋₉₅₀ (pMG50), GST-Ino2₁₋₃₅ (pSH117) und GST-Ino2₁₀₁₋₁₃₅ (pSH118). Als Negativkontrolle diente GST aus dem Vektor pGEX-SCS. Als HA₃-Proteine dienten HA₃-Swi2₂₀₆₋₃₀₇ (pIB9) und HA₃-Swi2₂₃₈₋₃₀₇ (pIB12). Nach Expression in *E. coli* BL21 wurde der Proteinextrakt mitsamt Zelltrümmer mit 10%-iger SDS-Lösung versetzt (EK 0,2%) und für 2 h bei 4°C rotierend inkubiert, anschließend für den Pulldown eingesetzt. Die GST-Proteine wurden an GSH-Sepharose immobilisiert, mit vorgeklärtem HA₃-Proteinextrakt inkubiert und nach mehrmaligem Waschen mit 1 x PBS mittels 20 mM GSH eluiert. Die Eluate wurden für eine SDS-Page mit anschließendem Western-Blot und Immunodetektion eingesetzt.

Bei den Interaktionstests zeigte sich, dass sowohl die etwas längere Swi2-Variante (AS 206-307) als auch die kürzere Variante (AS 238-307) in der Lage war, an die verwendeten Aktivatoren zu binden (Abbildung 3.45). Demnach konnte eine 70 AS lange Swi2-Sequenz (AS 238-307) als vorläufige minimale Aktivatorbindedomäne identifiziert werden.

3.4.2.3 Charakterisierung der Ino2-Swi2-Interaktion mittels gerichteter Mutagenese

Für die identifizierte Minimaldomäne wurde zunächst ein Sequenzvergleich zwischen verschiedenen *Saccharomyces*-Hefen durchgeführt. Darauf basierend wurden spezifische Aminosäuren für eine spätere gerichtete Mutagenese ausgesucht. Hierbei handelt es sich größtenteils um hochkonservierte Aminosäuren mit unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften. Zum Teil wurden, ähnlich zu den bisherigen Studien mit Taf1 und Toa1, hydrophobe und basische Aminosäuren in Kombination ausgewählt und gegen jeweils ein Alanin ausgetauscht. In Abbildung 3.46 ist der Sequenzvergleich des Aminosäurebereichs 238-307 dargestellt. Die für einen Austausch gegen Alanin ausgewählten Aminosäuren sind rot markiert. Hierbei handelt es sich um Phenylalanin-248 und Threonin-249 (F248 T249), Glutaminsäure-251 und Glutamin-252 gefolgt von Serin-253 (E251 Q252 S253), außerdem ein basisch-hydrophobes Leucin-Lysin-Leucin-Lysin-Motiv an den Stellen 256, 257, 263 und 264 (L256 K257 L263 K264). Des Weiteren wurden Isoleucin-260 und Threonin-261 gegen Alanin ausgetauscht (I260 T261), sowie Leucin-266, Valin-267 und Asparagin-268 (L266 V267 N268), Lysin-270 und Prolin-271 (K270 P271) und die drei aufeinanderfolgenden Aminosäuren Valin-279, Isoleucin-280 und Glutamin-281 (V279 I280 Q281). Ein weiteres basisch-hydrophobes Motiv aus Histidin, Prolin, Phenylalanin und Methionin befindet sich an den Stellen 286, 287, 290 und 291 (H286 P287 F290 K291), gefolgt von Arginin-291 und Methionin-292 (R291 M292).

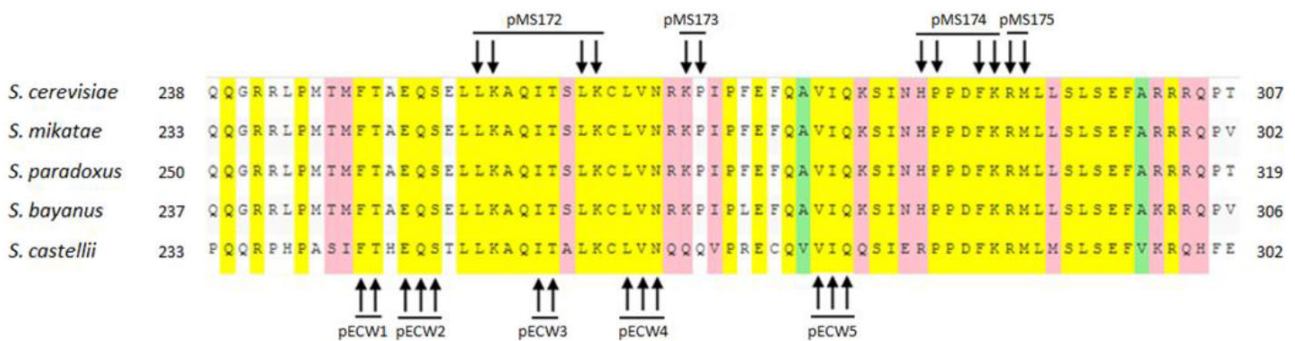


Abbildung 3.46: Vergleich der Swi2-Sequenzen im Aminosäurebereich 286-307 verschiedener *Saccharomyces*-Hefen. Der Sequenzvergleich wurde nach ClustalW (www.yeastgenome.org) durchgeführt. Dargestellt ist der AS-Bereich der Swi2-ABD. Aminosäuren, die in allen Stämmen identisch sind, sind gelb unterlegt. Rosa sind diejenigen mit starker Ähnlichkeit, während die grün markierten lediglich schwache Ähnlichkeiten aufweisen. Die mit einem Pfeil markierten Aminosäuren wurden für eine gerichtete Mutagenese ausgewählt: F248 T249, E251 Q252 S253, L256 K257 L263 K264, I260 T261, L266 V267 N268, K270 P271, V279 I280 Q281, H286 P287 F290 K291, R291 M292.

Für die gerichtete Mutagenese durch PCR mit sequenzspezifischen Oligonucleotiden diente das Plasmid pIB12 mit der Wildtypsequenz Swi2₂₃₈₋₃₀₇ als Matrize. Die hierbei entstandenen Plasmide enthielten eine HA₃-Swi2₂₃₈₋₃₀₇ Fusion mit den gewünschten Mutationen. Die erhaltenen Plasmide wurden durch DNA-Sequenzierung verifiziert (LGC Genomics) und sind in Tabelle 3.9 aufgeführt.

Tabelle 3.9: Plasmide für die Synthese der Swi2-Sequenzvarianten im Aminosäurebereich 238-307

Plasmidname	Swi2-Sequenzvariante
pMS172	Swi2 ₂₃₈₋₃₀₇ L256A K257A L263A K264A
pMS173	Swi2 ₂₃₈₋₃₀₇ K270A P271A
pMS174	Swi2 ₂₃₈₋₃₀₇ H286A P287A F290A K291A
pMS175	Swi2 ₂₃₈₋₃₀₇ R291A M292A
pECW1	Swi2 ₂₃₈₋₃₀₇ F248A T249A
pECW2	Swi2 ₂₃₈₋₃₀₇ E251A Q252A S253A
pECW3	Swi2 ₂₃₈₋₃₀₇ I260A T261A
pECW4	Swi2 ₂₃₈₋₃₀₇ L266A V267A N268A
pECW5	Swi2 ₂₃₈₋₃₀₇ V279A I280A Q281A

Mit sequenzspezifischen Oligonucleotiden und pIB12 als Matrize wurde eine Mutagenese-PCR durchgeführt. Plasmide mit korrektem Restriktionsmuster wurden durch DNA-Sequenzierung verifiziert. Es entstanden die Plasmide pMS172-175 sowie pECW1-pECW5.

Die Proteine wurden nach Transformation der Plasmide in *E. coli* BL21 synthetisiert und der entstandene Gesamtzellproteinextrakt für einen „GST-Pulldown“ eingesetzt, um die Interaktion der veränderten Swi2-Varianten mit dem Wildtyp-Swi2 zu vergleichen. Als zu testender Interaktionspartner diente GST-Ino2₁₋₃₅, codiert vom Plasmid pSH117 und ebenfalls exprimiert in *E. coli* BL21. Als Negativkontrolle diente GST, codiert vom Leervektor pGEX-SCS.

Abbildung 3.47 zeigt zunächst, dass alle Swi2-Varianten stabil in *E. coli* exprimiert werden konnten. Die jeweils im direkten Vergleich zwischen Wildtyp und Mutante durchgeführten Interaktionsstudien ergaben jedoch, dass diese erzeugten Varianten der minimalen Aktivatorbindedomäne von Swi2 weiterhin in der Lage waren, mit der Ino2-TAD1 zu wechselwirken. Ähnlich wie zuvor für Toa1 gezeigt (Abschnitt 3.3.4), ist auch hier denkbar, dass der Verlust einer einzelnen hypothetischen Kontaktstelle noch keinen Interaktionsausfall zur Folge hat (funktionelle Redundanz mehrerer Kontaktstellen).

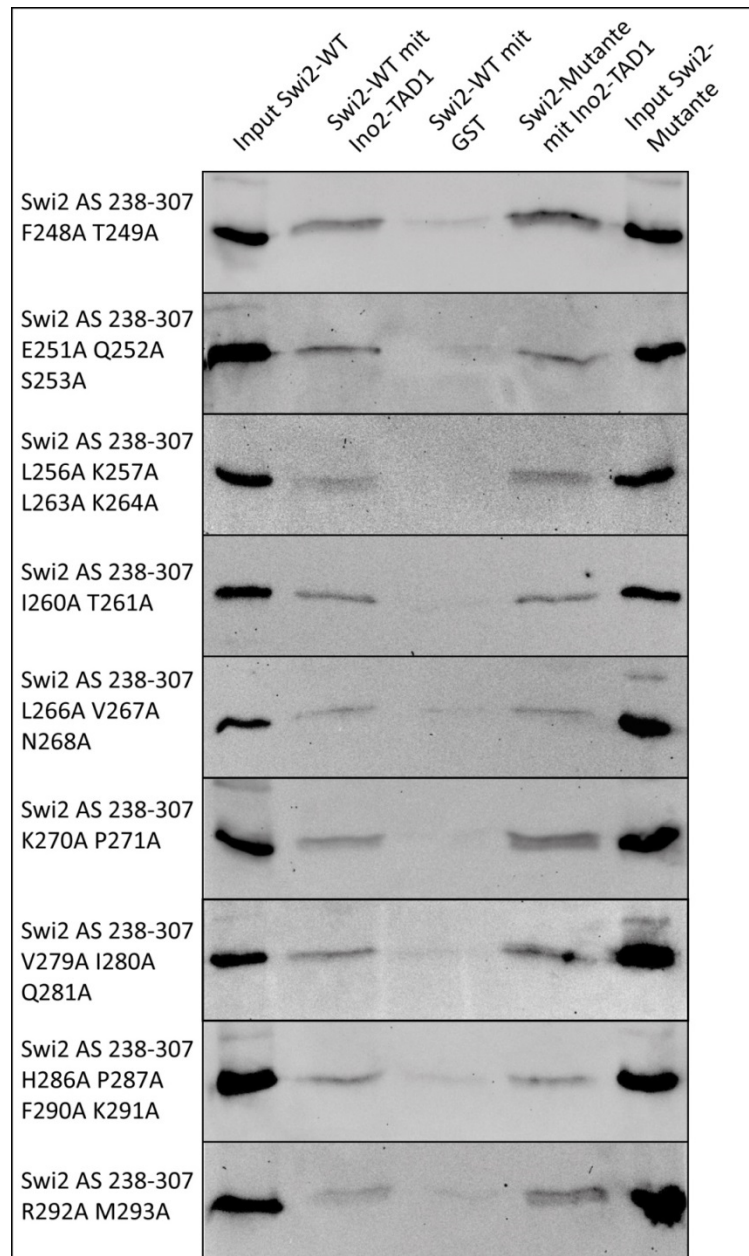


Abbildung 3.47: Interaktionsstudien zwischen Ino2 und Swi2-Varianten.

Für die „GST-Pulldown“-Experimente wurden Proteinextrakte mit HA₃-Swi2₂₈₆₋₃₀₇ (pIB12) eingesetzt (jeweils links). Die Swi2-Varianten mit den gewünschten Mutationen sind jeweils rechts aufgetragen. Die Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen und anschließend mit 10%-iger SDS-Lösung versetzt (EK 0,2%) und für 2 h bei 4°C rotierend inkubiert. Durch anschließende Sedimentation wurde der Proteinextrakt gewonnen. GST (pGEX-SCS) diente jedes Mal als Negativkontrolle (Mitte). Die GST-Proteine wurden an GSH-Sepharose immobilisiert und mit vorgeklärten Proteinextrakten inkubiert, die HA₃-Fusionen enthielten. Nach mehrmaligem Waschen mit 1 x PBS wurden die GST-Proteine mittels freiem GSH von der Sepharose eluiert und die Eluate durch SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot und Immunodetektion analysiert.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung der Promotorrekrutierung von Corepressoren durch Aktivatorproteine

In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* werden die Strukturgene der Phospholipidbiosynthese durch das Vorhandensein der Vorstufenmoleküle Inositol und Cholin im Medium reguliert. Sind Inositol und Cholin (IC) nicht vorhanden, bindet das Aktivatordimer Ino2/Ino4 an das UAS-Element ICRE in Promotorbereichen von Genen wie *INO1*, *CHO1* und *FAS1*, wobei nur Ino2 mit Hilfe seiner TADs (Transkriptionsaktivierungsdomänen) in der Lage ist, die aktivierende Wirkung zu vermitteln (Dietz *et al.*, 2003). Infolgedessen werden Enzyme zur Synthese der Phospholipide bereitgestellt (Schüller *et al.*, 1992a; Nikoloff und Henry, 1994; Schwank *et al.*, 1995). Sind jedoch genügend Inositol und Cholin vorhanden, gelangt der Repressor Opi1 in den Zellkern (Loewen *et al.*, 2004), bindet an die RID (Repressorinteraktionsdomäne) von Ino2 und blockiert dessen Bindung an ICRE (Heyken *et al.*, 2005). Zudem werden Corepressorkomplexe wie Sin3 (Wagner *et al.*, 2001) oder Cyc8/Tup1 (Jäschke *et al.*, 2011) rekrutiert, die wiederum Histondeacetylasen wie z. B. Rpd3, Hda1, Hos1 und Hos2 (Davie *et al.*, 2003; Grigat *et al.*, 2012) in Promotornähe bringen und die Transkription durch lokale Chromatinverfestigung reprimieren (Kasten *et al.*, 1997; Vogelauer *et al.*, 2000).

4.1.1 Der Corepressor Sin3 interagiert mit den Aktivatoren Ino2, Pho4 und Hac1

Der Sin3-Corepressorkomplex ist in *S. cerevisiae* an der Regulation einer Vielzahl von Genen beteiligt. Es werden unter anderem die Strukturgene der Phospholipidbiosynthese (Hudak *et al.*, 1994), der Kaliumaufnahme (Vidal *et al.*, 1990) und des Paarungstypwechsels (Sternberg *et al.*, 1987; Nasmyth *et al.*, 1987) durch die Rekrutierung des Sin3-Corepressors gesteuert. Die größte Untereinheit des Sin3-Corepressorkomplexes ist das Gerüstprotein Sin3. Sin3 hat weder enzymatische noch DNA-Bindeaktivität, besitzt aber verschiedene funktionelle Domänen für die Ausbildung diverser Protein-Protein-Interaktionen. Zahlreiche Repressoren wie Opi1 und Ume6 (Wagner *et al.*, 2001; Washburn und Esposito, 2001) binden an die vier PAHs („paired amphipathic helices“, Wang *et al.*, 1990) und rekrutieren den Corepressorkomplex zu ihren Zielpromotoren. Als enzymatische Komponenten des Corepressorkomplexes fungieren die HDACs (Histondeacetylasen) Rpd3, Hda1 und Hos1, welche über die Histondeacetylase-Interaktionsdomänen HID1-3 an Sin3 binden (Kadosh und Struhl, 1997; Grigat *et al.*, 2012) und durch die Deacetylierung N-terminaler Lysinreste von Histonproteinen eine Verdichtung des Chromatins in Promotorbereichen bewirken.

F. Kliewe konnte mit Hilfe von ChIP-Studien nachweisen, dass Opi1 in Abhängigkeit vom Aktivator Ino2 an ICRE-haltigen Promotoren vorliegt. Da Opi1 über seine Opi1-Sin3-Interaktionsdomäne (OSID; Wagner *et al.*, 2001) mit dem Corepressor interagiert, lag die Vermutung nahe, dass Opi1 für die Anwesenheit von Sin3 an entsprechenden Promotoren verantwortlich ist. Erstaunlicherweise konnte Sin3 auch in Abwesenheit von Opi1, aber in Abhängigkeit von Ino2 an ICRE-haltigen Promotoren nachgewiesen werden. Diese Befunde konnten durch *in vitro*-Interaktionsstudien zwischen Ino2 und Sin3 bestätigt werden. Dabei konnte eine minimale Interaktionsdomäne innerhalb von Ino2

identifiziert werden, die im Aminosäurebereich 119-135 liegt und mit der von Heyken *et al.* (2005) identifizierten Repressorinteraktionsdomäne (RID) überlappt. Die gerichtete Mutagenese der Aminosäuren 130-132 innerhalb der RID von Ino2 (FLD-AAA) führte zu einem Interaktionsverlust zwischen dem Aktivator und dem Corepressor. Der Austausch dieser Aminosäuren ist nach den Befunden von Heyken *et al.* (2005) kritisch für die Interaktion zwischen Ino2 und Opi1 und, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, auch für die Interaktion zwischen Ino2 und Sin3.

Um herauszufinden, ob weitere Aktivatoren mit Sin3 interagieren, wurden zusätzliche *in vitro*-Interaktionsstudien durchgeführt. Auch für Pho4, den Aktivator der Gene des Phosphat-Stoffwechsels (Ogawa und Oshima, 1990), konnte eine Bindung an Sin3 nachgewiesen werden. Diese Befunde decken sich mit den Ergebnissen von R. Aref (2014). Sie konnte innerhalb von Pho4 eine minimale Interaktionsdomäne für Sin3 identifizieren, die sich über die Aminosäuren 156-208 erstreckt. Eine gerichtete Mutagenese sollte Aufschluss über die an der Interaktion beteiligten Aminosäuren geben. Ähnlich der Studien zu Ino2 wurden dafür drei aufeinanderfolgende Aminosäuren ausgewählt, deren biochemische Eigenschaften (zwei hydrophobe Aminosäuren gefolgt von einer sauren) mit denen der in Ino2 für die Bindung essenziellen Aminosäuren übereinstimmen. Der Austausch der Aminosäuren Leucin-170, Phenylalanin-171 und Glutaminsäure-172 zu Alanin hatte jedoch keinen Einfluss auf die Interaktion zwischen Aktivator und Corepressor. Auch für Hac1, Aktivator der UPR („unfolded protein response“) und Regulator von Phospholipidbiosynthesegenen (Kaufmann, 1999), konnte eine Bindung an Sin3 nachgewiesen werden. Die Eingrenzung der Minimaldomäne im Aminosäurebereich 121-217 deckt sich mit den Befunden von F. Kliewe (2013). Eine gerichtete Mutagenese der Aminosäuren Leucin-185, Phenylalanin-186 und Asparaginsäure-187 (ebenfalls zwei hydrophobe AS gefolgt von einer sauren) hatte auch hier keinen Effekt auf die Bindung zwischen Aktivator und Corepressor.

Die *in vitro*-Interaktionen zwischen dem Corepressor Sin3 und den Aktivatoren Ino2 und Pho4 wurden mit Hilfe des „Yeast-Two-Hybrid“-Systems auch *in vivo* untersucht. Während eine Interaktion zwischen dem Repressor Opi1 und Sin3 nachgewiesen wurde, konnte eine *in vivo*-Interaktion zwischen den verkürzten Aktivatoren (ohne die eigenen TADs) und Sin3 nicht bestätigt werden. Vermutlich handelt es sich bei dieser Bindung um eine vorübergehende, schwache Interaktion, die allerdings mit anderen *in vivo*-Experimenten, die auf einem anderen Prinzip beruhen, nachgewiesen werden könnten. Weitere Möglichkeiten zur Analyse von *in vivo*-Interaktionen sind die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (Sung und Huh, 2007) oder die Präzipitation von Proteinkomplexen nach UV-„crosslinking“.

Kartierungsexperimente zeigten, dass es innerhalb von Sin3 zwei Domänen gibt, die für die Bindung der Aktivatoren Ino2, Pho4 und Hac1 verantwortlich sind. Hierbei handelt es sich zum einen um den N-terminalen Aminosäurebereich 1-300, der die PAH1 enthält. Diese Befunde bestätigen die Ergebnisse von Rasha Aref (2014) und Felix Kliewe (2013). Ein weiterer Interaktionsbereich liegt im C-Terminus (AS 1101-1536), welcher die PAH4 und HCR („highly conserved region“) enthält, was für eine Redundanz der Aktivator-Corepressor-Interaktion innerhalb von Sin3 spricht. Aufgrund der

unterschiedlichen Waschstringenzen im Verlauf des Experiments scheinen die Aktivatoren allerdings stärker an den N-Terminus zu binden als an den C-Terminus. Diese Vermutung sollte in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

4.1.2 Der Corepressor Cyc8 interagiert mit den Aktivatoren Ino2, Pho4 und Hac1

Der Cyc8/Tup1-Corepressor ist in *S. cerevisiae* an der Repression einer Vielzahl von Genen verschiedener physiologischer Prozesse beteiligt. Es werden unter anderem glucosereprimierbare Gene (Treitel und Carlson, 1995), Strukturgene des Paarungstypwechsels (Komachi und Johnson, 1997), der DNA-Reparatur (Huang *et al.*, 1998) und der zellulären Stressantwort (Proft *et al.*, 2001) durch die Rekrutierung des Cyc8/Tup1-Corepressors gesteuert. Für die Kontaktaufnahme durch reprimierende Faktoren beinhaltet Cyc8 zehn TPR-Motive („tetratricopeptide repeat“), während Tup1 sogenannte WD40-„Repeats“ besitzt, durch die eine Interaktion mit Histondeacetylasen ermöglicht wird. Diese führen zu einer Deacetylierung der Histone in Promotorbereichen und nachfolgender Verdichtung der Chromatinstruktur. Außerdem kann Tup1 direkt Kontakt zu den hypoacetylierten Histonen H3 und H4 aufnehmen (Edmondson *et al.*, 1996) und dadurch die HDACs direkt zu den Histonen rekrutieren. Darüber hinaus kann Cyc8/Tup1 direkt mit generellen Transkriptionsfaktoren in Kontakt treten. Hier werden vor allem Faktoren des Mediatorkomplexes kontaktiert, die eine Rolle für dessen reprimierende Wirkung haben (Papamichos-Chronakis *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000).

Jäschke *et al.* wiesen 2011 die Interaktion des Corepressors Cyc8 mit dem Repressor der Phospholipidbiosynthesegene Opi1 nach. Dementsprechend wurde vermutet, dass der Corepressor mittels Opi1 an ICRE-haltige Promotoren rekrutiert wird. F. Kliewe konnte allerdings mit Hilfe von ChIP-Studien nachweisen, dass Cyc8, ähnlich wie Sin3, auch in Abwesenheit von Opi1, jedoch abhängig vom Aktivator Ino2 an entsprechenden Promotoren zu finden ist. *In vitro*-Untersuchungen bestätigten eine Interaktion zwischen Ino2 und Cyc8, wobei sich herausstellte, dass Sin3 und Cyc8 die gleiche Minimaldomäne in Ino2 (AS 119-135) kontaktieren. Die gerichtete Mutagenese der Aminosäuren 130-132 innerhalb der RID von Ino2 (FLD-AAA, vgl. Abschnitt 4.1.1) führte zu einem Interaktionsverlust zwischen dem Aktivator und dem Corepressor Cyc8.

Durch weitere *in vitro*-Interaktionsstudien konnten jeweils Interaktionen der Aktivatoren Pho4 und Hac1 mit Cyc8 nachgewiesen werden. Die minimale Cyc8-Interaktionsdomäne im Pho4 erstreckt sich über die Aminosäuren 156-208 und ist identisch mit der Sin3-Interaktionsdomäne. Ein Austausch der Aminosäuren Leucin-170, Phenylalanin-171 und Glutaminsäure-172 zu Alanin (siehe Abschnitt 4.1.1) hatte wiederum keinen Einfluss auf die Interaktion zwischen Aktivator und Corepressor. Ebenso zeigten Austausch der AS 185-187 innerhalb der minimalen Cyc8-Interaktionsdomäne von Hac1 im AS-Bereich 121-217 (siehe Abschnitt 4.1.1) keine Auswirkungen auf die Bindung zwischen Aktivator und Corepressor. Für die hier durchgeführten Interaktionsstudien wurde lediglich die N-terminale Hälfte von Cyc8 mit seinen 10 TPR-Motiven verwendet, die daher auch als Aktivatorinteraktionsdomänen fungieren. Aufgrund früherer Befunde ist davon auszugehen, dass diese Bereiche im Corepressor Cyc8 zumindest teilweise funktionell redundant sind (Jäschke *et al.*, 2011; Tzamarias und

Struhl, 1995), sodass mehrere Teilbereiche des Proteins zur Interaktion mit Aktivatoren in der Lage sind.

4.1.3 Der Einfluss einer Ino2 FLD-AAA-Mutation auf die Expression ICRE-abhängiger Gene

Die Veränderung der Aminosäuren Phenylalanin-130, Leucin-131 und Asparaginsäure-132 innerhalb der Repressorinteraktionsdomäne (RID) von Ino2 zog Interaktionsausfälle mit Opi1 (Heyken *et al.*, 2005), Sin3 und Cyc8 (diese Arbeit) nach sich. Mit Hilfe eines Reportergens (ICRE-CYC1-lacZ) wurden daher die Auswirkungen der veränderten Aminosäuresequenz auf die ICRE-abhängige Genexpression unter unterschiedlichen physiologischen Bedingungen untersucht.

Sind genügend Inositol und Cholin im Medium vorhanden, erfolgt eine Genrepression durch die Bindung des Repressors Opi1 an den Aktivator Ino2. Unter IC-Mangelbedingungen kommt es zur Derepression und somit zur Aktivierung der Gene. Aufgrund des Aminosäureaustauschs FLD-AAA ist Opi1 nicht mehr in der Lage, an den Aktivator zu binden und die Repression der Genexpression geht zurück. Unter dereprimierenden Bedingungen ist die Ino2-Variante nach wie vor in der Lage, die Expression ICRE-abhängiger Gene zu aktivieren, allerdings auf einem geringeren Niveau als der Ino2-Wildtyp. Folglich scheint sich die Sequenzveränderung in Ino2 auch auf die Aktivierung der Genexpression auszuwirken. Dieser Befund steht im Einklang mit der Kartierung der TAD2 des Ino2-Aktivators (AS 101-135; Dietz *et al.*, 2003), die sich mit der zur Bindung von Sin3 bzw. Cyc8 erforderlichen Domäne (RID) zumindest teilweise überschneidet.

In einer *opi1* Nullmutante kann keine Repression beobachtet werden, da der Repressor nicht in der Zelle vorliegt und nicht an den Aktivator Ino2 binden kann. Die Corepressoren Sin3 und Cyc8 scheinen diese Aufgabe von Opi1 nicht zu übernehmen, obwohl sie direkt an die RID von Ino2 binden können und ihrerseits eine Repression hervorrufen könnten. Unter dereprimierenden Bedingungen ist aufgrund der Sequenzveränderungen FLD-AAA in Ino2 erneut ein Abfall der Expression zu beobachten, ein weiterer Hinweis auf den Einfluss der Mutation auf die Aktivierung der Expression. Da dem Corepressor Cyc8/Tup1 in der Vergangenheit auch eine aktivierende Wirkung zugeschrieben wurde (Papamichos-Chronakis *et al.*, 2002), könnte die verminderte Aktivierungsleistung mit der geringeren Bindungseffizienz der Corepressoren an Ino2 erklärt werden. Es ist aber ebenso vorstellbar, dass der FLD-AAA Sequenzaustausch die Erkennung durch einen für die TAD2 wichtigen Coaktivator beeinträchtigt (z. B. Taf10, Abschnitt 4.2.1; Bdf1, Abschnitt 4.2.2; Toa1, Swi2, Sug1 bzw. Sug2) und es dadurch zu einer reduzierten Genaktivierung kommt.

Papamichos-Chronakis *et al.* (2002) stellten fest, dass der Corepressorkomplex sowohl unter reprimierenden als auch unter induzierenden Bedingungen an Zielpromotoren, u. a. dem *GAL1*-Promotor vorlag. Unter reprimierenden Bedingungen (Glucose als C-Quelle) bindet der Repressor Mig1 an Zielpromotoren und rekrutiert den Corepressorkomplex Cyc8/Tup1, der die Repression vermittelt. Die Transkriptionsinduktion erfolgt durch die Bindung des Aktivators Gal4 an UAS_{GAL}-haltige Promotoren, welcher den Coaktivatorkomplex SAGA rekrutiert, der wiederum den Zusammenbau des PIC erleichtert. Im Folgenden vermittelt die SAGA-Untereinheit Gcn5 die Histonacetylierung und somit eine Auflockerung des Chromatins. Die Anwesenheit von Cyc8/Tup1 am induzierten Promotor deutet allerdings darauf hin, dass eine Derepression nicht das Entfernen des

Corepressors vom Promotor erfordert, sondern er im Gegenteil sogar die Rekrutierung des Coaktivators SAGA erleichtert. Als sog. „Brücke“ fungiert hier das Protein Cti6, welches mit Cyc8 und dem SAGA-Komplex interagiert. Durch die SAGA-Rekrutierung ist Cti6 für die nachfolgende Gcn5-abhängige Histon-Acetylierung und die Spt3-vermittelte Promotorbindung des TBP notwendig. Allerdings ist die Anwesenheit von Cti6 in einer $\Delta tup1 \Delta cyc8$ -Doppelmutante nicht mehr erforderlich. Mutationen im SAGA-Komplex können durch das Fehlen des Corepressors ausgeglichen werden, die *GAL1*-Expression erfolgt dann unabhängig von SAGA. Das weist darauf hin, dass SAGA lediglich als Gegenspieler des Corepressors agiert, um die Repressionsleistung auszugleichen und eine Induktion herbeizuführen. Proft und Struhl (2002) beschrieben die aktivierende Wirkung des Corepressors im Falle der durch den Repressor Sko1 regulierten Gene für osmotischen Stress. Unter physiologischen Bedingungen reprimiert Sko1 die Gene für osmotischen Stress durch Cyc8/Tup1-Rekrutierung. Kommt es zu einem osmotischen Stress, phosphoryliert die Hog1 MAP Kinase den Repressor und transformiert ihn zum Aktivator. Währenddessen verbleibt Tup1 am Promotor und unterstützt Hog1 und Sko1 bei der Rekrutierung des SAGA- und des SWI/SNF-Komplexes. Allerdings sind SAGA und SWI/SNF in einer $\Delta tup1 \Delta cyc8$ -Nullmutante entbehrlich für eine erfolgreiche Genexpression. Mennella *et al.* (2003) beobachteten ein ähnliches Ereignis bei der Derepression der Hypoxie-Gene *ANB1* und *HEM13*. Unter Sauerstoff-limitierenden Bedingungen sind diese Gene induziert und erlauben eine effiziente Nutzung des verbleibenden Sauerstoffs. Unter aeroben Bedingungen unterbinden die Repressoren Rox1 und Mot3 die Expression der entsprechenden Gene. Bei einer Derepression dissoziieren die Repressoren von den Promotorbereichen, nicht aber der Corepressor Tup1. Dieser liegt noch bei beginnender Induktion im Promotorbereich der Gene vor.

Die Befunde dieser Arbeit untermauern die Annahme, dass die Corepressoren Sin3 und Cyc8/Tup1 abhängig von der zellulären physiologischen Situation sowohl an der Genrepression als auch an der Genaktivierung beteiligt sein können.

4.2 Charakterisierung der Interaktionen basaler Transkriptionsfaktoren mit dem Aktivator Ino2

Die Transkriptionsinitiation beginnt mit dem Zusammenbau des PICs (Präinitiationskomplex) im Promotorbereich aktiver Gene. Dieser besteht in Eukaryoten aus etwa 65 Proteinen, die in verschiedenen basalen Transkriptionsfaktoren enthalten sind. Im ersten Schritt bindet der basale Transkriptionsfaktor TFIID im Promotorbereich an die TATA-Box und an den Initiator, wodurch der Startpunkt der Transkription festgelegt wird (Chalkley und Verrijzer, 1999). Im weiteren Verlauf der PIC-Assemblierung werden die Transkriptionsfaktoren TFIIA und TFIIB rekrutiert und vervollständigen den „upstream promoter complex“ am Promotor (Sainsbury *et al.*, 2015). TFIIA stabilisiert die Bindung von TFIID an den Promotor (Imbalzano *et al.*, 1994; Kraemer *et al.*, 2001) und ist in der Lage, inhibitorische Faktoren zu verdrängen (Meisterernst und Roeder, 1991). Durch die Bindung von TFIIB werden die Transkriptionsrichtung und der exakte Startpunkt der Transkription festgelegt (Bagby *et al.*, 1995; Kostrewa *et al.*, 2009). Mit dem Erscheinen von TFIIF am Promotorbereich wird auch die

RNA-Polymerase II gebunden und der Kern-PIC vervollständigt. Nach erfolgter Initiation stimuliert TFIIF die frühe RNA-Synthese und verhindert das Pausieren der RNA-Polymerase II während der mRNA-Synthese (Sainsbury *et al.*, 2015). Die basalen Transkriptionsfaktoren TFIIE und TFIIH vervollständigen den PIC, sodass dieser als geschlossener („closed“) PIC vorliegt. TFIIE bindet dabei an die RNA-Polymerase II und stellt die Verbindung zwischen dem PIC und TFIIH her (Flores *et al.*, 1989; Maxon *et al.*, 1994). TFIIH führt mit Hilfe seiner Helicase-Aktivität zur Aufschmelzung des DNA-Doppelstranges und damit zum Übergang vom geschlossenen zum offenen PIC, wobei eine etwa 10 bp große Transkriptionsblase entsteht (Guzder *et al.*, 1994). Außerdem wird die CTD (Carboxyterminale Domäne) der RNA-Polymerase II phosphoryliert, ein notwendiger Schritt für die Transkriptionsinitiation und den erfolgreichen Übergang zur Elongation der mRNA-Synthese (Feaver *et al.*, 1991; Gibbons *et al.*, 2012).

Alle basalen Transkriptionsfaktoren werden von diversen Aktivatorproteinen kontaktiert, die eine Beschleunigung der Transkriptionsinitiation hervorrufen. Um Aktivator-Transkriptionsfaktor-Interaktionen zu verstehen, ist es notwendig, minimale Aktivatorbindedomänen (ABDs) innerhalb der Transkriptionsfaktoren und ihre strukturellen Besonderheiten zu identifizieren. Studien mit Gal11/Med15, einer evolutionär konservierten Untereinheit des Mediators, führten zu der Erkenntnis, dass drei voneinander unabhängige Domänen in der Lage sind, den Aktivator Gcn4 der Aminosäurebiosynthese zu kontaktieren (Park *et al.*, 2000; Jedidi *et al.*, 2010; Herbig *et al.*, 2010). Aufgrund der zumeist vorübergehenden und schwachen Bindung der Aktivatoren an Transkriptionsfaktoren gibt es nur wenige Studien zu den strukturellen Mechanismen einer solchen Bindung. NMR-Studien zeigten anhand der Aktivatoren VP16 und Gcn4, dass die TADs (Transkriptionsaktivierungsdomänen) der Aktivatoren eine ungeordnete Struktur aufweisen, aber durch Kontakt mit Coaktivatoren eine definierte helicale Struktur annehmen. Für Gal11/Med15 und humanes Taf9 konnten hydrophobe Kontakte zwischen TADs und dem Coaktivator nachgewiesen werden, die zur Transformation einer solchen ungeordneten Struktur zu einer α -Helix führten (Uesugi *et al.*, 1997; Jonker *et al.*, 2005; Brzovic *et al.*, 2011).

Um den Einfluss der Transkriptionsfaktoren TFIID und TFIIA auf die Expression der Phospholipidbiosynthesegene zu untersuchen, wurden bereits bekannte Interaktionen zwischen dem Aktivator Ino2 und den basalen Transkriptionsfaktoren Taf1, Taf12 und Toa1 charakterisiert, sowie mit Hilfe von *in vitro*-Bindestudien weitere Kontakte zwischen dem Aktivator und der Transkriptionsmaschinerie beschrieben. Die Abbildung 4.1 zeigt schematisch zusammengefasst die Aktivatorkontakte zu basalen Transkriptionsfaktoren, die an ICRE-haltigen Promotoren stattfinden können und von S. Hintze (2014) sowie im Zuge dieser Arbeit beschrieben wurden.

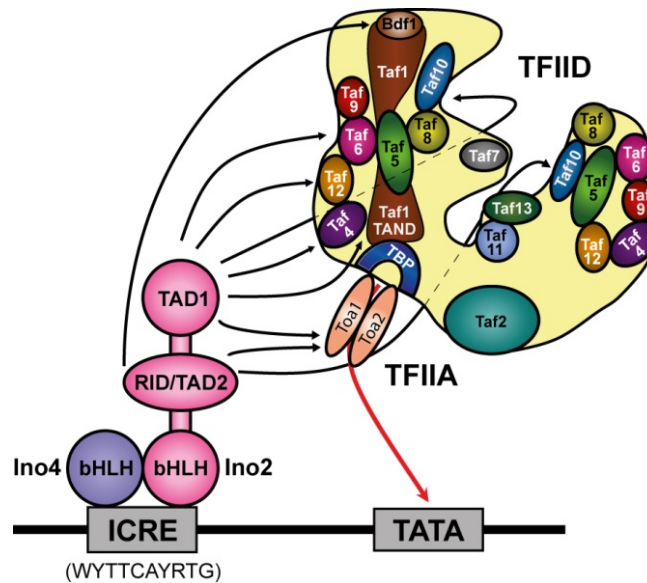


Abbildung 4.1: Modell zur Ino2-vermittelten Bindung von TFIIA und TFIID im Promotorbereich ICRE-abhängiger Gene. Dargestellt ist ein ICRE-haltiger Promotorbereich, an den das Aktivatorodimer Ino2/Ino4 bindet. Die schwarzen Pfeile deuten die Interaktionen zwischen Ino2 und den Untereinheiten der Transkriptionsfaktoren TFIID und TFIIA an, aufgrund derer die Bindung von TBP im Promotorbereich an die TATA-Box katalysiert wird (roter Pfeil).

4.2.1 Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors TFIID für die Phospholipidbiosynthese

Hintze *et al.* (2017) beschrieben zahlreiche direkte Interaktionen zwischen dem Aktivator Ino2 und fünf Taf-Untereinheiten des Transkriptionsfaktors TFIID. Taf1, Taf4, Taf6, Taf10 und Taf12 binden direkt an die TAD1 des Aktivators Ino2, lediglich Taf10 ist ebenso in der Lage, die TAD2 zu kontaktieren. Ein Aminosäureaustausch innerhalb der TAD1 (D20K F21R) führte laut Dietz *et al.* (2003) zur Aufhebung der aktivierenden Wirkung, welche mit dem von Hintze *et al.* (2017) beschriebenen Verlust der Kontakte zwischen Aktivator und den Taf-Proteinen begründet werden kann.

Taf1 besitzt verschiedene funktionelle Domänen, die auf die besondere Bedeutung der Untereinheit für den Transkriptionsfaktor hinweisen. Das HMG-Motiv („high mobility group“) ermöglicht vermutlich in Kombination mit Taf2 die Bindung des Initiators (Chalkley und Verrijzer, 1999). Die im N-Terminus befindlichen TAND-Motive 1-3 („Taf-N-terminal domains“; Kotani *et al.*, 1998) dienen der Interaktion mit TBP, wodurch dessen Bindung an die Promotor-DNA verhindert wird (Kokubo *et al.*, 1994). An die TAND-Motive schließt sich die Taf-Taf-Interaktionsdomäne an (Bai *et al.*, 1997), außerdem existiert eine Histonacetyltransferase-Domäne, die *in vitro* für die Acetylierung der Histone H3 und H4 zuständig ist (Mizzen *et al.*, 1996). Eine genauere Charakterisierung der Interaktion zwischen Taf1 und dem Aktivator Ino2 durch Hintze *et al.* (2017) führte zur Identifizierung der Aktivator-Bindedomänen ABD1 im AS-Bereich 1-100 und ABD2 im AS-Bereich 182-250. Die ABD1 liegt im Bereich der TANDs, die mit TFIIA um die Bindung an TBP konkurrieren, dessen Bindung an die TATA-Box verhindern und dadurch eine inhibierende Wirkung auf die Transkription haben (Ozer *et al.*, 1998; Mal *et al.*, 2004). Die Bindung von Aktivatoren, bspw. Ino2, an die TANDs kann die Auto-Inhibierung

innerhalb des TFIID-Komplexes aufheben und TBP für die Bindung an die TATA-Box freigeben (Kotani *et al.*, 2000; Hintze *et al.*, 2017).

Taf12 ist eine Untereinheit sowohl des TFIID- als auch des SAGA-Komplexes und ist für das Überleben der Zelle essenziell. Zusammen mit anderen Untereinheiten beider Proteinkomplexe bildet Taf12 eine Histon-Oktamer-ähnliche Struktur und trägt mit Hilfe seiner HFD („histone-fold domain“) zur Chromatinmodifizierung bei (Grant *et al.*, 1998). Taf12 wird von zahlreichen Aktivatoren kontaktiert und besitzt, ähnlich wie Taf1, mehrere ABDs. Hintze *et al.* (2017) identifizierten zwei nicht überlappende Bereiche im N-Terminus von Taf12 (ABD1, AS 1-100; ABD2, AS 101-178), die von Ino2 kontaktiert werden. Garbett *et al.* (2007) zeigten, dass die Bereiche AS 1-285 und AS 241-539 mit dem Aktivator Rap1 interagieren können, was die Existenz einer dritten ABD vermuten lässt. Dieser Befund spricht für ein zumindest teilweise individuelles Bindungsmuster von Aktivatoren und Coaktivatoren. Eine strukturelle Studie unter Verwendung von Kryo-EM zeigte, dass verschiedene Säugetieraktivatoren wie p53, Sp1 und c-Jun individuelle Regionen von TFIID kontaktieren, was die These der Zielspezifität der TADs stützt (Liu *et al.*, 2009).

Eine Sequenzanalyse der Taf1-ABD2 zwischen verschiedenen *Saccharomyces*-Hefen zeigte starke, vor allem basische und hydrophobe Aminosäuren betreffende, Konservierungen. Um die funktionelle Bedeutung ausgewählter Aminosäuren zu untersuchen, wurden diese mittels gerichteter Mutagenese durch Alanin ersetzt und für Interaktionsstudien mit Ino2 eingesetzt. Ein Austausch der Aminosäuren Lysin-206 und Tyrosin-207 sowie Leucin-208, Leucin-209 und Lysin-210 führte zum Verlust der Interaktion mit Ino2. Diese Ergebnisse decken sich mit den Befunden von S. Hintze (2014). Wurden jedoch nur die hydrophoben Aminosäuren L208 und L209 bzw. lediglich die basische Aminosäure K210 durch Alanin ersetzt, war eine Interaktion mit dem Aktivator Ino2 weiterhin möglich. Der Austausch der sauren Aminosäuren Asparaginsäure-215 und Glutaminsäure-217 hatte ebenfalls keinen Effekt auf die Interaktionsfähigkeit mit dem Aktivator. Die Sequenzanalyse der Taf12-ABDs zeigte vor allem im Bereich der ABD2 starke Konservierungen basischer Aminosäuren. Tatsächlich konnte auch hier eine Kombination aus basischen und hydrophoben Aminosäuren identifiziert werden (Lysin-150, Leucin-151, Arginin-175, Leucin-176), deren Austausch mit Alanin zum Interaktionsverlust führte. Die Besonderheit der identifizierten Interaktionsdomäne ist der Abstand der zur Interaktion beitragenden Aminosäuren. Die Veränderung der einzelnen direkt aufeinanderfolgenden Aminosäuren (K150A L151A und R175A L176A) führte nicht zu einem Interaktionsverlust. Erst die Kombination hatte einen Effekt auf die Interaktionsfähigkeit mit Ino2. Dies lässt eine Redundanz innerhalb der ABD2 vermuten und spricht für die Bedeutung der Taf12-Ino2-Interaktion.

Darüber hinaus stützen die Befunde die Hypothese, dass basische und hydrophobe Aminosäuren in Kombination eine tragende Rolle bei der TFIID-TAD-Interaktion spielen. Komarnitsky *et al.* (1998) beschrieben die Interaktion zwischen Taf1 und dem Glucose-regulierten Aktivator Adr1, wobei S. Hintze (2014) nachweisen konnte, dass die TAD1 von Ino2 und die TAD4 von Adr1 die gleichen Domänen in Taf1 kontaktieren. Im Zuge dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass ein Austausch der

oben beschriebenen Aminosäuren K206 und Y207, sowie L208, L209 und K210 innerhalb der ABD2 die Interaktion zwischen Taf1 und Adr1 beeinträchtigen, während der Austausch der Aminosäuren D215 E217 keinen Effekt auf die Interaktion hatte. Folglich spielen basisch-hydrophobe Aminosäurebereiche innerhalb einer ABD offenbar eine generelle Rolle bei der Interaktion zwischen Aktivatoren und basalen Transkriptionsfaktoren.

Moqtaderi *et al.* (1996) zeigten, dass für das Überleben der Zelle lediglich der C-Terminus von Taf12 notwendig ist. Zellen mit einer verkürzten Taf12-Variante, der der N-Terminus fehlt, sind weiterhin lebensfähig. Interessanterweise liegen die von Hintze *et al.* (2017) identifizierten ABDs im nicht essenziellen N-Terminus. Mit Hilfe des „Plasmid Shuffling“ konnte untersucht werden, ob das Fehlen der ABDs im AS-Bereich 1-278 einen Einfluss auf die Funktion des Taf12-Proteins hat. Auf die gleiche Weise wurde der Einfluss der Mutation K206A Y207A für die Funktion des vollständigen Taf1-Proteins untersucht. Die Zellen, welche lediglich die veränderten Taf-Varianten enthielten, zeigten Wachstum auf entsprechendem Selektionsmedium, sodass das Fehlen der ABDs in Taf12 sowie die Mutation K206A Y207A der Taf1-ABD2 keinen Einfluss auf deren Phänotyp zu haben scheinen. Auch Veränderungen der Inositol-Verfügbarkeit im Medium hatte keinen Effekt auf das Wachstum der Zellen, ebensowenig die Inkubation der Zellen bei unterschiedlichen Temperaturen (25°C/ 37°C), wobei durch die Bildung teildefekter Proteine ein konditionaler Phänotyp entstehen könnte. Allerdings konnte mit Hilfe vergleichender Reportergentests der Einfluss der Mutation K206A Y207A in Taf1 und der N-terminalen Verkürzung von Taf12 auf die Expression des *INO1*-Gens in der Zelle untersucht werden. Im Fall der Taf1 „missense“-Mutante K206A Y207A war ein Abfall der Expressionsleistung auf 44% im Vergleich zum Wildtyp-Niveau zu beobachten. Die Verkürzung von Taf12 hatte zur Folge, dass die Expression des *INO1*-Gens auf 76% gegenüber dem Wildtypniveau zurückging. Demnach haben die veränderten Taf-Varianten zwar einen quantitativen Effekt auf die Aktivierung des *INO1*-Gens, welcher aber nicht zu einem Wachstumsverlust führt. Möglicherweise kann aufgrund funktioneller Redundanz der Taf1-ABDs die fehlende Interaktion von Ino2 mit der Taf1-ABD2 als Folge der veränderten Aminosäuren durch die Interaktion mit der ABD1 von Taf1 ausgeglichen werden. Außerdem scheint die Interaktion zwischen Taf1 und Ino2 eine größere Bedeutung für die Phospholipidbiosynthese zu haben als die Taf12-Ino2-Interaktion. Es wäre daher interessant, die Interaktionen zwischen Ino2 und den Taf-Proteinen quantitativ zu untersuchen (Ermittlung von Dissoziationskonstanten mit biophysikalischen Methoden, z. B. der Microscale Thermophoresis), um eine Vorstellung über deren relative Bedeutung für die Genaktivierung zu bekommen.

4.2.2 Bdf1 - eine Komponente der Transkriptionsmaschinerie interagiert mit Ino2

Zwei funktionelle Domänen, die dem Hefe-Taf1 fehlen, jedoch in höheren Eukaryoten vorliegen, sind zwei Bromodomänen und eine Proteinkinasedomäne. Matangkasombut *et al.* (2000) beschrieben zwei Bromodomänenfaktoren Bdf1 und Bdf2, die aufgrund ihrer TFIIID-Bindedomäne zur Interaktion mit Taf1 und Taf7 fähig sind. Außerdem übernehmen sie die Aufgaben der Bromodomänen im Taf1 höherer Eukaryoten, indem sie Histonacetylierungen erkennen können (Jacobsen *et al.*, 2000) und den Chromatinremodellierungskomplex SWR1 rekrutieren. Bdf1 enthält außerdem die fehlende Proteinkinasedomäne.

In vitro-Bindestudien in dieser Arbeit zeigten, dass Bdf1, aber nicht Bdf2, zur Interaktion mit dem Aktivator Ino2 fähig ist. Interessanterweise bindet Bdf1 nicht wie Taf1 an die TAD1, sondern an die eigentlich schwächere Transkriptionsaktivierungsdomäne TAD2. Eine minimale Domäne für diese Bindung konnte im N-Terminus des Proteins im AS-Bereich 1-131 identifiziert werden. Sequenzanalysen des N-Terminus zeigten, dass ein Lysin-Rest an der Position 102 innerhalb der Sequenz Leucin-101, Lysin-102, Lysin-103 hochkonserviert ist, weshalb dieser Bereich für eine gerichtete Mutagenese ausgewählt wurde. Außerdem wurden Glutaminsäure und Asparagin an den Positionen 84 und 85 gegen Alanin ausgetauscht. Die Ergebnisse anschließender Bindestudien zeigten, dass keine der Sequenzveränderungen einen Effekt auf die Interaktion zwischen Bdf1 und der Ino2-TAD2 haben. Innerhalb der TAD2 liegen die Aminosäuren Phenylalanin, Leucin und Asparaginsäure an den Stellen 130-132, deren simultane Veränderung (Austausch gegen Alanin, FLD-AAA) kritisch für die Interaktionen mit dem Repressor Opi1 (Heyken *et al.*, 2005) sowie den Corepressoren Sin3 und Cyc8 ist. Möglicherweise sind diese Aminosäuren auch für die Bindung von Bdf1 als Faktor der Transkriptionsmaschinerie essenziell. Diese Frage könnte mit Hilfe weiterer Bindestudien geklärt werden. Darüber hinaus könnten ChIP-Studien zeigen, ob Ino2 oder Taf1 für die Anwesenheit von Bdf1 an ICRE-haltigen Promotoren verantwortlich sind. Außerdem ist die Frage zu klären, welchen Einfluss das Vorhandensein der Bromodomänen von Bdf1 am Promotor auf die Expression Ino2-abhängiger Gene hat. Schon Chua und Roeder (1995) beschrieben, dass Bdf1 essenziell für eine erfolgreiche Sporulation und den reibungslosen Ablauf der Meiose in Hefe ist und dass zumindest eine der beiden Bdf1-Bromodomänen in der Zelle vorliegen muss, da ansonsten die veränderte Chromatinstruktur zu einem Defekt bei der Meiose führt. García-Oliver *et al.* (2017) fanden heraus, dass Bdf1 unabhängig von Bdf2 und SWR1 für die Expression des Meiose-Regulators Ndt80, der die Gene für die mittlere Sporulation aktiviert, verantwortlich ist. Demnach könnte Bdf1 eine generelle Rolle bei der Genaktivierung spielen, wie es von einem Faktor der basalen Transkriptionsmaschinerie erwartet wird.

4.2.3 Die TFIIA-Untereinheiten Toa1 und Toa2 interagieren mit Ino2

Im zweiten Schritt der PIC-Assemblierung wird der basale Transkriptionsfaktor TFIIA an den Promotor rekrutiert und sorgt für die Stabilisierung des TBP-DNA-Komplexes (Imbalzano *et al.*, 1994; Kraemer *et al.*, 2001). Ihm werden Funktionen als Antirepressor und Coaktivator zugeschrieben, indem er mit Taf1 um die Bindung an TBP konkurriert und dessen Autoinhibierung entgegenwirken kann (Ozer *et al.*, 1998). Darüber hinaus sind zahlreiche Aktivorkontakte, z. B. mit Yap1 (Kraemer *et al.*, 2006), Rap1 (Papai *et al.*, 2010) und Ino2 (Hintze, 2014) bekannt.

Die beiden Untereinheiten Toa1 und Toa2, welche jeweils essenziell für das Überleben der Zelle sind (Ranish *et al.*, 1992), wurden mit Hilfe von *in vitro*-Bindestudien auf Interaktionen mit Ino2 untersucht. Die Befunde von S. Hintze (2014), dass Ino2 mit Toa1 interagiert, konnten bestätigt werden. Außerdem konnte eine Bindung zwischen Ino2 und Toa2 nachgewiesen werden, die allerdings wegen der deutlich schwächeren Interaktionssignale weniger effizient erfolgen dürfte als die zwischen Ino2 und Toa1. Hier konnte lediglich eine minimale Interaktionsdomäne im Toa2-AS-Bereich 56-122 kartiert werden. Laut Kraemer *et al.* (2001) dient Toa2 aufgrund seiner Fähigkeit, mit Taf11 zu

interagieren, als Brücke zwischen TFIIA und TFIID. Mutationsanalysen in Toa2, die einen Interaktionsverlust mit Taf11 hervorriefen, führten zu einem konditionalen Phänotyp und Defekten bei der Transkription. Weitere Bindestudien bzw. die Charakterisierung der Ino2-Toa2-Interaktion waren daher wenig vielversprechend.

Dagegen konnten zahlreiche Studien zur Toa1-Ino2-Interaktion durchgeführt werden. Zunächst wurden zwei nicht überlappende Bereiche AS 1-143 als ABD1 und AS 210-286 als ABD2 identifiziert. Während die ABD1 mit der TAD1 von Ino2 interagiert, kann die ABD2 beide Ino2-TADs kontaktieren. S. Hintze (2014) konnte zeigen, dass die Aminosäuren Asparaginsäure-20 und Phenylalanin-21 von Ino2, welche für die Interaktion mit diversen Taf-Proteinen essenziell sind (Hintze *et al.*, 2017), auch kritisch für die Interaktion mit Toa1 sind. Um zu überprüfen ob, ähnlich wie bei Taf1 und Taf12, basisch-hydrophobe Aminosäurebereiche für die Interaktion verantwortlich sind, wurden entsprechende Aminosäuren innerhalb der ABD1 und ABD2, die im Sequenzvergleich verschiedener *Saccharomyces*-Hefen eine Konservierung aufwiesen, gegen Alanin ausgetauscht. Allerdings konnten bei *in vitro*-Bindestudien keine Auswirkungen auf die Interaktion mit Ino2 festgestellt werden. Beim anschließend durchgeführten „Plasmid Shuffling“ konnten drei letale Toa1-Varianten identifiziert werden. Die Aminosäuren Leucin-38 und Lysin-39, Lysin-250 und Valin-251 sowie Arginin-253, Lysin-255, Arginin-257 und Lysin-259 (RKRK) haben demnach eine essenzielle Bedeutung für die Funktion von Toa1. Der Zusatz von Inositol zum Medium hatte keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen, was darauf hindeutet, dass es sich um einen generellen Funktionsausfall der genannten Toa1-Varianten handelt, der durch Supplementierung mit Phospholipidvorstufen nicht aufgehoben werden kann. Dafür sprechen auch die Befunde der quantitativen Charakterisierung der Zellen mit *TOA1*-Genvarianten ohne letalen Wachstumseinfluss, bei der sich keine Veränderungen der Expression des *INO1*-Gens zeigten. Geiger *et al.* (1996) identifizierten das RKRK-Motiv innerhalb der ABD2 als essenziellen Bestandteil der β -Faltblattstruktur, welches eine Bedeutung bei der Bildung des TFIIA-TBP-TATA-Komplexes hat. Xie *et al.* (2000) identifizierten eine mutierte Toa1-Variante, die eine reduzierte Konzentration des essenziellen Repressors NC2 supprimierte, der im Normalfall mit TFIIA um die Bindung an TBP konkurriert. Hierbei handelte es sich um eine Toa1-Punktmutation des Valin-251 zu Phenylalanin. Diese Toa1-Variante war nach wie vor in der Lage, *in vitro* direkt an TBP und DNA zu binden, allerdings konnte durch Gelretardierung gezeigt werden, dass der Aminosäureaustausch zu einer veränderten Struktur des Proteins führt, das nicht in der Lage ist, mit TBP einen Komplex zu bilden und nur mit reduzierter Affinität an die DNA binden kann. Diese Studie bestätigt die hier präsentierten Befunde, dass eine Toa1-Variante L250A V251A nach wie vor in der Lage ist, mit dem Aktivator Ino2 zu interagieren, aber beim „Plasmid Shuffling“ zu einer letalen Toa1-Variante führt. Ähnlich könnte der Austausch der Aminosäuren L38A K39A zu einer defekt gefalteten Toa1-Variante führen, die nicht mehr funktionell ist.

Schon Chou *et al.* (1999) beschrieben TFIIA als Faktor, der die interaktive Oberfläche am Promotor für Kontakte zu Aktivatoren oder anderen Proteinen vergrößert. Da beide TFIIA-Untereinheiten essenziell für das Überleben der Zelle sind, sind Analysen der TFIIA-Funktion nur möglich, wenn dessen Funktion konditional inaktiviert oder die TFIIA-Menge in der Zelle drastisch verringert ist. Selbstverständlich

haben solche Untersuchungen Auswirkungen auf das Wachstum der Zellen und können zu einem Zellzyklusarrest führen. Dennoch konnten von diesen Autoren aussagekräftige Untersuchungen durchgeführt werden, bei denen <1% der TFIIA-Wildtypmenge in der Zelle vorlagen. Überraschenderweise zeigte sich bei der Transkription einiger Gene lediglich eine 2- bis 3-fache Reduktion. Die Reaktionen auf einige Aktivatoren blieben sogar ohne Effekt. Diese Ergebnisse zeigen, dass TFIIA nicht generell für die transkriptionale Aktivierung benötigt wird, dennoch im Allgemeinen zum Transkriptionsniveau beiträgt und eine wichtige Rolle an einigen Promotoren spielt.

Denkbar ist, dass die Interaktion zwischen Ino2 und TFIIA eine verstärkende Wirkung auf die Transkriptionsinitiation der Phospholipidbiosynthesegene hat, indem die Interaktion zwischen TFIIA und TFIID stabilisiert wird. Dafür spricht die vergleichsweise starke Bindung von Taf1 an Ino2 als Hinweis auf die größere Bedeutung der Ino2-TFIID-Interaktion im Gegensatz zu den Ino2-TFIIA-Kontakten. Auch diese Vermutung könnte durch quantitative Interaktionsstudien verifiziert werden, bei denen die Ino2-TFIID- und die Ino2-TFIIA-Bindung miteinander verglichen werden können.

4.3 Die Aktivator-abhängige Rekrutierung des SWI/SNF-Chromatinremodellierungskomplexes

Der Chromatinremodellierungskomplex SWI/SNF verschiebt Nucleosomen entlang der DNA, um Promotoren zugänglich für die Transkriptionsmaschinerie zu machen. Der Komplex ist für die Aktivierung von 5% aller Hefegene erforderlich (Sudarsanam *et al.*, 2000). Die katalytische Untereinheit Swi2 ist für die ATP-Spaltung und die DNA-Translokation zuständig. Darüber hinaus interagiert Swi2 mit Hilfe einer Bromodomäne mit acetylierten Histonen (Clapier und Cairns, 2009); infolgedessen wird der Komplex an aktive Promotorbereiche rekrutiert. Die Acetylierung von Swi2 durch Gcn5 (Kim *et al.*, 2010) kann zu einer intramolekularen Bindung zwischen der Swi2-Bromodomäne und den acetylierten Lysinresten (K1493 und K1497) innerhalb von Swi2 führen, sodass die Dissoziation des Komplexes vom Promotor erleichtert wird, sobald eine Nucleosomen-freie Region entstanden ist. Die Acetylierung von Swi2 ist aber auch eine Möglichkeit, die Transkription negativ zu beeinflussen. Durch die Interaktion mit Aktivatoren kann die reduzierte Affinität des acetylierten Swi2 für acetylierte Nucleosomen abgemildert werden; tatsächlich können Aktivatoren den Chromatinremodellierungskomplex trotz der Acetylierung rekrutieren und am Promotor halten (Dutta *et al.*, 2014). M. Grigat (2016) ermittelte eine Vielzahl von Kontakten zwischen Swi2 und diversen Hefe-Aktivatoren. Da der SWI/SNF-Komplex in der Hefe nicht essenziell ist, ist die Anzahl der gefundenen Aktivatorkontakte erstaunlich, sprechen aber für eine gewisse Redundanz zwischen den verschiedenen Chromatinremodellierungskomplexen (z. B. RSC und INO80) bzw. die Möglichkeit des „Recycling“ der Komplexe (Esposito *et al.*, 2020).

Ford *et al.* (2008) beschrieben, dass für die Nucleosomenverschiebung und Aktivierung des *INO1*-Gens die Chromatinremodellierungskomplexe INO80 und SWI/SNF erforderlich sind. Mittels ChIP-Studien konnten INO80 und SWI/SNF am *INO1*-Promotor nachgewiesen werden, allerdings nicht in einer

Δino2-Mutante. Demnach findet hier eine Aktivator-abhängige Remodellierung statt. Daher überraschte es nicht, neben zahlreichen anderen Aktivatoren auch Ino2 als Interaktionspartner von Swi2 zu identifizieren (M. Grigat, 2016). Weiterhin konnten Ford *et al.* (2008) nachweisen, dass INO80 zuerst am *INO1*-Promotor vorliegt und erforderlich für die SWI/SNF-Rekrutierung ist.

Aufgrund von Syntheseabbrüchen gelang es M. Grigat (2016) nicht, das vollständige Swi2-Protein mit Epitopmarkierung zu exprimieren, sodass zunächst für *in vitro*-Bindestudien eine Swi2-Längenvariante eingesetzt wurde, die den Aminosäurebereich 1-450 umfasst. Die Bindung dreier Aktivatoren (Ino2, Gal4 und Aro80) an Swi2 wurde im Zuge dieser Arbeit weitergehend charakterisiert. Innerhalb der N-terminalen 450 Aminosäuren konnte eine ABD im AS-Bereich 238-307 identifiziert werden, die in der Lage ist, an die TADs der drei genannten Aktivatoren zu binden. Studien von Neely *et al.* (1999) und Yudkowski *et al.* (1999) zeigten, dass SWI/SNF hauptsächlich durch saure TADs rekrutiert wird. Tatsächlich besteht die TAD1 von Ino2 zu einem Viertel aus sauren Aminosäuren, sodass der Austausch basischer Aminosäuren gegen Alanin in Swi2 einen Interaktionsausfall mit Ino2 hervorrufen könnte. Nach Sequenzanalysen wurden Aminosäuren, die starke Konservierungen zwischen verschiedenen *Saccharomyces*-Hefen aufwiesen und dem basisch-hydrophoben Aminosäuremuster entsprachen, welches für eine Interaktion mit Ino2 nötig sein könnte, mittels gerichteter Mutagenese verändert. Jedoch hatte keine der gezielt in das *SWI2*-Gen eingeführten Veränderungen einen Einfluss auf die Interaktion mit der Ino2-TAD1.

Esposito *et al.* (2020) untersuchten die Bedeutung der Acetylierung der Chromatinremodellierungskomplexe an Promotoren anhand der *INO1*-Genaktivierung. Wie schon Ford *et al.* (2008) nachweisen konnten, sind INO80 und SWI/SNF für die Aktivierung des *INO1*-Gens erforderlich. Sie werden in nicht-acetylierter Form an den Promotor rekrutiert und können hier durch Nucleosomenverschiebungen den Promotor für die Transkriptionsmaschinerie zugänglich machen. Im Anschluss erfolgt die posttranslationale Modifizierung durch Gcn5 und Esa1, sodass die Chromatinremodellierer vom Promotor dissoziieren. Die Acetylierung beeinflusst weder die *INO1*-Aktivität, die Nucleosomendichte, das Histon-Acetylierungsmuster, die Rekrutierung der Remodellierer noch deren Aktivität. Diese Vorgänge am Promotor laufen auch mit einer nicht-acetylierbaren Swi2-Variante ab, allerdings akkumuliert diese am *INO1*-Promotor aufgrund der fehlenden Möglichkeit zur Dissoziation. Interessanterweise steigt die Sensitivität der Zelle gegenüber Kupfer, sobald unacetylierbares Swi2 am *INO1*-Promotor akkumuliert vorliegt. Die Aktivierung des *CUP1*-Promotors für Gene zur Metallothionein-Synthese ist ebenso abhängig von SWI/SNF und INO80, welche aufgrund der Akkumulation an anderen Promotoren aber nicht zur Verfügung stehen. Offensichtlich ist die Acetylierung der Chromatinremodellierungskomplexe notwendig, um deren Recycling zu ermöglichen. Tatsächlich liegt Swi2 mit nur 100-500 Kopien in der Zelle vor, während RSC mit 200-2000 Kopien etwas häufiger vorkommt. In Anbetracht der etwa 70.000 zu regulierenden Nucleosomen pro Zelle ist die Gewährleistung des Remodellierer-Recyclings für eine erfolgreiche Expressionsregulation notwendig.

4.4 Die Rolle der ATPasen Sug1 und Sug2 bei der Transkriptionsinitiation

Sug1 und Sug2, auch unter den Namen Rpt6 und Rpt4 bekannt, sind Untereinheiten des 26S Proteasoms, genauer der regulatorischen 19S-Untereinheiten, welche als Deckel fungieren, um den 20S Zylinder zu verschließen und Proteine in ihn hinein zu befördern. Die Funktion des 26S Proteasoms ist die Proteolyse polyubiquitinerter Proteine (Yoshimura *et al.*, 1993), allerdings wird ihm auch ein nicht-proteolytischer Einfluss auf die Regulation der Transkriptionsinitiation (Durairaj und Kaiser, 2014) sowie Beteiligung an der Nucleotidexcisionsreparatur (Gonzales *et al.*, 2002) zugeschrieben. Matsumoto *et al.* (1980) beschrieben Sug1 und Sug2 als rezessive Suppressormutationen in Zellen mit bestimmten *gal4* Mutantenallelen (verkürzte TAD, Gal4D), bei denen die Galaktoseverwertung wiederhergestellt war. Daher erhielten sie ihren Namen Sug1 und Sug2 („suppressor of Gal4 mutation“). Erst später wurden sie von Rubin *et al.* (1996) als ATPase-Untereinheiten des 26S Proteasoms identifiziert. Gonzales *et al.* (2002) konnten nachweisen, dass Sug1 und Sug2 sowie Rpt5, eine weitere 19S ATPase, Gal4-abhängig unter induzierten Bedingungen am *GAL1*-Promotor vorlag. Die schon 1992 von Swaffield *et al.* beschriebene Interaktion zwischen Gal4 und Sug1 sowie die von Gonzalez *et al.* (2002) beschriebene Gal4-Sug2-Interaktion konnten im Zuge dieser Arbeit bestätigt werden. Die Interaktion zwischen Sug1 bzw. Sug2 mit beiden Ino2-TADs lässt darauf schließen, dass die Proteasom-Untereinheiten einen generellen Einfluss auf die Transkriptionsregulation haben. Für Sug1 konnten zwei nicht-überlappende Bereiche identifiziert werden, die ABDs enthalten (ABD1: AS 1-140; ABD2: AS 201-405). Eine präzisere Eingrenzung war nicht möglich, weil es nicht gelang, weitere verkürzte Varianten des Proteins stabil mit Epitopmarkierung zu synthetisieren. Da eine Sug1-Variante, die die Aminosäuren 191-310 enthält, nicht in der Lage war, mit Ino2 zu interagieren, liegt die ABD2 vermutlich im AS-Bereich 311-405. Auch Sug2 verfügt möglicherweise über mehrere ABDs innerhalb des N-Terminus im AS-Bereich 1-327. Die intensive Interaktion zwischen dem N-Terminus von Sug2 und dem Aktivator spricht aber dafür, dass die ATPase-Domäne für die Bindung nicht vonnöten ist.

In zahlreichen Studien wurde bereits die nicht-proteolytische Funktion der 19S-Untereinheit des Proteasoms untersucht. Dabei wurde mit Hilfe von ChIP-Studien festgestellt, dass die 19S-Untereinheit, nicht aber die 20S-Untereinheit, an aktiven Promotoren zu finden ist. Hierbei handelt es sich um die *GAL*-Promotoren (Gonzalez *et al.*, 2002) sowie um Promotoren für Gene der Stressantwort bei Hitze und oxidativem Stress (Sulahian *et al.*, 2006). Außerdem wurde Sug1 aufgrund seiner Fähigkeit, an die Aktivierungsdomänen der Transkriptionsaktivatoren Gal4 und VP16 zu binden, schon früh als eine Art „Mediator“ beschrieben, der durch die Interaktion mit TBP, Aktivatoren und der Transkriptionsmaschinerie vermittelt (Swaffield *et al.*, 1995). Lee *et al.* (2005) beschrieben die positive Wirkung der 19S-ATPasen auf die Funktion des SAGA-Komplexes. Dieser Histon-Acetyltransferase-Komplex wird durch Interaktionen mit spezifischen Transkriptionsaktivatoren an Zielpromotoren rekrutiert und unterstützt die Assemblierung des PIC sowie die Transkriptionsinitiation. Mit Hilfe der proteasomalen ATPasen werden die Interaktionen zwischen Aktivatoren und SAGA stimuliert, während deren Inhibierung zu einer reduzierten Acetylierung des Histons H3 und zu verringerter Rekrutierung an Zielpromotoren führt. Darüber hinaus spielt Sug1 in Säugerzellen eine kritische Rolle bei der Transkription der MHC-Klasse-I- und II-Komplexe HLA-DM und HLA-DO. Die Assoziation von

Sug1 an MHC-Promotoren führt zur Rekrutierung des Transkriptionsfaktors CBP und des Aktivators CIITA. Eine Reduktion der Sug1-Expression hat eine reduzierte Transkription der Gene der MHC-Proteinkomplexe sowie eine reduzierte Rekrutierung von CBP und CIITA zu MHC-Promotoren zur Folge. Außerdem kommt es auch hier zu einer reduzierten Acetylierung des Histons H3 in entsprechenden Promotoren (Inostroza-Nieves *et al.*, 2012). Die Rolle der 19S-Untereinheiten für die transkriptionale Elongation wurde mehrfach beschrieben, auch wenn die Mechanismen noch weitgehend ungeklärt sind (Lassot *et al.*, 2007; Bhat *et al.*, 2008). Denkbar ist, dass die Fähigkeit der ATPasen des 26S-Proteasoms, Proteine zu degradieren bzw. zu entfalten, den Übergang vom Präinitiationskomplex zum Elongationskomplex unterstützt, ein Prozess, bei dem zahlreiche Änderungen der Protein-Protein- und Protein-DNA-Interaktionen erfolgen müssen (Saunders *et al.*, 2006). Darüber hinaus konnten Ferdous *et al.* (2001) eine Interaktion zwischen dem Elongationsfaktor Cdc68 und Sug1 nachweisen.

Ferdous *et al.* (2007) und Archer *et al.* (2008) beschrieben, dass die Effektivität von Transkriptionsaktivatoren durch Monoubiquitinierung stimuliert wird. Dafür wurde erneut die Gal4-Variante (Gal4D) untersucht, deren TAD verkürzt ist, weshalb es zu einer Reduktion der Aktivierungsleistung auf 3% im Vergleich zum Wildtyp kommt. Eine Mutation in *SUG1* und *SUG2* supprimierte diese Mutation (Swaffield *et al.*, 1992). Proteasomale ATPasen besitzen eine sogenannte „Stripping“-Aktivität, mit der Aktivatoren von der DNA entfernt werden können. Gal4D ist hypersensitiv gegen diese „Stripping“-Aktivität, da die Möglichkeit der Monoubiquitinierung fehlt. Folglich schützt diese Modifizierung die Aktivatoren vor der Destabilisierung durch proteasomale ATPasen. Archer *et al.* (2008) identifizierten zwei Subdomänen saurer TADs, von denen eine der Interaktion mit Coaktivatoren und Transkriptionsfaktoren dient, während die zweite eine mögliche Stelle für Monoubiquitinierung darstellt. Zwar liegen bislang keine experimentellen Hinweise auf eine derartige Modifikation von Ino2 vor, aber es ist denkbar, dass eine Monoubiquitinierung während der Transkriptionsinitiation am *INO1*-Promotor stattfindet, um die Ino2-DNA-Bindung vor den proteasomalen ATPasen zu schützen. Um weitere Erkenntnisse zu gewinnen, könnte mittels ChIP-Studien untersucht werden, ob Sug1 und Sug2 abhängig vom Aktivator Ino2 an ICRE-haltigen Promotoren vorliegen.

4.5 Resümee und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zahlreiche Kontakte zwischen dem Aktivator Ino2 und Faktoren der Transkriptionsmaschinerie identifiziert und untersucht. Nicht nur Coaktivatoren, sondern auch die Corepressoren Cyc8 und Sin3 werden vom Aktivator kontaktiert und liegen am aktiven *INO1*-Promotor vor, weshalb ihnen auch eine positive Wirkung während der Transkription zugeschrieben werden kann. Offenbar können nicht alle Proteine strikt in (Co-)Repressoren und (Co-)Aktivatoren unterteilt werden, es muss gegebenenfalls die zelluläre Umgebung und die physiologische Situation betrachtet werden, um die Wirkungsweise solcher Proteine zu verstehen.

Zahlreiche Untereinheiten der Transkriptionsfaktoren TFIID und TFIIA wurden in dieser und früheren Arbeiten (Hintze *et al.*, 2017) als Interaktionspartner der Ino2-TADs beschrieben. Außerdem bindet die Untereinheit Swi2 des Chromatinremodellierungskomplexes SWI/SNF an Ino2. Swi2 spielt neben

Gcn5 und dem HMG-Protein Nhp6 eine wichtige Rolle bei der Bildung eines Komplexes zwischen TBP, TFIIA und TFIIB an der DNA des Promotors (Biswas *et al.*, 2004). In Zellen, denen Swi2 fehlte, hatte eine TBP-„missense“-Mutation letale Folgen, konnte aber durch Überexpression von Toa1 und Toa2 supprimiert werden. Im Gegenzug führten Mutationen in TFIIA zum Verlust der Bindung an TBP, sobald auch Swi2 in der Zelle fehlte. Jedoch konnte eine Überexpression von TBP diesen Defekt aufheben. Allgemein bekannt ist, dass TBP nur sehr schwach an die TATA-Box innerhalb eines Nucleosoms bindet, dass aber die Anwesenheit von SWI/SNF diese Bindung stimuliert. Demzufolge ist eine rasche Rekrutierung aller benötigten Faktoren durch Kontakte mit dem Aktivator Ino2 an einen aktiven *INO1*-Promotor möglicherweise notwendig, um eine effiziente Transkriptionsaktivierung zu gewährleisten.

Pacheco *et al.* (2018) verglichen die TADs der Aktivatoren Met4 und Ino2 mit dem gut untersuchten Aktivator Gcn4. Alle haben sogenannte „Tandem“-TADs mit konservierten sauren und hydrophoben Aminosäuren. Für die Funktion von Met4 sind lediglich hydrophobe AS von Bedeutung, während Ino2 für eine volle Funktionalität saure und hydrophobe AS benötigt. Dieser Befund steht im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit, indem gezeigt wurde, dass der Austausch einzelner basischer und hydrophober Aminosäuren in Taf1 keinen Einfluss auf die Interaktion mit Ino2 hatte, während der Verlust dreier Aminosäuren in Folge mit beiden biochemischen Eigenschaften zum Interaktionsverlust führte. Weiterhin beschrieben Pacheco *et al.* (2018), dass alle TADs zur Ausbildung einer α -Helix neigen. Als weiteren Interaktionspartner konnten die Autoren die Mediatoruntereinheit Med15 identifizieren. Die Interaktion zwischen Gcn4 und Med15 wird als „fuzzy“ (verschwommen) beschrieben. Tatsächlich kann Gcn4 mit unterschiedlicher Orientierung an die Mediatoruntereinheit binden, ein Bindungsmechanismus, um zu gewährleisten, dass Aktivatoren multiple Zielproteine binden können. Dieser Mechanismus ist auch für die Bindung von Ino2 an seine zahlreichen bekannten Interaktionspartner denkbar.

Für zukünftige Studien wäre es wie bereits angedeutet interessant, alle identifizierten Kontakte zwischen Ino2 und der Transkriptionsmaschinerie (Taf1, Taf4, Taf6, Taf10, Taf12, Bdf1, Toa1, Toa2, Swi2, Sug1 und Sug2) paarweise auch quantitativ durch Ermittlung der Dissoziationskonstanten zu vergleichen, beispielsweise durch Nutzung der biophysikalischen Methode der Microcalen Thermophorese. Vermutlich sind diese Interaktionen untereinander funktionell redundant, was aber nicht bedeutet, dass alle mit gleicher Affinität erfolgen. Man könnte dadurch einen Hinweis auf die Bedeutung der einzelnen Interaktionen bekommen und eine mögliche Reihenfolge der Bindung der Transkriptionskomponenten am aktiven Promotor erkennen, sodass sich eine Aussage über die Ereignisse während der Transkriptionsaktivierung ableiten lässt.

5 Material und Methoden

5.1 Verwendete Organismen

5.1.1 *Escherichia coli*-Stämme

Bakterien der Art *Escherichia coli* wurden zur Vervielfältigung von Plasmiden sowie zur Überexpression von Proteinen eingesetzt. Die *in vitro* konstruierten Plasmide wurden in *E. coli* DH5 α transformiert und nach entsprechender Vermehrung isoliert.

Zur Überexpression von GST- und HA- Fusionsproteinen wurde der Stamm BL21 CodonPlus verwendet. Aufgrund der unterschiedlichen Codon-Präferenz von Eukaryoten und Prokaryoten besitzt dieser Stamm ein Plasmid mit zusätzlichen tRNA-Genen und ermöglicht so eine effizientere Expression von Hefeproteinen im heterologen Wirt.

Tabelle 5.1: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Herkunft/ Referenz
DH5 α	<i>supE44 hsdR17 (rk-mk+) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 ΔlacU169 (Φ80 ΔlacZ::M15)</i>	Hanahan, 1985
BL21-CodonPlus(DE3)-RP	<i>E.coli B F- ompT hsdS(rB-mB-) dcm* Tet- galλ(DE3) endA Hte [argU proL Camr]</i> zusätzliche tRNA- Gene: <i>argU</i> (AGA, AGG), <i>proL</i> (CCC)	Stratagene

5.1.2 Hefestämme

Entsprechend der verschiedenen experimentellen Zielstellungen wurden diverse Stämme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* benutzt, die vom Betreuer zur Verfügung gestellt oder selbst konstruiert wurden. Alle nachfolgenden Stämme sind haploid.

Bedeutung der Gensymbole:

MAT α und MAT α beziehen sich auf den Paarungstyp des jeweiligen Stammes.

ura3, *leu2*, *his3* und *trp1* verursachen entsprechende Aminosäure- bzw. Basen-auxotrophien. Ein deletierter Bereich in einem Gen wird mit dem Symbol Δ gekennzeichnet. Bereiche oder Selektionsmarker, die in Gene integriert wurden, werden durch ein vorangestelltes „::“ gekennzeichnet. *kanMX* vermittelt die Kreuzresistenz gegen die Antibiotika Geneticin (G418) (Wach *et al.*, 1994) und Kanamycin.

Tabelle 5.2: Verwendete Hefestämme, vom Betreuer zur Verfügung gestellt

Stamm	Genotyp	Herkunft/ Referenz
C13-ABY.S86	<i>MATα ura3 leu2 pra1 prb1 prc1 cps1</i>	Prof. Dr. D. Wolf (Stuttgart)
JS91.15-23	<i>MATα ura3 leu2 his3 trp1</i>	Schüller <i>et al.</i> , 1995
SIRP3. Δ ino2	<i>MATα leu2 his3 trp1 ura3::ICRE-CYC1- lacZ::URA3 Δino2::HIS3</i>	Schwank <i>et al.</i> , 1995
SIRP3. Δ ino2 Δ opi1	<i>MATα leu2 his3 trp1 ura3::ICRE-CYC1- lacZ::URA3 Δino2::HIS3 Δopi1::HIS3</i>	Wagner <i>et al.</i> , 2001

Tabelle 5.3: Verwendete Hefestämme, selbst konstruiert

Stamm	Genotyp	Ausgangsstamm
MSY5B	<i>MATα ura3 leu2 trp1 his3 taf1Δ::HIS3 [pGE3: ARS CEN URA3 TAF1]</i>	JS91.15-23
MSY5C	<i>MATα ura3 leu2 his3 trp1 taf1Δ::HIS3 [pSH191: ARS CEN LEU2 TAF1]</i>	JS91.15-23
MSY5D	<i>MATα ura3 leu2 his3 trp1 taf1Δ::HIS3 [pMS109: ARS CEN LEU2 TAF1K206A Y207A]</i>	JS91.15-23
MSY6B	<i>MATα ura3 leu2 trp1 his3 taf12Δ::HIS3 [pMS124: ARS CEN URA3 TAF12]</i>	JS91.15-23
MSY6C	<i>MATα ura3 leu2 his3 trp1 taf12Δ::HIS3 [pMS126: ARS CEN LEU2 TAF12]</i>	JS91.15-23
MSY6D	<i>MATα ura3 leu2 his3 trp1 taf12Δ::HIS3 [pMS127: ARS CEN LEU2 TAF12aa279-539]</i>	JS91.15-23
MSY7	<i>MATα ura3 leu2 trp1 his3 Δtoa1::LEU2 [ARS CEN URA TOA1]</i>	JS91.15-23
MSY8	<i>MATα ura3 leu2 trp1 his3 Δtoa1::loxP [ARS CEN URA TOA1] [2μm HIS3 GAL1-cre]</i>	JS91.15-23
MSY9	<i>MATα ura3 leu2 his3 pra1 prb1 prc1 cps1 TAF12- HA3::kanMX</i>	C13-ABY.S86
MSY10	<i>MATα ura3 leu2 his3 pra1 prb1 prc1 cps1 TAF12- HA3::kanMX Δino2::HIS3</i>	C13-ABY.S86

5.2 Nährmedien

Die Sterilisation der Medien erfolgte im Autoklaven für 20 min bei 120°C und 1 bar Überdruck. Festmedien enthielten 2% Agar.

5.2.1 Bakterielle Medien

LB-Medium: 1% Trypton
0,5% NaCl
0,7% Hefeextrakt pH = 7,5

Zur Selektion Ampicillin-resistenter Klone wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 mg/l zugesetzt. Die Selektion auf Chloramphenicol-Resistenz erfolgte durch Zugabe von Chloramphenicol bis zu einer Endkonzentration von 50 mg/l.

YT-G-Medium: 1,6% Trypton
0,5% NaCl
1,0% Hefeextrakt
2,0% Glukose pH = 7,0

5.2.2 Medien für Hefe

a) Vollmedium YEPD: 1,0% Hefeextrakt
2,0% Bactopepton
2,0% Glukose

b) Synthetisches Komplettmedium SCD:

0,17% Yeast Nitrogen Base (GIBCO)
0,5% Ammoniumsulfat
2,0% Glukose
AS-Mix (10 mg/l Ade, je 20 mg/l Arg, His, Lys, Met, Trp, Ura, je 30 mg/l Ile, Ser, Thr, Tyr, Val, 50 mg/l Phe, 120 mg/l Leu)

Die Mischung der Aminosäuren zuzüglich Uracil und Adenin (AS-Mix) wurde als 20-fache Stammlösung angesetzt und bei -20°C gelagert. Vor Gebrauch entsprechend verdünnt. Als Kohlenstoffquelle diente Glukose mit einer Endkonzentration von 2% (SCD, Standardmedium). Zur Selektion prototropher Transformanten wurde(n) die entsprechende(n) Aminosäure(n) weggelassen.

Zur Anzucht unter Inositol/Cholin reprimierenden Bedingungen wurde das jeweilige synthetische Komplettmedium nachträglich durch 200 µm Inositol und 2 mM Cholin ergänzt. Für die Anzucht unter dereprimierenden Bedingungen lagen die Endkonzentrationen bei 5 µm Inositol und 50 µm Cholin.

5.3 Klonierungsvektoren und Plasmide

Die in Tabellen 5.4 und 5.5 aufgelisteten Klonierungsvektoren und Plasmide wurden vom Betreuer zur Verfügung gestellt. Die Plasmide in Tabelle 5.6 wurden im Rahmen der Arbeit konstruiert.

5.3.1 Klonierungsvektoren

Tabelle 5.4: Verwendete Klonierungsvektoren

Plasmid	Genetischer Marker	Herkunft/Referenz
p414-MET25	<i>MET25_{PRO}-CYC1_{TER} ARS CEN TRP1</i>	Mumberg <i>et al.</i> , 1994
p415-MET25	<i>MET25_{PRO}-CYC1_{TER} ARS CEN LEU2</i>	Mumberg <i>et al.</i> , 1994
p426-MET25-HA3	2 μ m <i>URA2 MET25 Prom-HA3-CYC1Ter</i>	Mumberg <i>et al.</i> , 1994
pASK-IBA5	Col E1Ori <i>tetAProm- f1Ori AmpR TetRep</i>	IBA, Göttingen
pASK-IBA5-HA-XhoI	Col E1Ori <i>tetAProm-HA3- f1Ori AmpR TetRep</i>	IBA, Göttingen
pGAD-C1	2 μ m <i>LEU2 ADH1Prom-GAL4TAD-ADH1Ter</i>	James <i>et al.</i> , 1996
pGEX-SCS	<i>PtacProm-GST ampR pBR322Ori lacIQ</i>	Dietz, 2001
pRS416	<i>ARS CEN URA3</i>	Sikorski und Hieter, 1989
YCp111	<i>ARS CEN LEU2</i>	Gietz und Sugino, 1988

5.3.2. Erhaltene Plasmide

Tabelle 5.5: Zur Verfügung gestellte Plasmide

Plasmid	Genetische Marker	Herkunft/Referenz
pCW117	2 μ m <i>URA3 MET25 Prom-HA3-SIN3 CYC1Ter</i>	C. Wagner, 1998
pCW83	<i>MET25PRO-HA3-SIN31-300CYC1TER 2μm URA3</i>	C. Wagner, 1998
pES20	<i>GST-GAL4₇₆₈₋₈₈₁</i>	M. Grigat, 2017
pFK65	<i>GST-HAC1</i>	F. Kliewe, 2013
pFK77	<i>HA₃-CYC8₁₋₃₉₈</i>	F. Kliewe, 2013
pJS325	<i>INO1-lacZ URA3 2 μm</i>	Prof. Dr. H.-J. Schüller
pJS491	<i>LEU2</i>	Prof. Dr. H.-J. Schüller
pMP20	2 μ m <i>URA3 MET25 Prom-HA3-SIN31100-1536 CYC1Ter</i>	M. Pfeifer, 2009
pMD119	<i>GST-Ino2₁₋₁₀₀</i>	M. Dietz, 2001
pRAR62	<i>GST-PHO₄₁₋₁₀₄</i>	R. Aref, 2014
pRAR63	<i>GST-PHO4 105-208</i>	R. Aref, 2014
pRAR64	<i>GST-PHO4 209-312</i>	R. Aref, 2014
pRAR74	<i>GST-PHO4 156-208</i>	R. Aref, 2014
pRAR77	<i>GST-PHO4 105-156</i>	R. Aref, 2014
pRAR99	<i>GST-INO2₁₃₅₋₂₁₂</i>	R. Aref, 2014
pSG14	<i>ADH1_{PRO}-GAL4_{DBD}-INO2₁₋₃₅-ADH1_{TER} pGBD-C1TRP1 2 μm</i>	S. Geburtig, 2003

pSH117	<i>GST-INO2</i> ₁₋₃₅	S. Hintze, 2015
pSH118	<i>GST-INO2</i> ₁₀₁₋₁₃₅	S. Hintze, 2015
pSH122	<i>GST-INO2 1-35 D20K</i>	S. Hintze, 2015
pSH123	<i>GST-INO2 1-35 F21R</i>	S. Hintze, 2015
pSH128	<i>GST-TAF1 182-250</i>	S. Hintze, 2015
pSH148	<i>HA₃-INO2</i> ₁₋₁₃₅	S. Hintze, 2015
pSH157	<i>GST-TAF1 182-250 K206AY207A</i>	S. Hintze, 2015
pSH158	<i>GST-TAF1 182-250 L208AL209AK210A</i>	S. Hintze, 2015
pSH191	<i>MET25_{PRO}-TAF1-CYC1_{TER} ARS CEN TRP1</i>	S. Hintze, 2016
pSH192	<i>TAF1</i> ₆₋₇₈₆	S. Hintze, 2016
pSH199	<i>TAF1</i> _{6-786 L207A L208A K209A}	S. Hintze, 2016
pSH198	<i>TAF1</i> _{6-786 K205A Y206A}	S. Hintze, 2016
pSH200	<i>TAF1</i> _{6-786 D215A E217A}	S. Hintze, 2016
pSH62	<i>GAL1-cre HIS3</i>	Güldener <i>et al.</i> , 2002
pSS56	<i>GST-INO2</i>	S. Schwank, 1995
pSW11	<i>HA₃-SIN3</i>	S. Walz, 2008
pVK19	<i>GST-RAP1</i> ₆₃₀₋₇₂₇	S. Hintze, 2015
pWTH11	<i>GST-INO2</i> ₁₃₅₋₃₀₄	W. T. Heyken, 2004
pWTH114	<i>MET25-INO2</i> _{F130A L131A D132A} <i>ARSH4 CEN6 LEU2</i>	W.T. Heyken, 2004
pWTH12	<i>GST-INO2</i> ₁₋₁₃₅	W. T. Heyken, 2004
pWTH4	<i>GST-INO 2</i> ₁₁₉₋₂₁₂	W.T. Heyken, 2004
pWTH77	<i>INO2 ARSH4 CEN6 LEU2</i>	W.T. Heyken, 2004
pWTH79	<i>INO2</i> _{F130A L131A D132A}	W.T. Heyken, 2004
pYJ65	<i>MET25PRO-HA3-CYC81-398 CYC1TER 2μm URA3</i>	Y. Jäschke
pYJ89	2μm <i>URA3 MET25 Prom-HA3-SIN3801-1100 CYC1Ter</i>	Y. Jäschke, 2011
pYJ90	2μm <i>URA3 MET25 Prom-HA3-SIN3601-950 CYC1Ter</i>	Y. Jäschke, 2011
pYJ91	<i>MET25PRO-HA3-SIN3301-600 CYC1TER 2μm URA3</i>	Y. Jäschke, 2011

5.3.1 Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide

Tabelle 5.6: Konstruierte Plasmide

Plasmid	Genetische Marker	Herkunft des Inserts	Vektor
pMS35	<i>GST-Ino2</i> 119-195	PCR (BamHI/HindIII)	pGEX-SCS
pMS36	<i>GST-Ino2</i> 119-180	PCR (BamHI/HindIII)	pGEX-SCS
pMS37	<i>GST-Ino2</i> 119-165	PCR (BamHI/HindIII)	pGEX-SCS
pMS38	<i>GST-Ino2</i> 119-212 F130A L131A D132A	PCR pWTH4	pGEX-SCS
pMS39	<i>GST-Taf12</i> 124-178	PCR (BamHI/XhoI)	pGEX-SCS
pMS40	<i>GST-Taf12</i> 100-178 S129A N130A	PCR pMS16	pGEX-SCS
pMS41	<i>GST-Taf12</i> 100-178 V139A L140A	PCR pMS16	pGEX-SCS
pMS42	<i>GST-Taf12</i> 100-178 K150A L151A	PCR pMS16	pGEX-SCS
pMS43	<i>GST-Taf12</i> 100-178 L169A K170A	PCR pMS16	pGEX-SCS
pMS44	<i>GST-Taf12</i> 100-178 I173A D174A	PCR pMS16	pGEX-SCS
pMS45	<i>GST-Taf12</i> 100-178 R175A L176A	PCR pMS16	pGEX-SCS
pMS50	<i>HA₃-Ino4</i>	PCR (BamHI/EcoRI)	pASK-IBA5-HA
pMS51	<i>GST-Taf12</i> 100-178 K150A L151A R175A L176A	PCR pMS42	pGEX-SCS
pMS56	<i>HA₃-Sug1</i>	PCR (Sall/XhoI)	p426Met25-HA
pMS57	<i>HA₃-Sug2</i>	PCR (Sall/XhoI)	p426Met25-HA
pMS61	<i>HA₃-Toa1</i> 1-143	PCR (BamHI/HindIII)	p426Met25-HA
pMS62	<i>HA₃-Toa1</i> 144-286	PCR (BamHI/HindIII)	p426Met25-HA
pMS63	<i>HA₃-Toa1</i> 1-59	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5-HA
pMS64	<i>HA₃-Toa1</i> 1-54	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5-HA
pMS65	<i>HA₃-Toa1</i> 1-70	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5-HA
pMS66	<i>HA₃-Toa1</i> 71-143	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5-HA
pMS67	<i>HA₃-Toa1</i>	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5-HA
pMS68	<i>HA₃-Toa2</i>	PCR (BamHI/HindIII)	p426Met25-HA
pMS69	<i>HA₃-Toa1</i> 1-143	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5-HA
pMS70	<i>HA₃-Toa1</i> 144-286	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5-HA
pMS71	<i>HA₃-Toa1</i> 210-286	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5-HA
pMS72	<i>HA₃-Toa1</i> 215-286	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5-HA
pMS73	<i>HA₃-Toa1</i> 220-286	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5-HA
pMS74	<i>HA₃-Toa1</i> 226-286	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5-HA
pMS75	<i>HA₃-Toa1</i> 232-286	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5-HA
pMS76	<i>HA₃-Toa2</i>	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5-HA
pMS77	<i>HA₃-Sug1</i>	PCR (BamHI/XhoI)	p426Met25-HA
pMS78	<i>HA₃-Sug2</i>	PCR (ClaI/XhoI)	p426Met25-HA
pMS79	<i>GAL4_{TAD}⁻-Ino2</i> 119-212	PCR (BamHI/PstII)	pGAD-C1
pMS80	<i>GAL4_{TAD}⁻-Ino2</i> 101-212	PCR (BamHI/PstII)	pGAD-C1
pMS81	<i>GAL4_{TAD}⁻-Pho4</i> 105-208	PCR (BamHI/PstII)	pGAD-C1

pMS82	<i>HA₃-Sug1</i>	PCR (BamHI/XhoI)	pASK-IBA5-HA
pMS83	<i>HA₃-Sug2</i>	PCR (PstI/XhoI)	pASK-IBA5-HA
pMS84	<i>HA₃-Toa2</i> ₁₋₅₅	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5-HA
pMS85	<i>HA₃-Toa2</i> ₅₆₋₁₂₂	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5-HA
pMS86	<i>HA₃-Ino2</i> ₁₋₁₅₀	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5-HA
pMS87	<i>HA₃-Ino2</i> ₁₋₁₆₀	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5-HA
pMS88	<i>HA₃-Ino2</i> ₁₋₁₅₀	PCR (BamHI/HindIII)	p426Met25-HA
pMS89	<i>HA₃-Ino2</i> ₁₋₁₆₀	PCR (BamHI/HindIII)	p426Met25-HA
pMS90	<i>Strep-Ino2</i> ₁₋₁₅₀	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5
pMS91	<i>Strep-Ino2</i> ₁₋₁₆₀	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5
pMS92	<i>GST-Pho4</i> _{156-208 L170A F171A E172A}	PCR pRAR74	pGEX-SCS
pMS93	<i>GST-Hac1</i> _{121-217 L185A F186A D187A}	PCR pFK106	pGEX-SCS
pMS94	<i>HA₃-Sug1</i> ₁₋₂₀₀	PCR (BamHI/XhoI)	pASK-IBA5-HA
pMS95	<i>HA₃-Sug1</i> ₂₀₁₋₄₀₆	PCR (BamHI/XhoI)	pASK-IBA5-HA
pMS96	<i>HA₃-Sug2</i> ₁₋₂₃₄	PCR (PstI/XhoI)	pASK-IBA5-HA
pMS97	<i>HA₃-Sug2</i> ₂₃₅₋₄₃₇	PCR (PstI/XhoI)	pASK-IBA5-HA
pMS98	<i>HA₃-Toa2</i> ₁₋₅₅	PCR (BamHI/HindIII)	p426Met25-HA
pMS99	<i>HA₃-Toa2</i> ₁₋₆₅	PCR (BamHI/HindIII)	p426Met25-HA
pMS100	<i>Ino2</i>	PCR pWTH77	p414Met25
pMS101	<i>Ino2</i> _{F130A L131A D132A}	PCR pWTH114	p414Met25
pMS102	<i>HA₃-Toa2</i> ₁₋₈₀	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS103	<i>HA₃-Toa2</i> ₈₁₋₁₂₂	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS104	<i>GST-Swi2</i> _{161-300 R242A L243A}	PCR pIB4	pGEX-SCS
pMS105	<i>GST-Swi2</i> _{161-300 L256A K257A L263A K264A}	PCR pIB4	pGEX-SCS
pMS106	<i>GST-Swi2</i> _{161-300 K270A P271A}	PCR pIB4	pGEX-SCS
pMS107	<i>GST-Swi2</i> _{161-300 H286A P287A F290A K291A}	PCR pIB4	pGEX-SCS
pMS108	<i>GST-Swi2</i> _{161-300 R292A M293A}	PCR pIB4	pGEX-SCS
pMS109	<i>TAF1</i> _{K206A Y207A}	Lig pSH198 und pSH191ΔBgIII	P415-Met25
pMS110	<i>GST-Taf1</i> _{182-250 L208A L209A}	PCR pSH128	pGEX-SCS
pMS111	<i>GST-Taf1</i> _{182-250 K210A}	PCR pSH128	pGEX-SCS
pMS112	<i>Toa1</i> _{-328/-6}	PCR (SacI/BamHI)	pJS491
pMS113	<i>Toa1</i> _{+861/+1204}	PCR (BglII/SalI)	pMS112
pMS114	<i>Toa1</i> _{-300/+300}	PCR (SacI/SalI)	pRS416
pMS115	<i>Toa1</i> _{-300/+300}	PCR (SacI/SalI)	YCp111
pMS116	<i>GST-Toa1</i> ₂₂₀₋₂₈₆	PCR (BamHI/HindIII)	pGEX-SCS
pMS117	<i>HA₃-Sug1</i> ₁₋₃₁₀	PCR (BamHI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS118	<i>HA₃-Sug1</i> ₁₁₇₋₄₀₆	PCR (BamHI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS119	<i>HA₃-Sug2</i> ₁₋₃₂₇	PCR (PstI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS120	<i>HA₃-Sug2</i> ₁₂₃₋₄₃₇	PCR (PstI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI

pMS121	<i>HA₃-Adr1</i> 642-705	PCR (BamHI/XhoI)	p426Met25-HA
pMS122	<i>HA₃-Adr1</i> 642-705	PCR (BamHI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS123	<i>Taf12 Promotor</i> -585/-16	PCR(XbaI/BamHI)	pRS416
pMS124	<i>Taf12</i> -11/1769	PCR (BamHI/KpnI)	pMS123
pMS125	<i>Taf12 Promotor</i> -585/-16	PCR(XbaI/BamHI)	YCp111
pMS126	<i>Taf12</i> -11/+1769	PCR(BamHI/KpnI)	pMS125
pMS127	<i>Taf12</i> Δ 1-278	PCR (BamHI/KpnI)	pMS125
pMS128	<i>Taf12</i> -360/+80	PCR (EcoRI/SacI)	pUC19-HIS3
pMS129	<i>Taf12</i> +1456/+1870	PCR (SalI/XbaI)	pMS128
pMS130	<i>HA₃-Sug1</i> 117-310	PCR (BamHI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS131	<i>HA₃-Sug1</i> 1-116	PCR (BamHI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS132	<i>HA₃-Sug1</i> 117-200	PCR (BamHI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS133	<i>HA₃-Sug1</i> 201-310	PCR (BamHI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS134	<i>HA₃-Sug1</i> 311-406	PCR (BamHI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS135	<i>HA₃-Taf1</i> 182-250 K206A Y207A	PCR pLvD22	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS136	<i>HA₃-Taf1</i> 182-250 L208A L209A K210A	PCR pLvD22	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS137	<i>HA₃-Taf1</i> 182-250 D215A E217A	PCR pLvD22	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS138	<i>HA₃-Sug2</i> 1-122	PCR (PstI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS139	<i>HA₃-Sug1</i> 1-116	PCR (BamHI/XhoI)	p426Met25-HA
pMS140	<i>HA₃-Sug1</i> 117-200	PCR (BamHI/XhoI)	p426Met25-HA
pMS141	<i>HA₃-Sug1</i> 201-310	PCR (BamHI/XhoI)	p426Met25-HA
pMS142	<i>HA₃-Sug1</i> 311-406	PCR (BamHI/XhoI)	p426Met25-HA
pMS143	<i>GST-Sug1</i> 1-116	PCR (BamHI/XhoI)	pGEX-SCS
pMS144	<i>GST-Sug1</i> 117-200	PCR (BamHI/XhoI)	pGEX-SCS
pMS145	<i>GST-Sug1</i> 201-310	PCR (BamHI/XhoI)	pGEX-SCS
pMS146	<i>GST-Sug1</i> 311-406	PCR (BamHI/XhoI)	pGEX-SCS
pMS147	<i>Toa1</i> K250A V251A	PCR pMS115	YCp111
pMS148	<i>Toa1</i> R253A K255A R257A K259A	PCR pMS148a	YCp111
pMS148a	<i>Toa1</i> R257A K259A	PCR pMS115	YCp111
pMS149	<i>Toa1</i> L263A K264A	PCR pMS115	YCp111
pMS150	<i>Toa1</i> I269A R271A	PCR pMS115	YCp111
pMS151	<i>Toa1</i> F276A K278A	PCR pMS115	YCp111
pMS152	<i>HA₃-Sug1</i> 117-190	PCR (BamHI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS153	<i>HA₃-Sug1</i> 191-310	PCR (BamHI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS154	<i>HA₃-Sug1</i> 117-250	PCR (BamHI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS155	<i>HA₃-Sug1</i> 146-310	PCR (BamHI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS156	<i>HA₃-Sug1</i> 1-180	PCR (BamHI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS157	<i>HA₃-Sug1</i> 1-160	PCR (BamHI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS158	<i>HA₃-Sug1</i> 1-140	PCR (BamHI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS159	<i>HA₃-Taf1</i> 1-250-HIS6	PCR (PstI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI

pMS160	<i>HA₃-Taf12-HIS6</i>	PCR (BamHI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS161	<i>HA₃-Bdf1</i>	PCR (PstI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS162	<i>HA₃-Toa1</i> 220-286 K250A V251A	PCR pMS73	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS163	<i>HA₃-Toa1</i> 220-286 R253A K255A R257A K259A	PCR pMS73	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS164	<i>HA₃-Toa1</i> 220-286 L263A K264A	PCR pMS73	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS165	<i>HA₃-Toa1</i> 220-286 I269A R271A	PCR pMS73	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS166	<i>HA₃-Toa1</i> 220-286 F276A K278A	PCR pMS73	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS167	<i>HA₃-Sug1</i> 321-406	PCR (BamHI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS168	<i>Ino2</i>	PCR (NheI/HindIII)	pTP1
pMS169	<i>Ino4</i>	PCR (NheI/SalI)	pTP1
pMS170	<i>HA₃-Swi2</i> 161-237	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS171	<i>HA₃-Swi2</i> 238-307 R242A L243A	PCR pIB12	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS172	<i>HA₃-Swi2</i> 238-307 L256A K257A L263A K264A	PCR pIB12	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS173	<i>HA₃-Swi2</i> 238-307 K270A P271A	PCR pIB12	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS174	<i>HA₃-Swi2</i> 238-307 H286A P287A F290A H291A	PCR pIB12	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS175	<i>HA₃-Swi2</i> 238-307 R292A M293A	PCR pIB12	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS176	<i>HA₃-Bdf1</i> 1-272	PCR (PstI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS177	<i>HA₃-Bdf1</i> 273-436	PCR (PstI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS178	<i>HA₃-Bdf1</i> 437-686	PCR (PstI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS179	<i>HA₃-Toa1</i> 220-286 D273A Y274A	PCR pMS73	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS180	<i>HA₃-Toa1</i> 1-143 Y10A E11A	PCR pMS69	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS181	<i>HA₃-Toa1</i> 1-143 V21A R22A	PCR pMS69	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS182	<i>HA₃-Toa1</i> 1-143 E26A N27A	PCR pMS69	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS183	<i>HA₃-Toa1</i> 1-143 L38A K39A	PCR pMS69	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS184	<i>HA₃-Toa1</i> 1-143 K44A L45A	PCR pMS69	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS185	<i>HA₃-Toa1</i> 1-143 K50A V51A	PCR pMS69	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS186	<i>HA₃-Toa1</i> 220-286 Y274A T255A	PCR pMS73	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS187	<i>HA₃-Toa1</i> 220-286 V266A T267A	PCR pMS73	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS188	<i>HA₃-Sug2</i> 123-327	PCR (PstI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS189	<i>HA₃-Bdf1</i> 1-131	PCR (PstI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS190	<i>HA₃-Bdf1</i> 132-272	PCR (PstI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS191	<i>HA₃-Bdf1</i> 273-349	PCR (PstI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS192	<i>HA₃-Bdf1</i> 350-436	PCR (PstI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS193	<i>HA₃-Bdf1</i> 437-512	PCR (PstI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS194	<i>HA₃-Bdf1</i> 513-600	PCR (PstI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS195	<i>HA₃-Bdf1</i> 601-686	PCR (PstI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS196	<i>Toa1</i> -300/+300	EcoRI/PstI aus pMS115	pUC19
pMS197	<i>HA₃-Toa1</i> 1-143 Y10A E11A	PCR pMS196	pUC19
pMS198	<i>HA₃-Toa1</i> 1-143 V21A R22A	PCR pMS196	pUC19

pMS199	<i>HA₃-Toa1</i> 1-143 E26A N27A	PCR pMS196	pUC19
pMS200	<i>HA₃-Toa1</i> 1-143 L38A K39A	PCR pMS196	pUC19
pMS201	<i>HA₃-Toa1</i> 1-143 K44A L45A	PCR pMS196	pUC19
pMS202	<i>HA₃-Toa1</i> 1-143 K50A V51A	PCR pMS196	pUC19
pMS203	<i>HA₃-Toa1</i> 1-143 Y10A E11A	EcoRI/PstI aus pMS197	YCp111
pMS204	<i>HA₃-Toa1</i> 1-143 V21A R22A	EcoRI/PstI aus pMS198	YCp111
pMS205	<i>HA₃-Toa1</i> 1-143 E26A N27A	EcoRI/PstI aus pMS199	YCp111
pMS206	<i>HA₃-Toa1</i> 1-143 L38A K39A	EcoRI/PstI aus pMS200	YCp111
pMS207	<i>HA₃-Toa1</i> 1-143 K44A L45A	EcoRI/PstI aus pMS201	YCp111
pMS208	<i>HA₃-Toa1</i> 1-143 K50A V51A	EcoRI/PstI aus pMS202	YCp111
pMS209	<i>HA₃-Toa1</i> 210-286 K250A V251A	PCR pMS71	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS210	<i>HA₃-Toa1</i> 210-286 R253A K255A R257A K259A	PCR pMS71	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS211	<i>HA₃-Toa1</i> 210-286 L263A K264A	PCR pMS71	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS212	<i>HA₃-Toa1</i> 210-286 I269A R271A	PCR pMS71	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS213	<i>HA₃-Toa1</i> 210-286 F276A K278A	PCR pMS71	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS214	<i>HA₃-Toa1</i> 210-286 D273A Y274A	PCR pMS71	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS215	<i>HA₃-Toa1</i> 210-286 Y274A T255A	PCR pMS71	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS216	<i>HA₃-Toa1</i> 210-286 V266A T267A	PCR pMS71	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS222	<i>HA₃-Bdf1</i> 1-131 L101A K102A K103A	PCR pMS189	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS223	<i>HA₃-Bdf1</i> 1-131 E84A N85A	PCR pMS189	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS224	<i>HIS6-Taf1</i> 180-250	PCR (XbaI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS225	<i>HIS6-Taf4</i>	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS226	<i>HIS6-Taf6</i>	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS227	<i>HIS6-Taf10</i>	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS228	<i>Bdf2</i>	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS229	<i>Bdf2</i> 1-112	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS230	<i>HIS6-Ino2</i>	PCR (XbaI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS231	<i>HIS6-HA-Ino4</i>	PCR (PstI/XhoI)	pASK-IBA5HA-XhoI
pMS232	<i>HIS6-Ino2</i> 1-35	PCR (BamHI/HindIII)	pGEX-SCS
pGE1	<i>Taf1</i> -275-55	PCR (EcoRI/ SacI)	pUC19-HIS3
pGE2	<i>Taf1</i> 2045-2425	PCR (SalI/XbaI)	pGE1
pGE3	<i>Taf1</i> -200-3398	PCR (SacI/XhoI)	pRS416
pGE4	<i>Taf1</i> -200-3398	PCR (SacI/XhoI)	YCp111
pIB1	<i>HA₃-Swi2</i> 1-160	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5HA-XhoI

pIB2	<i>HA₃-Swi2</i> 1-300	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5HA-Xhol
pIB3	<i>HA₃-Swi2</i> 161-450	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5HA-Xhol
pIB4	<i>HA₃-Swi2</i> 161-300	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5HA-Xhol
pIB5	<i>HA₃-Swi2</i> 301-450	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5HA-Xhol
pIB6	<i>HA₃-Swi2</i> 1-53	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5HA-Xhol
pIB7	<i>HA₃-Swi2</i> 1-100	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5HA-Xhol
pIB8	<i>HA₃-Swi2</i> 101-450	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5HA-Xhol
pIB9	<i>HA₃-Swi2</i> 206-307	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5HA-Xhol
pIB10	<i>HA₃-Swi2</i> 230-307	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5HA-Xhol
pIB11	<i>HA₃-Swi2</i> 234-307	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5HA-Xhol
pIB12	<i>HA₃-Swi2</i> 238-307	PCR (BamHI/HindIII)	pASK-IBA5HA-Xhol

5.4 Oligonucleotide

Die nachfolgend aufgelisteten Oligonukleotide wurden zur Ampifikation definierter DNA-Sequenzen verwendet. Die Synthese erfolgte durch die Firma Lifetechnologies/Invitrogen. Fett gedruckte Buchstaben kennzeichnen Restriktionsschnittstellen, randständige Hilfssequenzen sind kleingeschrieben, Großbuchstaben entsprechen authentischen Sequenzen, die mit der Matrize paaren können, ausgetauschte Basen zur Mutagenese sind unterstrichen. Die Positionsangaben beziehen sich auf das Startcodon des jeweiligen Gens.

Tabelle 5.7: Verwendete Oligonucleotide

Name	Gen	Position	Sequenz 5'→3'
Bdf1 1-131 EN-AA 3R	<i>BDF1</i>	+283/+237	CTGCGCCACTTCCGGTGGCGTTATACCCAGCTGCC CCGTTAGCCGCC
Bdf1 1-131 EN-AA 5F	<i>BDF1</i>	+237/+283	GGCGGCTAACGGGGCAGCTGGGTATAACGCCAC CGGAAGTGGCGCAG
Bdf1 1-131 LKK-AAA 3R	<i>BDF1</i>	+325/+277	CTTGTCTCCTTCTTCGCGCCGCCCCCTGCTGTT CGTCTTCTGCGCC
Bdf1 1-131 LKK-AAA 5F	<i>BDF1</i>	+277/+325	GGCGCAGAAGACGAACAGCAGGGGGCGGGCGGC GGAAGAAGGAGGACAAG
Bdf1 aa 131 XhoI 3R	<i>BDF1</i>	+363/+346	gatcCTCGAGTGATTGTTTTGAGTTTTTCATC
Bdf1 aa 132 PstI 5F	<i>BDF1</i>	+364/+383	gatc CTGCAG GAACTCCGATGGAGGTTCC
Bdf1 aa 272 XhoI 3R	<i>BDF1</i>	+816/+801	gatc CTCGAG TGATTGGGCACTAGACCGC
Bdf1 aa 273 PstI 5F	<i>BDF1</i>	+817/+839	gatc CTGCAG GAGGATGCCCAATTGTAATTAG
Bdf1 aa 436 XhoI 3R	<i>BDF1</i>	+1308/+1291	gatc CTCGAG TGATTGGGTCCTCGAATCTTC
Bdf1 aa 437 PstI 5F	<i>BDF1</i>	+1309/+1327	gatc CTGCAG GGCGACTACGACGATTATG
Bdf1 aa 601 PstI 5F	<i>BDF1</i>	+1808/+1820	gatcCTGCAGTTGGACGGTACTTCAGGTGT

Bdf1 aa349 XhoI 3R	<i>BDF1</i>	+1047/+1030	gatcCTCGAGTGACATAGAAACTGGGTCTAC
Bdf1 aa350 PstI 5F	<i>BDF1</i>	+1047/+1067	gatcCTGCAGAATTTGCCGACTTATTTCTGA
Bdf1 aa512 XhoI 3R	<i>BDF1</i>	+1538/+1519	gatc CTCGAGT GGAAGCGTTCTTAGACCCACT
Bdf1 aa513 PstI 5F	<i>BDF1</i>	+1537/+1556	gatc CTGCAGT CCTTCGAAAGGAAGGCGAGA
Bdf1 aa600 XhoI 3R	<i>BDF1</i>	+1801/+1783	gatc CTCGAGT GGAACCGTTAGAAGCACCCGA
Bdf1 PstI 5F	<i>BDF1</i>	+1/+19	gatc CTGCAGT GACCGATATCACACCCG
Bdf1 XhoI 3R	<i>BDF1</i>	+2061/+2040	gatc CTCGAGT GATCACTCTTCTTCACTTTTCGCTG
Bdf2 aa112 HindIII 3R	<i>BDF2</i>	+336/+319	gatc AAGCTTT CACTCGGGAAAACCTTTCCGG
Bdf2 BamHI 5F	<i>BDF2</i>	+1/+20	gatc GGATCC ATGTCTCGTACTAACATGGA
Bdf2 HindIII 3R	<i>BDF2</i>	+1917/+1898	gatc AAGCTTT TAATCACTGTCACTGTCCG
Hac1 aa121-217 Mut 185-187 LFD-AAA 3R	<i>HAC1</i>	+587/+535	GGGTCTGCCAACGGCGAGGCCACCC <u>GAGCAGCC</u> GCATTGTTGTTGTCTACGGC
Hac1 aa121-217 Mut 185-187 LFD-AAA 5F	<i>HAC1</i>	+535/+587	GCCGTAGACAACAACAATGCG <u>GCTGCTG</u> CGGTGG CCTCGCCGTTGGCAGACCC
HIS3-P	<i>HIS3</i>	+652/+671	GTTCTTATGTAGTGACACCCG
Ino2 3R 212 PstI	<i>INO2</i>	+637/+617	gatc CTGCAGT TACGGTGGCGGGTGTAGTGGT
Ino2 aa 150 HindIII 3R	<i>INO2</i>	+450/+431	gatc AAGCTTT CATGATTCCGAGTTCATGGAAG
Ino2 aa1 NheI 5F	<i>INO2</i>	+1/+21	gatc GCTAGC ATGCAACAAGCAACTGGGAAC
Ino2 aa135 HindIII 3R	<i>INO2</i>	+915/+897	gatc AAGCTTT GATCAGGAATCATCCAGTATG
Ino2 aa160 HindIII 3R	<i>INO2</i>	+480/+464	gatc AAGCTTT CACTGCTTTTTTGGTGATC
Ino2 PstI 5F	<i>INO2</i>	+1/+18	gatc CTGCAGC GATGCAACAAGCAACTGGG
Ino2 Sall 5F	<i>INO2</i>	+1/+18	gatc GTCGAC GATGCAACAAGCAACTGGG
Ino2 Smal 3R	<i>INO2</i>	+913/+894	gatc CCCGGG AGGAATCATCCAGTATGTGC
Ino2 XhoI 3R	<i>INO2</i>	+913/+894	gatc CTCGAGT CAGGAATCATCCAG
Ino4 aa1 NheI 5F	<i>INO4</i>	+1/+21	gatc GCTAGC ATGACGAACGATATTAAGGAG
Ino4 aa152 Sall 3R	<i>INO4</i>	+456/+436	gatc GTCGACT CACTGACCACTCTGTCCATC
Ino4 EcoRI 3R	<i>INO4</i>	+455/+436	gatc GAATTC CACTGACCACTCTGTCCATC
Ino4 EcoRI 5F	<i>INO4</i>	+1/+21	gatc GAATTC ATGACGAACGATATTAAGGAG
Ino4 PstI 5F	<i>INO4</i>	+1/+19	gatc CTGCAGC ATGACGAACGATATTAAGG
Ino4 Sall 3R	<i>INO4</i>	+455/+436	gatc GTCGACC GTCACTGACCACTCTGTCCATC
kanK2	<i>kanMX</i>	+52/+70	GGGCGACAGTCACATCATGC
LEU-ORF	<i>LEU2</i>	+1024/+1043	TAGGTGGTCCAACAGTACC
Pho4 3R 208 PstI	<i>PHO4</i>	+627/+605	gact CTGCAGT CAGGCCGTGACCGGTGATACGC
Pho4 aa 154-208 LFE- AAA 3R	<i>PHO4</i>	+543/+490	CGGAGTTGGGATAACGCTGTGGGCAAT <u>GCGGC</u> <u>CGCCGA</u> AGTGCCGAATCCGG
Pho4 aa 154-208 LFE- AAA 5F	<i>PHO4</i>	+490/+543	CCGGATTCCGGCACTTCGG <u>GCGCCGC</u> ATTGCCCG ACAGCGTTATCCCAACTCCG
Sug1 aa 321 BamHI 5F	<i>SUG1</i>	+961/+980	gatc GGATCC GTCGAGCTAGAGCTGAAAT
Sug1 aa116 XhoI 3R	<i>SUG1</i>	+348/+331	gatc CTCGAGT CACCTTAGACAAACTCTTTG
Sug1 aa117 BamHI 5F	<i>SUG1</i>	+349/+367	gatc GGATCC AGTGACTCTTATATGTTGC

Sug1 aa140 XhoI 3R	<i>SUG1</i>	+420/+401	gatc CTCGAGT CATTCCACCATCATCAACGAAA
Sug1 aa146 BamHI 5F	<i>SUG1</i>	+433/+452	gatc GGATCCT CCACATACGATATGGTTGG
Sug1 aa160 XhoI 3R	<i>SUG1</i>	+480/+460	gatc CTCGAGT CAAATCTCCTTTATTTGCTTTGTC
Sug1 aa180 XhoI 3R	<i>SUG1</i>	+540/+521	gatc CTCGAGT CACGCAATACCCAAACTTTCAA
Sug1 aa190 XhoI 3R	<i>SUG1</i>	+570/+553	gatc CTCGAGT CAGGGGCCATATAAGATGAC
Sug1 aa191 BamHI 5F	<i>SUG1</i>	+571/+594	gatc GGATCCC CTGGTACAGGGAAAACCTTATTG
Sug1 aa200 XhoI 3R	<i>SUG1</i>	+600/+582	gatc CTCGAGT CATCTTGCCAATAAGGTTTTTC
Sug1 aa201 BamHI 5F	<i>SUG1</i>	+601/+623	gatc GGATCCG CTGTGCGACATCACACTGATTG
Sug1 aa250 XhoI 3R	<i>SUG1</i>	+750/+735	gatc CTCGAGT CAGATTTTCATCCATAAAG
Sug1 aa310 XhoI 3R	<i>SUG1</i>	+930/+910	gatc CTCGAGT CATATTCTACCGGGTCTCAAAG
Sug1 aa311 BamHI 5F	<i>SUG1</i>	+931/+950	gatc GGATCCG ATAGGAAGATTGAATTTCC
Sug1 BamHI 5F	<i>SUG1</i>	+1/+20	gatc GGATCC ATGACAGCTGCTGTAACATC
Sug1 Sall 5F	<i>SUG1</i>	+1/+20	gatc GTCGAC ATGACAGCTGCTGTAACATC
Sug1 XhoI 3R	<i>SUG1</i>	+1218/+1198	gatc CTCGAGT CACTTGAACAGCTTGGCGAC
Sug2 aa122 XhoI 3R	<i>SUG2</i>	+366/+345	gatc CTCGAGT CAAGAGGCCTTCACTATATATTTTC
Sug2 aa123 PstI 5F	<i>SUG2</i>	+367/+387	gatc CTGCAGT CGGGCCACGTTATATTGTC
Sug2 aa234 XhoI 3R	<i>SUG2</i>	+702/+686	gatc CTCGAGT CATGCCTTCGCTAGTAAAG
Sug2 aa235 PstI 5F	<i>SUG2</i>	+703/+722	gatc CTGCAGG TTGCTGCTACGATTGGAGC
Sug2 aa327 XhoI 3R	<i>SUG2</i>	+981/+962	gatc CTCGAGT CACGTAGCCATGATGATTTTAG
Sug2 ClaI 5F	<i>SUG2</i>	+1/+20	gatc ATCGAT ATGAGTGAAGAACAGGACCC
Sug2 PstI 5F	<i>SUG2</i>	+1/+20	gatc CTGCAG ATGAGTGAAGAACAGGACCC
Sug2 Sall 5F	<i>SUG2</i>	+1/+20	gatc GTCGAC ATGAGTGAAGAACAGGACCC
Sug2 XhoI 3R	<i>SUG2</i>	+1314/+1292	gatc CTCGAGT CATAATTTTTGGTATTCTATAG
Swi2 aa301 BamHI 5F	<i>SWI2</i>	+901/+920	gatc GGATCCG CGAGAAGAAGACAACCCAC
Swi2 aa 161-300 R242A L243A 5F	<i>SWI2</i>	+711/+750	GCAACAGGGGAGAG <u>CAGC</u> ACCCATGACAATGTTT ACTGCCG
Swi2 aa100 HindIII 3R	<i>SWI2</i>	+300/+282	gatc AAGCTTT CACATATTCGGAGCTAAATGC
Swi2 aa101 BamHI 5F	<i>SWI2</i>	+301/+320	gatc GGATCC CAATTGAATGGAAATGAGAC
Swi2 aa160 HindIII 3R	<i>SWI2</i>	+480/+462	gatc AAGCTTT CACGCAGCATTTTCTCCATTG
Swi2 aa161 BamHI 5F	<i>SWI2</i>	+481/+500	gatc GGATCCG AGAAACCAGATAACTCAAACC
Swi2 aa161-300 R242A L243A 5F	<i>SWI2</i>	+708/+759	CTGCAACAGGGGAGAG <u>CAGC</u> ACCCATGACAATGT TTACTGCCGAGCAATCC
Swi2 aa161-300 R292A M293A 3R	<i>SWI2</i>	+887/+840	CAAGCTTTCAA ^{AA} ACTCACTCAAAGACAGTAAC <u>GC</u> <u>G</u> CTTTGAAATCTGGAG
Swi2 aa161-300R292A M293A 5F	<i>SWI2</i>	+860/+900	CTCCAGATTTCAAAG <u>CAGC</u> GTTACTGTCTTTGAGT GAGTTTTGAAAGCTTG
Swi2 aa206 BamHI 5F	<i>SWI2</i>	+616/+637	gatc GGATCCCC CAGCAGGCGCAGATGCAGC
Swi2 aa230 BamHI 5F	<i>SWI2</i>	+688/+707	gatc GGATCCG CACAACAAGCACAAGCGAG
Swi2 aa234 BamHI 5F	<i>SWI2</i>	+700/+719	gatc GGATCC CAAGCGAGACTGCAACAGGG
Swi2 aa237 HindIII 3R	<i>SWI2</i>	+711/+691	gatc AAGCTTT CACAGTCTCGCTTGCTGTTG

Swi2 aa238 BamHI 5F	SWI2	+712/+731	gatc GGATCC CAACAGGGGAGAAGATTACC
Swi2 aa238-307 HP-AA FK-AA 3R	SWI2	+891/+840	CAAAGACAGTAACATTCTT <u>GCGGC</u> ATCTGGAG <u>CA</u> <u>GCGT</u> TAAATAGATTTTTGG
Swi2 aa238-307 HP-AA FK-AA 5F	SWI2	+840/+891	CCAAAAATCTATTAAC <u>GCTGCT</u> CCAGAT <u>GCCG</u> CAA GAATGTTACTGTCTTTG
Swi2 aa238-307 K270A P271A 3R	SWI2	+841/+794	GGATAACAGCCTGAAATTCAAACGGAATAG <u>CCGC</u> TCTATTTACTAGAC
Swi2 aa238-307 K270A P271A 5F	SWI2	+794/+841	GTCTAGTAAATAGAG <u>GCGGCT</u> ATTCCGTTTGAATTT CAGGCTGTTATCC
Swi2 aa238-307 LK-AA LK-AA 3R	SWI2	+806/+753	CTATTTACTAGACAT <u>GCTGC</u> AGATGTGATTTGGGC <u>CGCTGC</u> CAGTTCGGATTGC
Swi2 aa238-307 LK-AA LK-AA 5F	SWI2	+753/+806	GCAATCCGAACT <u>GGCAGC</u> GGCCCAAATCACATCT <u>GCAGC</u> ATGTCTAGTAAATAG
Swi2 aa238-307 R242A L243A 3R	SWI2	+753/+704	CTCGGCAGTAAACATTGTCATGGGT <u>GCTGCT</u> CTCC CCTGTTGGGATCCCCG
Swi2 aa238-307 R242A L243A 5F	SWI2	+704/+753	CGGGATCCCAACAGGGGAGAG <u>CAGC</u> ACCCATGA CAATGTTTACTGCCGAG
Swi2 aa238-307 R292A M293A 3R	SWI2	+903/+855	CGAAACTCACTCAAAGACAGTAAAC <u>GCTGCT</u> TTTGA AATCTGGAGGATGG
Swi2 aa238-307 R292A M293A 5F	SWI2	+855/+903	CCATCCTCCAGATTTCAAAG <u>CAGC</u> GTTACTGTCTT TGAGTGAGTTTGGC
Swi2 aa300 HindIII 3R	SWI2	+900/+883	gatc AAGCTT TCAAACACTCAAAAGACAG
Swi2 aa307 HindIII 3R	SWI2	+921/+905	gatc AAGCTT TTCATGTGGGTTGTCTTCTTC
Swi2 aa53 HindIII 3R	SWI2	+160/+143	gatc AAGCTT TCAATTCTTGTGCTGCTTGG
Taf1 182-250 LLK-AAK 3R	TAF1	+657/+597	ACCCTTTTCAAATCAGGAAAGTATTTTTTT <u>G</u> CAG <u>C</u> ATACTTCTCATGGTTTATCAAGTC
Taf1 182-250 LLK-AAK 5F	TAF1	+597/+657	GACTTGATAAACCATGAGAAGTAT <u>GCTG</u> CAAAAA AATACTTTCCTGATTTTGAAAAGGGT
Taf1 182-250 LLK-LLA 3R	TAF1	+657/+597	ACCCTTTTCAAATCAGGAAAGTATTTT <u>GCT</u> AGAA GATACTTCTCATGGTTTATCAAGTC
Taf1 182-250 LLK-LLA 5F	TAF1	+597/+657	GACTTGATAAACCATGAGAAGTATCTTCTAG <u>CAAA</u> ATACTTTCCTGATTTTGAAAAGGGT
Taf1 aa250 3R XhoI His6	TAF1	+750/+728	gatc CTCGAG TGAatggtggtggtgatgatgAGGCATAA ACGGTTTCTTTACCC
Taf1 aa250 Sall 3R	TAF1	+750/+729	gatc GTCGAC GTAGGCATAAACGGTTTCTTTACC
Taf1 PstI 5F	TAF1	+1/+20	gatc CTGCAG CATGGTAAAGCAGCAGGGATC
TAF1_3_XhoI	TAF1	+3402/+3382	gatc CTCGAG AACTCAAATAATATGCACTT
TAF1_3F_Sall	TAF1	+1808/+1827	gatc GTCGAC TGACCAGTTCAACAAATCC
TAF1_3F_XbaI	TAF1	+1466/+1447	gatc TCTAGA AGTGGCTGTTCCCTAGATACC
TAF1_5_Sac	TAF1	-200/-181	gatc GAGCTC ATGAGCGTCTGTGGGTCCAT

TAF1_5F_EcoRI	<i>TAF1</i>	-275/-256	gatc GAATTCT GGTTGGTACCAATCATACC
TAF1_5F_SacI	<i>TAF1</i>	+57/+38	gatc GAGCTC ATATGCTTCATCTTCGTTGG
TAF1_ORF	<i>TAF1</i>	+1066/+1085	CCCAACTTAAAGTTCTCCGG
TAF1_Ver	<i>TAF1</i>	+1880/+1861	TCATGTTTGAAAACGGGTGC
Taf12 Mut I173A D174A 3R	<i>TAF12</i>	+534/+495	CCTCGAGTCATTGTTCTAACCTAGCAGCATTTTGT TCAAGTAGGTCTCT
Taf12 Mut I173A D174A 5F	<i>TAF12</i>	+495/+534	AGAGACCTACTTGAAACAAAATGCTGCTAGGTTA GAACAATGACTCGAGG
Taf12 Mut K150A L151A 3R	<i>TAF12</i>	+476/+427	TGACGGACTTGGAATTCTGCCATGCCGCTTCATA TTCTTGGTTCTCTC
Taf12 Mut K150A L151A 5F	<i>TAF12</i>	+427/+476	GAAGAGAACCAAGAATATGAAGCGGCATGGCAG AATTTCCAAGTCCGTCA
Taf12 Mut L169A K170A 3R	<i>TAF12</i>	+531/+482	TTCTAACCTATCAATATTTTGTGCCGCGTAGGTCTC TTTCTCCTTTATAC
Taf12 Mut L169A K170A 5F	<i>TAF12</i>	+482/+531	GTATAAAGGAGAAAGAGACCTACGCCGGCACAAA ATATTGATAGGTTAGAA
Taf12 Mut R175A L176A 3R	<i>TAF12</i>	+522/+501	GCTTGAATTCCTCGAGTCATTGTTCTGCCGCATCA ATATTTTGTTC AAGTAGG
Taf12 Mut R175A L176A 5F	<i>TAF12</i>	+501/+522	CCTACTTGAAACAAAATATTGATGCCGGCAGAACA ATGACTCGAGGAATTCAAGC
Taf12 Mut S129A N130A 5F	<i>TAF12</i>	+362/+411	AACAACAACAGACAAGAAACAACGCTGCCAAATT TAGCAATATGATAAAA
Taf12 Mut S129A N130A 3R	<i>TAF12</i>	+411/+362	TTTTATCATATTGCTAAATTTGGCAGCGTTGTTTCT TGTCTGTTGTTGTT
Taf12 Mut V139A L140A 3R	<i>TAF12</i>	+441/+392	TTCTTGGTTCTCTCCGGGGTGGCAGCCTGTTTAA TCATATTGCTAAATT
Taf12 Mut V139A L140A 5F	<i>TAF12</i>	+392/+411	AATTTAGCAATATGATAAAACAGGCTGCCACCCC GGAAGAGAACCAAGAA
Taf12 Veri	<i>TAF12</i>	+1341/+1360	GGATCTTGCCGACGATTTTG
TAF12_3F_Sall	<i>TAF12</i>	+869/+850	gact GTCGACA ACATTGATGTTATGGACAC
TAF12_3F_XbaI	<i>TAF12</i>	+1466/+1485	gact TCTAGAT TCTCGTTATTCCGCAG
TAF12_5F_EcoRI	<i>TAF12</i>	-360/-340	gact GAATTCT ACGTGCAAAACGATGTG
TAF12_5F_SacI	<i>TAF12</i>	+86/+67	TTGCTGAGCTCCTGTGATCG
TAF12_BamHI_For	<i>TAF12</i>	-11/+8	gact GGATCC AAAATACGACAATGTCTTCC
TAF12_BamHI_For_279	<i>TAF12</i>	+833/+853	gact GGATCC AAAATACGACAATGGGTCAAACCA AAGAAAGAT
TAF12_BamHI_Rev	<i>TAF12</i>	-16/-37	gact GGATCC ACACTGGCAAAGATTCGGTT
TAF12_KpnI_Rev	<i>TAF12</i>	+1769/+1748	gact GGTACCG TAAATAATATAGTATGAACAC
Taf12_ORF	<i>TAF12</i>	+1109/+1128	CAAAACACCAGCACCGGTAG
Taf12_ORF2	<i>TAF12</i>	+1077/+1096	GCCTGCCATACCCATATCGG

TAF12_Ver	<i>TAF12</i>	+1466/+1485	GGATTATGGTTTCGCCAATG
TAF12_XbaI_For	<i>TAF12</i>	-585/-566	gact TCTAGAC AAAAGCTTGTCTCTCG
Toa1 220-286 T275A 3R	<i>TOA1</i>	+847/+796	CTTCCACTTGAGCTTTTTGGAATGTGG <u>CG</u> TCATTT CTATTGATGGTCACCAC
Toa1 220-286 T275A 5F	<i>TOA1</i>	+796/+847	GTGGTGACCATCAATAGAAATGAC <u>GCC</u> CACATTCC AAAAAGCTCAAGTGGAAG
Toa1 220-286 V251A 3R	<i>TOA1</i>	+773/+723	CATCTCGCCTTTGTTCTTGTGACT <u>G</u> CATCATATAAG CACAGCATTAAAGTTC
Toa1 220-286 V251A 5F	<i>TOA1</i>	+723/+773	GAACTTAATGCTGTGCTTATATGAT <u>G</u> CAGTCACAA GAACAAAGGCGAGATG
Toa1 aa 210 BamHI 5F	<i>TOA1</i>	+628/+648	gatc GGATCCT CAGAACTAGATGATTCCGA
Toa1 aa 70 HindIII 3R	<i>TOA1</i>	+210/+191	gatc CAAGTT GTTCTGTACACCATTGATAT
Toa1 aa 71 BamHI 5F	<i>TOA1</i>	+211/+230	gatc GGATCC GACTTAAATTTCAATCTTGC
Toa1 aa1-143 E26A N27A 3R	<i>TOA1</i>	+106/+58	GTAAAGTTTGTTCATCGATACCC <u>G</u> CAGCTGCAAA GTCCTCTTACTTC
Toa1 aa1-143 E26A N27A 5F	<i>TOA1</i>	+58/+106	GAAGTAAGAGAGGACTTTGCAG <u>CTG</u> CGGGTATC GATGAACAAACTTTAC
Toa1 aa1-143 K44A L45A 3R	<i>TOA1</i>	+158/+109	GTAGTTACCTTCGTCTCTGTG <u>GCCG</u> CTTTTTGCCA AATATTTTTAGGTC
Toa1 aa1-143 K44A L45A 3R	<i>TOA1</i>	+109/+158	GACCTAAAAAATATTTGGCAAAAAG <u>CGGCC</u> CACAG AGACGAAGGTAACTAC
Toa1 aa1-143 K50A V51A 3R	<i>TOA1</i>	+187/+135	CTTCATTGAACTGATTGTCCCATGAAAAAGTAGTT <u>GCCG</u> CGTCTCTGTGAGC
Toa1 aa1-143 K50A V51A 5F	<i>TOA1</i>	+135/+187	GCTCACAGAGACG <u>GCGG</u> CACTACTTTTTCATGG GACAATCAGTTCAATGAAG
Toa1 aa1-143 KL-AA lang 3R	<i>TOA1</i>	+177/+97	CTGATTGTCCCATGAAAAAGTAGTTACCTTCGTCT CTGTG <u>GCCG</u> CTTTTTGCCAAATATTTTTAGGTCTT GTAAAGTTTG
Toa1 aa1-143 KL-AA lang 5F	<i>TOA1</i>	+97/+177	CAAACCTTACAAGACCTAAAAAATATTTGGCAAAA <u>AGCGGCC</u> CACAGAGACGAAGGTAACTACTTTTTCA TGGGACAATCAG
Toa1 aa1-143 L38A K39A 3R	<i>TOA1</i>	+140/+90	GTGAGCTTTTTTTGCCAAATATTT <u>GCTG</u> CGTCTTGT AAAGTTTGTTCATCG
Toa1 aa1-143 L38A K39A 5F	<i>TOA1</i>	+90/+140	CGATGAACAACTTTACAAGAC <u>G</u> CAGCAAATATTT GGCAAAAAAGCTCAC
Toa1 aa1-143 L45A 3R	<i>TOA1</i>	+158/+109	GTAGTTACCTTCGTCTCTGTG <u>GCC</u> CTTTTTTTGCCAA ATATTTTTAGGTC
Toa1 aa1-143 L45A 5F	<i>TOA1</i>	+109/+158	GACCTAAAAAATATTTGGCAAAAAG <u>GCC</u> CACAG AGACGAAGGTAACTAC

Toa1 aa1-143 V21A R22A 3R	TOA1	+86/+39	CCCGCATTTTCAAAGTCCTCTGCTGCTTCATTACC ACAGACTCTACG
Toa1 aa1-143 V21A R22A 5F	TOA1	+39/+86	CGTAGAGTCTGTGGTAAATGAAGCAGCAGAGGA CTTTGAAAATGCGGG
Toa1 aa1-143 V51A 3R	TOA1	+187/+135	CCTTCATTGAACTGATTGTCCCATGAAAAAGTAGT TGCTTCGTCTCTGTGAGC
Toa1 aa1-143 V51A 5F	TOA1	+135/+187	GCTCACAGAGACGAAGGCAACTACTTTTTTCATGG GACAATCAGTTCAATGAAGG
Toa1 aa1-143 Y10A E11A 3R	TOA1	+61/+10	CTTCATTTACCACAGACTCTACGATAATCGCGGCC ACTCTGCTGGCCTCTGC
Toa1 aa1-143 Y10A E11A 5F	TOA1	+10/+61	GCAGAGGCCAGCAGAGTGGCCGCGATTATCGTA GAGTCTGTGGTAAATGAAG
Toa1 aa215 BamHI 5F	TOA1	+643/+664	gatc GGATCC ACGGATGAGGTTCGGTTCAGAAC
Toa1 aa220 BamHI 5F	TOA1	+658/+679	gatc GGATCCT CAGAACTAGATGATTCCGACG
Toa1 aa220-286 V266A T267A 3R	TOA1	+829/+779	GGAATGCGGCGTCATTTCTATTGATGGTCACCACA CCATCTTTCAGACTAC
Toa1 aa220-286 V266A T267A 5F	TOA1	+779/+829	GTAGTCTGAAAGATGGTGTGGTGACCATCAATAG AAATGACGCCGCATTCC
Toa1 aa220-286 Y274A T275A 3R	TOA1	+847/+796	CTTCCACTTGAGCTTTTTGGAATGCGGCGTCATTT CTATTGATGGTCACCAC
Toa1 aa220-286 Y274A T275A 5F	TOA1	+796/+847	GTGGTGACCATCAATAGAAATGACGCCGCATTCC AAAAAGCTCAAGTGGAAG
Toa1 aa226 BamHI 5F	TOA1	+673/+695	gatc GGATCC GACGATGACTATCTAATTTTC
Toa1 aa232 BamHI 5F	TOA1	+694/+714	gatc GGATCCT CGGAGGGTGAAGAGGATGG
Toa1 Chrom 3R	TOA1	+1000/+951	ACTTCGGCTAATGAACATACAAGCGCTGTTTGACA ACAGATGACCAAGTTactatagggagaccggcagatc
Toa1 Chrom 5F	TOA1	+810/+849	TAGAAATGACTACACATTCCAAAAAGCTCAAGTG GAAGCGGAGTGGGTATtcccaccaccatcatcatcac
Toa1 D273A Y274A 3R	TOA1	+844/+793	CCACTTGAGCTTTTTGGAATGTGGCGGCATTCTA TTGATGGTCACCACACC
Toa1 D273A Y274A 5F	TOA1	+793/+844	GGTGTGGTGACCATCAATAGAAATGCCGCCACAT TCCAAAAAGCTCAAGTGG
Toa1 F276A K278A 3R	TOA1	+856/+807	CCCACTCCGCTTCCACTTGAGCTGCTTGGGCTGTG TAGTCATTTCTATTG
Toa1 F276A K278A 3R V2	TOA1	+854/+804	CACTCCGCTTCCACTTGAGCTGCTTGGGCTGTGTA GTCATTTCTATTGATG
Toa1 F276A K278A 5F	TOA1	+807/+856	CAATAGAAATGACTACACAGCCCAAGCAGCTCAA GTGGAAGCGGAGTGGG
Toa1 F276A K278A 5F V2	TOA1	+804/+854	CATCAATAGAAATGACTACACAGCCCAAGCAGCT CAAGTGGAAGCGGAGTG

Toa1 I269A R271A 3R	TOA1	+838/+790	GAGCTTTTTGGAATGTGTAGTCATTTGCATTGGCG GTCACCACACCATC
Toa1 I269A R271A 5F	TOA1	+790/+838	GATGGTGTGGTGACC <u>GCCAATGCAAAT</u> GACTACA CATTCCAAAAAGCTC
Toa1 K250A V251A 3R	TOA1	+773/+723	CATCTCGCCTTTGTTCTTGTGGCTGCATCATATAA GCACAGCATTAAAGTTC
Toa1 K250A V251A 3R II	TOA1	+758/+708	CTTGTGGCTGCATCATATAAGCACAGCATTAAAGTT CTCATCTGGCCCATCC
Toa1 K250A V251A 5F	TOA1	+723/+773	GAACTTAATGCTGTGCTTATATGATGCAGCCACAA GAACAAAGGCGAGATG
Toa1 K250A V251A 5F II	TOA1	+708/+758	GGATGGGCCAGATGAGAACTTAATGCTGTGCTTA TATGATGCAGCCACAAG
Toa1 L263A K264A 3R	TOA1	+807/+758	GATGGTCACCACACCATCTGCCGCACTACATTTCC ATCTGCCTTTGTTT
Toa1 L263A K264A 5F	TOA1	+758/+807	GAACAAAGGCGAGATGGAAATGTAGTGCGGCAG ATGGTGTGGTGACCATC
Toa1 RK-AA 3R V2	TOA1	+786/+723	CAGACTACATGCCCATGCCGCTTTGTTCTTGTGA CTTTATCATATAAGCACAGC
Toa1 RK-AA 5F V	TOA1	+723/+786	GCTGTGCTTATATGATAAAGTCACAAGAACAAAG GCGGCATGGGCATGTAGTCTG
Toa1 RKRK-AAAA 3R	TOA1	+790/+738	CTTTCAGACTACATGCCCATGCCGCCGCTGTTGCT GTGACTTTATCATATAAG
Toa1 RKRK-AAAA 5F	TOA1	+738/+790	CTTATATGATAAAGTCACAGCAACAGCGGCCGCA TGGGCATGTAGTCTGAAAG
Toa1 Veri	TOA1	+790/+811	GATGGTGTGGTGACCATCAATA
Toa1_BamHI 3R	TOA1	-6/-27	gtca GGATCCA ACGATGTCCCTTGTGTATG
Toa1_BglIII 5F	TOA1	+861/+880	gtca AGATCT CTAAATCTTTAGACGTAAAG
Toa1_SacI 5F	TOA1	-328/-310	gtca GAGCTC GTTTCATGAATTACGATATG
Toa1_SalI 3R	TOA1	+1204/1185	gtca GTCGACT ACCTACCAATGACAAAG
Toa2 aa 65 HindIII 3R	TOA2	+195/+173	gatc AAGCTTT CAGTTTCCTTTCACAGTCAATTTAG
Toa2 aa 66 BamHI 5F	TOA2	+196/+215	gatc GGATCC CTGGACACATATGGATTTTG
Toa2 aa55 HindIII 3R	TOA2	+165/+150	gatc AAGCTTT GAAATTGTCTTTTAAAGTC
Toa2 aa56 BamHI 5F	TOA2	+166/+186	gatc GGATCC ACCCAATCTAAATTGACTGTG
Toa2 aa80 HindIII 3R	TOA2	+240/+223	gatc AAGCTTT CATACGATAAAAGTCCAAAC
Toa2 aa81 BamHI 5F	TOA2	+241/+259	gatc GGATCC AAAAAATTGTCAGGTTACTG

5.5 Molekularbiologische und biochemische Standardpuffer

1x TE:	10 mM	Tris	
	1 mM	EDTA	pH = 8,0
1x TBE:	89 mM	Tris	
	89 mM	Borsäure	
	2,5 mM	EDTA	pH = 8,3
10x KPP:	1 M	KH ₂ PO ₄	
	1 M	K ₂ HPO ₄	pH = 6,5
1x PBS:	1 mM	KH ₂ PO ₄	
	10 mM	Na ₂ HPO ₄	
	137 mM	NaCl	
	2,7 mM	KCl	pH = 7,0
20 x TAE:	800 mM	Tris/Acetat	pH = 8,0
	20 mM	EDTA	
10 x TBS:	50 mM	Tris/HCl	pH = 7,5
	150 mM	NaCl	

5.6 Kultivierung von Mikroorganismen

5.6.1 Anzucht von *E. coli*-Zellen

Die Anzucht von *E. coli*-Zellen auf Festmedium erfolgte im Brutschrank bei 37°C. Flüssigkulturen (3 ml/6 ml) in Reagenzgläsern wuchsen bei 37°C im Schüttler, größere Ansätze (50 ml/250 ml) in Erlenmeyerkolben auf einer geeigneten Schüttelplattform.

5.6.2 Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen

S. cerevisiae-Zellen wuchsen auf Festmedien bei 30°C im Brutschrank oder Brutraum. Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyerkolben (200 ml) oder in Reagenzgläsern (5 ml) bei 30°C unter Schütteln angezogen.

5.6.3 Zelldichtebestimmung

Die Zelldichtebestimmung von Hefekulturen und *E. coli*-Kulturen wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) im Photometer bei 600 nm durchgeführt. Für Hefe entspricht ein Wert von OD₆₀₀ = 1 einer Zelldichte von ca. 2 x 10⁷ Zellen/ml, für *E. coli* sind es etwa 3 x 10⁸ Zellen.

5.6.4 Herstellung von Dauerkulturen

Für die Herstellung von Dauerkulturen wurden 0,5 ml einer frischen Übernachtskultur von Hefe bzw. *E. coli* mit 0,5 ml einer 35%-igen Glycerinlösung gemischt und bei -80°C aufbewahrt.

5.7 Transformationstechniken

5.7.1 Transformation von *E. coli* nach der Calciumchlorid-Methode

Für die Transformation der *E. coli*- Stämme DH5 α , BL21 und BTH101 wurde die von Fuller (1982) beschriebene Calciumchlorid-Methode verwendet.

Benötigte Lösungen: 100 mM MgCl₂
100 mM CaCl₂
100 mM CaCl₂ in 15%-igem Glycerin

A) Herstellung und Lagerung Transformations-kompetenter Zellen:

Zur Herstellung transformationskompetenter Zellen wurden Kolben mit 200 ml LB-Medium mit jeweils 1 ml einer frischen Übernachtskultur des jeweiligen *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 geschüttelt.

Die Kultur wurde jeweils in sterile Sarstedtröhrchen überführt und 10 min bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellpellets in 15 ml eiskalter 0,1 M MgCl₂-Lösung resuspendiert und 10 min bei 4000 rpm und 4°C sedimentiert. Nach Resuspension in 15 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung wurden die Zellen für 20 min auf Eis inkubiert und abermals 10 min bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 2,5 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂/Glycerin-Lösung resuspendiert und als 50 μ l-Aliquots auf vorgekühlte 1,5 ml Reagiergefäße verteilt, die schließlich bis zu ihrem Gebrauch bei -80°C gelagert wurden.

B) Transformation der kompetenten Zellen

Die transformationskompetenten *E. coli*- Zellen wurden nach dem Auftauen in einem Eisbad mit der zu transformierenden DNA vorsichtig vermischt. Die Adsorption der DNA erfolgte für 20 min im Eisbad. Nach einem 2-minütigen Hitzeschock bei 42°C wurde erneut für 5 min gekühlt. Anschließend wurde 1 ml flüssiges LB-Medium zugegeben und zur Expression der Antibiotikaresistenz für 30 bis 60 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (1 min, 13000 rpm) und im Restvolumen resuspendiert. Diese Suspension wurde auf LB-Amp Medium ausplattiert und bei 37°C über Nacht bebrütet. Bei Transformation von Ligationsansätzen wurde eine repräsentative Anzahl der gewachsenen Einzelklone nach der „Mini-Screen“ Methode untersucht.

Für die Transformation reiner Plasmid-DNA wurde ein verkürztes Verfahren angewendet. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit der zu transformierenden DNA gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C und erneuter Inkubation für 5 min auf Eis wurden die transformierten Zellen direkt in Röhrchen mit dem entsprechenden Selektivmedium übergeführt und standen nach Inkubation im Schüttler über Nacht bei 37°C als Vorkultur oder zur Isolation von Plasmid-DNA zur Verfügung.

5.7.2 Transformation von Hefe nach der modifizierten Lithiumacetat-Methode

Mit Hilfe der Lithiumacetat-Methode (Ito *et al.*, 1983) können Hefezellen ohne vorherige Entfernung der Zellwand transformiert werden. Daher kann auf eine osmotische Stabilisierung der Transformanten verzichtet werden. Eine schnellere und einfachere Variante der klassischen Lithiumacetat-Methode wurde von Soni *et al.* (1993) beschrieben.

Benötigte Lösungen: LP-Mix: 40% Polyethylenglykol 4000
 0,1 M Lithiumacetat
 10 mM Tris/HCl pH = 7,5
 1 mM EDTA
 Dimethylsulfoxid (DMSO)
 Carrier-DNA (gescherte, thermisch denaturierte Lachs-Sperma-DNA in 1x TE, 5 mg/ml)

1,5 ml einer bis zur mittellogarithmischen Wachstumsphase angezogenen Übernachtskultur des entsprechenden Hefestammes wurden bei 13000 rpm kurz zentrifugiert. Nach Auflockerung des Zellsediments wurde dieses mit 10 µl Carrier-DNA sowie 1-3 µl des zu transformierenden Plasmids versetzt und gut gemischt. Anschließend wurden 500 µl LP-Mix und 55 µl DMSO zugefügt und erneut gut durchmischt. Nach einem Inkubationsschritt von 15 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte ein 15-minütiger Hitzeschock bei 42°C. Zur Verdünnung des Polyethylenglykol im LP-Mix wurden 500 µl 1 x TE zu den Zellen gegeben und 2 min bei 2000 rpm zentrifugiert, anschließend mit 1 ml 1 x TE gewaschen und erneut 2 min bei 4000 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in der Restflüssigkeit resuspendiert und auf einem geeigneten Selektivmedium ausplattiert.

5.8 Methoden zur Isolierung von DNA

5.8.1 Analytische Isolierung von Plasmid- DNA aus *E. coli* („Miniscreen“)

Um eine größere Anzahl an *E. coli*-Klonen auf die Richtigkeit des eingeführten Plasmids zu untersuchen, wurde die sog. Miniscreen-Analyse durchgeführt. Diese Methode zur Isolierung von Plasmid-DNA basiert auf der alkalischen Lyse der Zellen mit anschließender Fällung der Plasmide (Birnboim und Doly, 1979).

Benötigte Lösungen: 5x TE + 0,1 mg/ml RNase A (Puffer 1)
 0,1 M NaOH + 1% SDS (Puffer 2)
 3 M Kaliumacetat; pH = 4,8 (Puffer 3)
 70% Ethanol (-20°C)
 Isopropanol (-20°C)

Nach Transformation der Plasmid-DNA in *E. coli* DH5α und Inkubation auf LB-Amp-Medium bei 37°C wurden Einzelkolonien gepickt und über Nacht bei 37°C in einem 3 ml LB-Amp-Röhrchen (Endkonzentration Ampicillin 100 mg/l) inkubiert. 1,5 ml der Flüssigkultur wurden in Reagiergefäße übergeführt und durch Zentrifugation geerntet (1 min, 13000 rpm). Das Zellpellet wurde in 100 µl

Puffer 1 resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 200 µl Puffer 2 lysiert. Das alkalische Zelllysat wurde durch Zugabe von 150 µl Puffer 3 neutralisiert. Durch Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm wurden ausgefällte Zelltrümmer und Proteine abgetrennt. Der DNA-haltige Überstand wurde in ein neues Reagiergefäß dekantiert, mit 500 µl eiskaltem Isopropanol versetzt, 10 min bei -20°C inkubiert und 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde die DNA mit 70%igem Ethanol (-20°C) gewaschen, abzentrifugiert (5 min, 13000 rpm) und in der Vakuumzentrifuge getrocknet (10 min, 50°C). Abschließend wurde die DNA in 30 µl A. dest aufgenommen und die erhaltene Plasmid-DNA durch Restriktionsanalyse überprüft.

5.8.2 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Säulenpräparation)

Für die Isolierung möglichst reiner Plasmid-DNA wurde der „InnuPREPPlasmid-Minikit“ der Firma Analytik Jena verwendet. Der Kit basiert auf einer modifizierten Plasmidisolierung mittels alkalischer Lyse.

Benötigte Lösungen (im Kit enthalten): Resuspensionspuffer

Lysispuffer

Neutralisationspuffer

Waschpuffer A, Zugabe von 96% Ethanol

Waschpuffer B

Die *E. coli* - Übernachtskultur (6 ml Röhrchen) wurde mehrmals in einem 1,5 ml Reagiergefäß abzentrifugiert (1 min, 13000 rpm). Das Zellpellet wurde in 250 µl Resuspensionspuffer resuspendiert. Im weiteren Verlauf wurde die Probe mit 250 µl Lysispuffer versetzt und zehn Mal invertiert. Nachfolgend wurden 350 µl Neutralisationspuffer hinzugefügt und ebenfalls zehn Mal invertiert. Das Gemisch wurde für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der DNA-haltige Überstand in eine InnuPREP-Säule überführt.

Nach erneuter Zentrifugation (1 min, 12000 rpm) und Verwerfen des Überstandes wurde die Säule jeweils einmal mit 500 µl Waschpuffer A und 700 µl Waschpuffer B gewaschen und nachfolgend jeweils abzentrifugiert (1 min, 12000 rpm). Um den Ethanol vollständig zu entfernen wurde die leere Säule nochmals trocken zentrifugiert (2min, 13000 rpm). Die Säule wurde nun in ein frisches Reagiergefäß überführt, danach 50 µl A. dest. direkt auf den Filter gegeben und für 1 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die DNA eluiert (1 min, 12000 rpm).

5.8.3 Isolierung chromosomaler DNA aus Hefezellen

Chromosomale DNA aus Hefezellen wurden nach der Methode von Hoffman und Winston (1987) präpariert. Die gewonnene DNA konnte anschließend für die analytische PCR oder als Matrize zur Amplifikation von Genen eingesetzt werden.

Benötigte Lösungen: NETTS: 100 mM NaCl
 1 mM EDTA
 10 mM Tris
 2% Triton X-100
 1% SDS
 PCI: Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)
 4 M Ammoniumacetat
 96% Ethanol (-20°C)

5 ml einer Hefekultur wurden über Nacht bis zur frühstationären Phase angezogen und durch mehrmaliges Zentrifugieren bei 13000 rpm in einem Reagiergefäß geerntet. Das Pellet wurde durch Vortexen aufgelockert. Nach Zugabe von 200 µl NETTS, 200 µl PCI und der etwa gleichen Menge an Glasperlen (Durchmesser 0,5 mm) wurde 5 min bei voller Stärke auf dem Vortex-Gerät geschüttelt, anschließend 200 µl 1x TE zugegeben, gemischt und zentrifugiert (5 min, 13000 rpm). Die wässrige Oberphase wurde in ein frisches Reagiergefäß übergeführt und die enthaltende DNA durch Zugabe von 96%-igem Ethanol (-20°C) und 10 µl 4 M Ammoniumacetat gefällt. Nach Zentrifugation (3 min 13000 rpm) wurde das Sediment im Vakuum getrocknet und die DNA anschließend in 50 µl 1x TE resuspendiert.

5.9 Enzymatische Modifikationen von DNA-Molekülen

5.9.1 Endonukleolytische Spaltung von Plasmid- DNA

Benötigte Lösungen:

Verdaupuffer A, B, H, L, M (Roche Diagnostics) oder CutSmart (NEB)

Stopp-Mix für Restriktionsverdaus: 7 M Harnstoff
 40% Glycerin
 50 mM EDTA
 10 mM Tris/ HCl; pH = 8,0
 0,1% Bromphenolblau
 0,1% Xylencyanol

In der Molekularbiologie werden üblicherweise Restriktionsenzyme vom Typ II verwendet, die eine hexamere Palindromsequenz erkennen und spalten. Dabei entstehen definierte DNA-Fragmente mit spezifischen Enden. Restriktionsspaltungen dienen hier entweder der Überprüfung von Plasmidpräparationen oder wurden für Klonierungsreaktionen eingesetzt, nachdem die benötigten Restriktionsschnittstellen zuvor mittels PCR angefügt wurden. Die entsprechenden Enzyme mit den

dazugehörigen 10 x Reaktionspuffern (A, B, H, L, M bzw. CutSmart) wurden von der Fa. Roche Diagnostics bzw. NEB bezogen. Es wurde mit einer DNA-Konzentration von bis zu 0,1 µg/µl DNA und einer spezifischen Enzymaktivität von 0,5 - 2 U/µg DNA gearbeitet. Je nach Zielstellung wurden die Verdau ca. 1-2 h bei 37°C (sofern keine anderen Angaben des Herstellers vorlagen) inkubiert. Durch Zugabe von 3-4 µl Stopp-Mix wurde der Verdau beendet und mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

5.9.2 Phosphatase-Behandlung zur 5'-Dephosphorylierung gespaltener Vektoren

Die Vektor-Dephosphorylierung hat zum Ziel, die Anzahl von Religanden im Zuge einer Klonierungsreaktion zu reduzieren. Das Entfernen des 5'-Phosphatrestes mittels einer alkalischen Phosphatase („shrimp alkaline phosphatase“, SAP) soll eine Wiederverknüpfung der zuvor gespaltenen Vektor-DNA während der folgenden Ligationsreaktion verhindern. So wird die Ausbeute an neu zusammengesetzten Plasmid-Klonen erhöht. Hierfür wurden 2-3 µl der gespaltenen Vektor-DNA mit 6-7 µl sterilem A. dest, 1 µl Reaktionspuffer (10x SAP-Puffer; Fa. Roche Diagnostics) und 1 µl (2 U) SAP (Shrimps Alkaline Phosphatase; Fa. Roche Diagnostics) versetzt. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung des Enzyms für 15 min bei 65°C.

5.9.3 Ligation von DNA-Molekülen

Die Ligationsreaktion schließt Lücken im Zucker-Phosphat-Rückgrat von DNA- oder RNA-Molekülen, indem unter ATP-Verbrauch eine Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-OH-Gruppe der Desoxyribose und dem 5'-Phosphatrest benachbarter Nukleotide geknüpft wird. Diese Reaktion ist notwendig, um ein DNA-Fragment in einen linearisierten Vektor zu integrieren. Für Klonierungen wurde die T4-Ligase der Firma epicentre verwendet.

Benötigte Lösungen: 10 x 25 mM ATP

10 x Ligationspuffer: 330 mM Tris-Acetat, pH = 7,5

660 mM Kalium-Acetat

100 mM Mg-Acetat

5 mM DTT (Dithiothreitol)

96% Ethanol

Es wurden wenige µl des Plasmidverdau bzw. der gesamte Dephosphorylierungs- Ansatz mit 20-25 µl des PCR-Verdau vermischt und mit 500 µl eiskaltem 96%-igem Ethanol gefällt (Gemisch 20 min bei -80°C, 10 min 13000 rpm Zentrifugation, 10 min Trocknung in der Vakuumzentrifuge). Anschließend wurde die DNA in 16 µl sterilem A. dest. aufgenommen, mit 1 µl 10x ATP, 2 µl 10x Ligationspuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (2 U) versetzt. Die Ligation erfolgte über Nacht (16 h) bei 4°C. Am darauf folgenden Tag wurde der komplette Ansatz in *E. coli* DH5α transformiert.

5.10 Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“) dient der direkten *in vitro*-Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Als Matrize kann chromosomale DNA oder Plasmid-DNA dienen. Des Weiteren werden Oligonukleotidstarter (Primer) benötigt, welche komplementär zu den Enden des zu amplifizierenden Bereichs sind (Saiki *et al.*, 1988). Die Reaktion wird durch eine hitzestabile DNA-Polymerase katalysiert, welche dNTPs zu neuen DNA-Strängen verknüpft.

Die DNA-Matrize wird zunächst bei 94°C in ihre Einzelstränge überführt (Denaturierung), für die Anlagerung der Primer wird die Temperatur je nach Ausgangs-DNA und Anwendung auf etwa 60°C abgesenkt (Annealing). Anschließend erfolgt die Verlängerung der Startermoleküle bei etwa 72°C, so dass zwei komplementäre DNA-Moleküle synthetisiert werden (Elongation). Weitere Zyklen von Erhitzen und Abkühlen führen zur exponentiellen Vervielfältigung des DNA-Fragmentes. Je nach Zielstellung wurde entweder die Taq-Polymerase (Mullis und Faloona, 1987) der Firma PeqLab oder die präzisere Phusion-High Fidelity Polymerase der Firma Biozym genutzt.

5.10.1 PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Klonierung

Zur Amplifikation von DNA-Sequenzen für die Klonierung in einen Vektor kam die Phusion-Polymerase der Firma Thermo Fisher Scientific zum Einsatz. Diese gentechnisch optimierte DNA-Polymerase hat eine Syntheserate von 1 kb/15-30 sec und korrigiert Fehler in der synthetisierten Sequenz mit Hilfe der 3'-5'-Exonuklease-Aktivität („proof-reading“), wodurch die Fehlerrate bei $4,4 \times 10^{-7}$ Nukleotiden liegt.

Die Reaktion fand in einem 0,5 ml Reagiergefäß statt, in das folgende Komponenten pipettiert wurden:

- 37 µl A. dest.
- 0,5 µl Template-DNA (1:10 entspricht ca. 2,5 ng DNA)
- 10 µl 5 x HF Polymerase-Puffer
- je 0,5 µl 3'- und 5'-Primer (100 µM)
- 1 µl dNTPs („PCR Nucleotide Mix“, Firma Roche Diagnostics)
- 0,3 µl (0,3 Units) Phusion-Polymerase

Die Reaktion lief im Thermocycler der Firma Analytik Jena nach folgendem Profil ab:

1. Schritt: 98°C 2 min (Initiale Denaturierung des Doppelstranges)
2. Schritt: 98°C 30 sec (Denaturierung des Doppelstranges)
3. Schritt: 60°C 1 min (Primerannealing)
4. Schritt: 72°C 2 min (Elongation)
5. Schritt: 72°C 10 min (finale Elongation)
6. Schritt: 8°C ∞

Die Schritte 2-4 wurden in 34 Zyklen wiederholt.

Die dauerhafte Erhitzung des Deckels auf 98°C verhinderte eine Kondensation des Reaktionsansatzes. Zur Verbesserung der Primer-Spezifität konnte die Annealing-Temperatur erhöht werden. Wurden Fragmente von mehr als 1 kb amplifiziert, wurde die Elongationsphase verlängert.

Das Ergebnis einer PCR wurde durch elektrophoretische Auftrennung eines 5 µl Aliquots im Agarosegel überprüft.

5.10.2 Analytische PCR zum Nachweis von DNA-Manipulationen

Insertionen und Deletionen von Genen in das Genom von *S. cerevisiae* wurden mit Hilfe der Taq-DNA-Polymerase der Firma Peqlab nachgewiesen. Dazu wurde die chromosomale DNA aus den Mutantenstämmen isoliert und einer analytischen PCR mit spezifischen Verifizierungsprimern unterzogen. Zum Vergleich wurde die Reaktion mit DNA aus den zugehörigen Wildtyp-Stämmen durchgeführt.

Die Reaktion fand in einem 0,5 ml Reagiergefäß statt, in das folgende Komponenten pipettiert wurden:

- 80 µl A. dest.
- 2 µl Template-DNA (1:10 entspricht ca. 2,5 ng DNA)
- 10 µl 10 x Polymerase-Puffer
- je 1 µl 3'- und 5'-Primer (100 µM)
- 2 µl dNTPs („PCR Nucleotide Mix“, Firma Roche Diagnostics)
- 2 µl (2 Units) Taq-Polymerase

PCR-Programm:

1. Schritt: 98°C 2 min (Initiale Denaturierung des Doppelstranges)
2. Schritt: 98°C 30 sec (Denaturierung des Doppelstranges)
3. Schritt: 60°C 30 sec (Primerannealing)
4. Schritt: 72°C 2 min (Elongation)
5. Schritt: 72°C 10 min (finale Elongation)
6. Schritt: 8°C ∞

Die Schritte 2-4 wurden in 34 Zyklen wiederholt.

5.10.3 PCR zur gerichteten Mutagenese von Leserahmenkassetten mit mutagenen synthetischen Oligonucleotiden

Die PCR zur gerichteten Mutagenese wurde *in vitro* mit dem „QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene) durchgeführt. Mit diesem Kit ist es möglich, Punktmutationen einzufügen, einzelne Aminosäuren auszutauschen, zu entfernen oder zusätzliche Aminosäuren einzubringen. Hierfür sind im Kit dNTPs, Reaktionspuffer und eine DNA-Polymerase (Pfu Turbo) ohne „proof-reading“-Funktion enthalten. Als Matrize wird ein Plasmid benötigt, das die zu mutagenisierende Leserahmenkassette trägt sowie zwei mit der Wildtypsequenz hybridisierende Primer, die die entsprechende Mutation aufweisen.

Während der PCR repliziert die Polymerase beide Plasmidstränge mit hoher Genauigkeit, ohne dabei die Mutagenese-Primer zu verdrängen. Die isolierte Plasmid-DNA sollte aus einem dam⁺ *E. coli* Stamm isoliert werden, damit die DpnI Restriktionsendonuklease nach erfolgreicher Mutagenese die (hemi-

)methylierte Eltern-DNA abbauen kann. Die synthetischen, zueinander und zur Plasmidmatrize komplementären Primer sollten ca. 50 Basen umfassen. Der zu mutagenisierende Bereich sollte sich in der Mitte der beiden Primer befinden, so dass sich Basen an beiden Seiten korrekt mit der Matrize paaren können. Die hohe Mutationseffizienz dieser Methode wird durch die geringe Menge an eingesetzter unmutierter Plasmidmatrize, die hohe Replikationsgenauigkeit der Polymerase, die exponentielle Zunahme der mutagenisierten Stränge während der PCR und den Abbau der unmutierten DNA durch Restriktionsverdau erreicht.

PCR-Ansatz und -Programm folgten weitgehend der Empfehlung des Herstellers. Zusätzlich wurde dem Ansatz 5% DMSO beigemischt, um Komplikationen durch Sekundärstruktureffekte oder Primerdimerisierung der vergleichsweise langen und zu 100% komplementären Primer vorzubeugen.

PCR-Ansatz: 35,5 µl A. dest.
 5 µl Reaktionspuffer (10x)
 2 µl Plasmid-DNA (1:100 verd.)
 5 µl DMSO
 0,5 µl Primer 1 (0,25 µg/µl)
 0,5 µl Primer 2 (0,25 µg/µl)
 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM)
 0,5 µl Turbo-Pfu-Polymerase

PCR-Programm:

1. Schritt: 95°C 30 sec (Initiale Denaturierung des Doppelstranges)
2. Schritt: 95°C 30 sec (Denaturierung des Doppelstranges)
3. Schritt: 54°C 1 min (Primerannealing)
4. Schritt: 68°C 8 min (Elongation)
5. Schritt: 68°C 10 min (Nachreaktion)
6. Schritt: 8°C ∞

Die Schritte 2-4 wurden in 18 Zyklen wiederholt.

Die Temperatur der Deckelheizung wurde stets auf 98°C eingestellt, um die Kondensation von Teilen des Reaktionsansatzes am Deckel des Reagiergefäßes zu vermeiden. Nach Ablauf der PCR wurde 1 µl *DpnI* zugegeben und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde zur Überprüfung des Ergebnisses ein Aliquot von 3 µl mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Der vollständige Mutageneseansatz wurde in *E. coli* DH5α transformiert. Nach Isolierung der Plasmid-DNA wurde eine Auswahl von Klonen per Auftragssequenzierung durch die Firma LGC-Genomics auf Korrektheit des Basenaustausches überprüft.

Alternativ zum „QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit“ wurde für die gerichtete Mutagenese von DNA durch PCR auch die Phusion-Polymerase der Firma Biozym eingesetzt.

PCR-Ansatz: 33,5 µl A. dest.
10 µl Reaktionspuffer
2 µl Plasmidlösung (1:100 verdünnt)
1 µl dNTPs
2,5 µl DMSO
0,5 µl Primer 1 (1:5 verdünnt)
0,5 µl Primer 2 (1:5 verdünnt)

PCR-Programm:

1. Schritt: 94°C 30 sec (Initiale Denaturierung des Doppelstranges)
2. Schritt: 94°C 30 sec (Denaturierung des Doppelstranges)
3. Schritt: 55°C 1 min (Primerannealing)
4. Schritt: 68°C 6 min (Elongation)
5. Schritt: 68°C 10 min (Nachreaktion)
6. Schritt: 8°C ∞

Die Schritte 2-4 wurden in 18 Zyklen wiederholt.

Nach Ablauf der PCR wurde der Erfolg mittels Gelelektrophorese ermittelt. Anschließend wurde der gesamte Ansatz mit 400 µl eiskaltem 96%-igem Ethanol für 20 Minuten bei -80°C gefällt, dann für 10 Minuten bei 13000 rpm abzentrifugiert und in der SpeedVac getrocknet (10 Minuten, 55°C). Die DNA wurde in 36 µl A. dest. aufgenommen, mit 4 µl Puffer und 1 µl DpnI (Firma NEB) versetzt. Nach Inkubation bei 37°C für 2 Stunden wurde zur Überprüfung des Ergebnisses ein Aliquot von 3 µl mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Der vollständige Mutageneseansatz wurde in *E. coli* DH5α transformiert. Nach Isolierung der Plasmid-DNA wurde eine Auswahl von Klonen per Auftragssequenzierung durch die Firma LGC-Genomics auf Korrektheit des Basenaustausches überprüft.

5.10.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

Zur Aufreinigung der amplifizierten DNA-Fragmente wurde das „innuPREP DOUBLEpure Kit“ der Firma Analytik Jena genutzt.

Benötigte Lösungen (im Kit enthalten): Bindungspuffer

Der gesamte PCR-Ansatz wurde mit 500 µl Bindungspuffer vermischt, auf eine DOUBLEpure-Säule aufgetragen und durch Zentrifugation (2 min, 12000 rpm) an diese gebunden. Zur Elution wurden 50 µl A. dest zugegeben, eine 1 min bei Raumtemperatur inkubiert anschließend 1 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Die Kontrolle erfolgte durch Auftrennung eines 5 µl Aliquots des gereinigten PCR-Produktes im Agarosegel.

5.11 Elektrophoretische Auftrennung von Molekülen

Gelelektrophoretische Auftrennungsverfahren nutzen die Wanderungseigenschaften von Molekülen im elektrischen Feld. Dabei spielen sowohl die Molekülgröße als auch Ladungsverhältnisse eine Rolle. DNA-Fragmente sind aufgrund ihrer sauren Phosphatreste negativ geladen und bewegen sich somit zum Pluspol. Proteine können entsprechend ihrer polaren Seitengruppen eine positive, negative oder neutrale Nettoladung haben, was sich in ihrem unterschiedlichen Wanderungsmuster widerspiegelt.

5.11.1 Auftrennung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

Benötigte Lösungen: Loading Buffer: 7 M Harnstoff
40% Glycerin
50 mM EDTA
10 mM Tris/HCl, pH 8,0
0,1% Bromphenolblau
0,1% Xylencyanol

Je nach Länge der Fragmente wurde ein 1%-iges (größer als 500 bp) oder 2%-iges (kleiner als 500 bp) Agarosegel verwendet. Zur Herstellung des Gels wurde die entsprechende Menge an Agarose eingewogen mit 1x TBE versetzt und in der Mikrowelle bis zur Klärung der Lösung erhitzt. Die fertige Agaroselösung wurde bei 60°C gelagert und zum Gebrauch in eine entsprechende Form gegossen. Nach einer Polymerisationszeit von 10 bis 15 min wurde das Gel in eine Gelelektrophoresekammer gelegt, mit 1x TBE-Puffer überschichtet und die mit Stop-Mix versetzten Proben in die Geltaschen pipettiert. Zur Färbung der DNA wurde das Gel 15 min in ein Ethidiumbromidbad (1 mg/l) gelegt und kurz in Wasser gespült. Die Detektion und Dokumentation der DNA erfolgte unter UV-Licht ($\lambda = 312$ nm).

Eine weitere Methode die DNA im Gel sichtbar zu machen war die Färbung mit dem im Vergleich zu Ethidiumbromid unbedenklichen Farbstoff HD-Green Plus der Firma Intas. Dieser wurde nach dem Temperieren des Agarosegels auf 60°C in das flüssige Gel gegeben (10 μ l/100 ml).

Zur Abschätzung der Fragmentgrößen wurden Größen-Standards der Firma PEQlab verwendet:

DNA-Sizer III (λ -DNA/EcoRI/HindIII; in kb): 21,2/ 5,15/ 4,97/ 4,27/ 3,53/ 2,02/ 1,9/ 1,58/ 1,38/ 0,95/ 0,83/ 0,56/ 0,13

DNA-Leiter-Mix (in kb): 10/ 8/ 6/ 5/ 4/ 3,5/ 3/ 2,5/ 2/ 1,5/ 1,2/ 1/ 0,9/ 0,8/ 0,7/ 0,6/ 0,5/ 0,4/ 0,3/ 0,2/ 0,1

5.11.2 Isolierung von DNA-Molekülen aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten nach ihrer Auftrennung im Agarosegel wurde mit Hilfe des „innuPREP DOUBLEpure Kit“ der Firma Analytik Jena durchgeführt. Diese Aufreinigung war beispielsweise nötig, um DNA-Fragmente mittels Restriktionsverdau aus einem Vektor für weitere Klonierungen freizusetzen oder wenn nach PCR-Reaktionen zusätzliche unspezifische Banden auftraten.

Benötigte Lösungen (im Kit enthalten): Gel-Solubilizer

Binding Optimizer

Waschlösung LS (+ 96% Ethanol)

Die zu isolierende DNA wurde vollständig auf ein Agarosegel aufgetragen. Um das Aufkommen von Thymindimeren zu minimieren, wurde das Gel vor der UV-Exposition auf eine durchsichtige Plastikunterlage gelegt, die Intensität des UV-Lichts auf 70% herabgesetzt und die Belichtungszeit möglichst kurz gehalten. Das zu isolierende Fragment wurde markiert, mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Reagiergefäß gegeben. Anschließend wurde das Gelstück gewogen und in 650 µl Gel-Solubilizer je 300 mg Gelmatrix versetzt. Während einer 10-minütigen Inkubation im 50°C-Heizblock mit gelegentlichem Vortexen wurde das Gelstück verflüssigt. Der Ansatz wurde mit 50 µl Binding Optimizer vermischt und auf eine DOUBLEpure-Säule gegeben. Dies geschah wegen des begrenzten Säulenvolumens in mehreren Schritten mit einminütigen Zentrifugationsschritten bei 12000 rpm. Die an der Säulenmatrix gebundene DNA wurde anschließend zweimal mit 700 µl Waschlösung LS gewaschen (1 min, 12000 rpm). Vor der Elution wurden eventuelle Ethanolrückstände durch erneutes Zentrifugieren entfernt (2 min, 13000 rpm). Anschließend wurden 50 µl A. dest auf die Säulenmatrix gegeben und die DNA nach einminütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur durch Zentrifugation eluiert (1 min, 12000 rpm). Die Ausbeute wurde durch gelelektrophoretische Analyse eines 5 µl-Aliquots überprüft.

5.11.3 Auftrennung von Proteinen in denaturierenden Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE)

Bei der SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach einer Methode von Laemmli (1970) erfolgt die Auftrennung von denaturierten Proteinen unter Zugabe des Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) allein aufgrund ihrer Molekülgröße. SDS lagert sich an die Proteine und denaturiert diese. Zusätzlich erhält der resultierende Komplex durch die angelagerten Sulfatgruppen eine gleichmäßig verteilte negative Ladung. Daher wandern die Proteine nach Anlegen einer Spannung zum Pluspol.

Zunächst werden die Proteine in einem relativ großporigen Sammelgel fokussiert und anschließend in einem feinporigen Trenngel deutlich voneinander separiert. Die nötige Trennschärfe wird durch einen pH-Sprung von 6,8 auf 8,8 an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel erreicht.

Der Anteil an Polyacrylamid im fertigen Gel bestimmt die Porengröße. Das Sammelgel enthielt standardmäßig 3% des Polymers. Die Acrylamid-Konzentration des Trenngels wurde in Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden Proteine angepasst. Hier wurden 7,5%, 10%, 12,5% oder 15% Acrylamid zugesetzt.

Benötigte Lösungen:	Acrylamid-Stammlösung:	30% Acrylamid 0,8% N, N'-Methylenbisacrylamid
	Trenngelpuffer (4x):	1,5 M Tris/HCl, pH = 8,0 0,4% SDS
	Sammelgelpuffer (4x):	500 mM Tris/HCl, pH = 6,8 0,4% SDS
	Tris-Glycin-Laufpuffer (4x):	100 mM Tris/HCl, pH = 8,8 760 mM Glycin 0,4% SDS
	SDS-Probenpuffer (2x):	50 mM Tris/ HCl, pH = 6,8 2% SDS 10% Glycerol 5% β -Mercaptoethanol 0,01% Bromphenolblau
	APS-Stammlösung (10 x):	10% Ammoniumpersulfat
	TEMED	

Zunächst wurden die Bestandteile für das Trenngel zusammenpipettiert, wie in Tabelle 5.8 beschrieben und in einem Zentrifugenröhrchen gemischt. Die Polymerisationsreaktion wurde durch Zugabe von 55 μ l APS-Stammlösung und 3 μ l TEMED gestartet und das Acrylamid-Gemisch nach kurzem Durchmischen sofort in die vorbereitete Gelform (BIO RAD Protean II; Maße ca. 70 x 90 x 0,75 mm) gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um eine scharfe Gelkante zu erhalten. Nach etwa 15 min wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel, bestehend aus 1140 μ l A. dest., 450 μ l Sammelgelpuffer, 180 μ l Acrylamid-Stammlösung, 30 μ l APS und 3 μ l TEMED auf das Trenngel pipettiert. Daraufhin wurde zügig der Taschenkamm in das Sammelgel hineingesetzt. Nach der Polymerisationszeit von weiteren 15 min wurde das Gel in die Laufkammer (BIO RAD Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell) eingespannt und mit 1x Tris-Glycin-Laufpuffer bedeckt. Der Kamm wurde vorsichtig gezogen und die Taschen mit Laufpuffer und aus einer Hamilton-Mikroliterspritze gespült. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit dem gleichen Volumen an SDS-Probenpuffer gemischt und 10 min bei 98°C denaturiert. Die Elektrophorese wurde bei 200 V und 400 mA durchgeführt. Die SDS-PAGE war nach ca. 40-50 min beendet, wenn die Bromphenolblaubande des Probenpuffers gerade ausgelaufen war.

Tabelle 5.8: Zusammensetzung der Trenngele für die SDS-PAGE

Trenngel	7,5%	10%	12,5%	15%
A. dest.	1680 μ l	1400 μ l	1160 μ l	810 μ l
Trenngelpuffer	880 μ l	880 μ l	880 μ l	880 μ l
Acrylamid 30%	880 μ l	1160 μ l	1400 μ l	1750 μ l

5.12 Zellaufschlussmethoden

5.12.1 Glasperlenaufschluss von Hefezellen

Hefezellrohextrakte wurden durch einen Glasperlenaufschluss nach der Methode von Ciriacy (1975) gewonnen. Zunächst wurden die Zellen in 5 ml Selektivmedium bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen. Dann wurden diese bei 3000 rpm für 3 min und 4°C zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde anschließend mit A. dest. gewaschen, nochmals zentrifugiert und die Zellpellets bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C eingefroren.

Zum Zellaufschluss wurden die Zellen mit etwa dem gleichen Volumen an Glasperlen (0,3 µm Durchmesser) versetzt und für 3 min auf einem Vortexgerät geschüttelt. Ab diesem Zeitpunkt musste stets auf Eis gearbeitet werden und es erfolgte nun die Zugabe von 1 ml KPP. Die vorliegenden Zelltrümmer und Glasperlen wurden dann bei 3000 rpm für 5 min und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein sauberes Reagenzglas überführt und der Proteinextrakt bis zum weiteren Gebrauch auf Eis gekühlt.

5.12.2 „Zirconia-Bead“-Zellaufschluss von Hefezellen

Eine weitere Methode zur Gewinnung von Hefegesamtzellextrakten war der Aufschluss mithilfe von „Zirconia-Beads“. Nach Anzucht in 200 ml Selektivmedium für 20 h wurden die Flüssigkulturen durch mehrmaliges Zentrifugieren bei 4000 rpm und 4°C für 3 min in 50 ml Falcons geerntet. Das so gewonnene Pellet wurde bis zum Aufschluss bei -20°C gelagert. Für den Aufschluss wurden die Zellen in 3 ml 1 x KPP resuspendiert. Die Suspension wurde auf sechs 2 ml Eppendorf-Gefäße verteilt und mit „Zirconia-Beads“ (0,7 mm) so aufgefüllt, dass die „Beads“ gerade noch mit einem Flüssigkeitsfilm bedeckt waren. Zum Aufschluss erfolgte in fünf 1-minütigen Durchgängen auf einem Vortexgerät bei maximaler Geschwindigkeit mit je 1 min Zwischenkühlung auf Eis. Anschließend wurden die Böden der Gefäße mit einer glühenden Kanüle durchstoßen, jedes auf ein Glas-Zentrifugenröhrchen gesetzt und bei 2000 rpm für 2 min bei 4°C zentrifugiert. Der proteinhaltige Durchfluss wurde in ein 2-ml Eppendorf-gefäß überführt und bei 13000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Die so erhaltenen Gesamtzellextrakte wurden entweder sofort verwendet oder bei -20°C gelagert.

5.12.3 Ultraschallaufschluss von *E. coli*-Zellen

Das Prinzip des Ultraschallaufschlusses basiert auf der Ausbreitung von Ultraschallwellen in flüssigem Medium und der daraus resultierenden Bildung von Kavitationsblasen. Das Vorhandensein von Gasbläschen oder Partikeln wie Zellen erleichtern diese Bläschenbildung. Die Kavitationsblasen wachsen bis zu einer kritischen Größe und implodieren anschließend (Neis und Thiem, 1999). Durch diese Implosion entstehen Wirbel und Scherkräfte, die wahrscheinlich für den Aufschluss der Zellen verantwortlich sind (Doulah, 1977).

Zum Zellaufschluss wurde das Gerät Sonopuls GM 70 der Firma Bandelin mit der Sonotrode MS 73 verwendet. *E. coli* BL21-Zellen wurden zunächst über Nacht in 50 ml LB-Medium mit Ampicillin (0,1 mg/ml Endkonzentration) und Chloramphenicol (0,05 mg/ml Endkonzentration) angezogen und anschließend geerntet. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt für mindestens 20 min bei 4000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei -20°C eingefroren oder sofort

aufgeschlossen. Zum Aufschluss wurde das Zellpellet in 2 ml PBS-Puffer resuspendiert und je 1 ml Suspension in 1,5 ml Eppendorfgefäße übergeführt. Der Zellaufschluss erfolgte auf Eis für 3 x 30 sec. mit je 30 sec. Pause bei den Einstellungen Power 72 und Cycle 50%. Die Sonde sollte dabei die Wand des Reaktionsgefäßes nicht berühren. Anschließend wurde der Gesamtzellextrakt 10 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

5.13 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

5.13.1 Proteinbestimmung mit der Mikrobiuret-Methode

Benötigte Lösungen:	Mikrobiuret-Reagenz:	400 ml 1%-ige CuSO ₄ -Lösung
		1,5 l 10 N Natronlauge
	10x KPP:	1 M KH ₂ PO ₄
		1 M K ₂ HPO ₄ pH = 6,5

Die Mikrobiuret-Methode (Zamenhof, 1957) wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration für den β -Galaktosidase-Enzymtest genutzt.

Herstellung der Mikrobiuret-Lösung:

600 g NaOH wurden langsam unter Rühren (auf Eis, unter dem Abzug) in 1,5 l A. dest. gelöst und anschließend mit 400 ml einer 1%-igen Kupfersulfatlösung versetzt. Um den MB-Faktor durch eine Eichkurve zu ermitteln, wurden BSA-Lösungen von 0,2 – 5,0 mg/ml in Wasser hergestellt. Davon wurden jeweils 100 μ l mit 1 ml 1x KPP und 500 μ l Mikrobiuret-Lösung vermischt, 10 min inkubiert und anschließend die Extinktion bei 290 nm gemessen.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 100 μ l Rohextrakt mit 1 ml 1x KPP und 500 μ l Mikrobiuret-Lösung in einem Plastikröhrchen vermischt. Die Extinktion wurde nach einer Inkubation von mind. 10 min bei $\lambda = 290$ nm gegen einen Pufferleerwert (1,1 ml KPP + 500 μ l Mikrobiuret) gemessen. Dieser Wert wurde mit dem ermittelten MB-Faktor multipliziert, um die Proteinkonzentration in mg/ml zu erhalten. Für jeden Proteinextrakt wurden 2 Konzentrationsbestimmungen durchgeführt und die Werte anschließend gemittelt.

5.14 β -Galaktosidase-Enzymtest

Dieser Test wurde nach einer modifizierten Version der Methode nach Guarente (1983) durchgeführt. Die β -Galaktosidase ist ein Enzym aus *E. coli* und ermöglicht die Verwertung von Galaktosiden wie Laktose. Es wird vom *lacZ*-Gen codiert und ist Bestandteil des *lac*-Operons. *lacZ* ist ein standardmäßig verwendetes Reportergen zur Messung der Expressionsstärke von Genen, an welche es durch Translationsfusion gekoppelt wurde. Die β -Galaktosidase katalysiert eine Reaktion, bei der das farblose Substrat ortho-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (oNPG, ein Lactoseanalogon) unter Abspaltung von ortho-Nitrophenol hydrolysiert wird. Dieses liegt im alkalischen Medium als gelbes Phenolat vor und kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 420 nm gemessen werden.

Benötigte Lösungen:

- oNPG-Lösung: 4 mg/ml o-Nitrophenol- β -D-galaktopyranosid in A. dest
- Na₂CO₃: 1 M Natriumcarbonat in A. dest
- Z-Puffer: 60 mM Na₂HPO₄
40 mM NaH₂PO₄
1 mM MgSO₄
10 mM KCl

Zunächst wurden die zu testenden Hefestämme unter den gewünschten Testbedingungen in 5 ml SCD-Selektivmedium angezogen. Zur Zellernte wurden die Kulturen in Zentrifugenröhrchen übergeführt und 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit 5 ml A. dest. gewaschen und anschließend bei -20°C gelagert.

Für den β -Galaktosidase-Test wurde 1 ml Z-Puffer in Zentrifugenröhrchen vorgelegt und mit 100 μ l Rohextrakt versetzt. Bei Einsatz von stark konzentrierten Extrakten mit hohem Gehalt an Reporterenzym wurden die Rohextrakte 1:10 oder 1:20 mit Z-Puffer verdünnt. Die Ansätze wurden für etwa 5 min im Wasserbad auf 30°C temperiert. Der Start des Tests erfolgte durch Zugabe von 200 μ l oNPG-Lösung. Die Reaktion wurde bei deutlicher Gelbfärbung, spätestens aber nach 30 min durch Zugabe von 500 μ l Natriumcarbonat-Lösung gestoppt. Anschließend wurde die Extinktion photometrisch bei 420 nm gegen einen Leerwert (1,1 ml Z-Puffer mit 200 μ l oNPG und 500 μ l Natriumcarbonat-Lösung) gemessen. Von jedem Ansatz wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, deren Messwerte später gemittelt wurden. Zudem wurde der Versuch mindestens dreimal wiederholt.

Die Berechnung der spezifischen β -Galaktosidase-Aktivität (in Units/mg Protein) erfolgte nach dieser

$$\text{Formel: } \text{Spez. Aktivität (in U/mg)} = \frac{1000 \cdot V_T}{V_P \cdot \epsilon \cdot C_P} \cdot \frac{E_{420}}{\Delta t}$$

V_T = Testvolumen

V_P = Probenvolumen

Δt = Testdauer

C_P = Proteinkonzentration in mg/ml ($E_{290} \times \text{MB-Faktor}$)

E_{420} = Extinktion bei 420 nm

ϵ = Extinktionskoeffizient (4,5 cm²/ μ Mol bei 420 nm)

5.15 Heterologe Expression und Aufreinigung von Fusions-Proteinen in *E. coli*

Für GST-Pulldown-Experimente wurden die zu untersuchenden Hefeproteine als Glutathion-S-Transferase-(GST)-Fusionsprodukte in *E. coli* BL21 exprimiert und anschließend affinitätschromatografisch im „batch-Verfahren“ aufgereinigt. Die Affinitätsmatrix bestand aus Sepharose, die kovalent mit Glutathion (GSH), dem Substrat der GST, verknüpft war. So konnten die Fusionsproteine über ihren N-terminalen GST-Anteil an das immobilisierte Glutathion gebunden werden. Durch Zugabe von freiem Glutathion wurden jene wieder von der Matrix abgelöst.

5.15.1 Expression von HA₃-Proteinen

Für die Expression von HA₃-markierten Hefeproteinen in *E. coli* wurden die entsprechenden Leserahmenkassetten aus *Saccharomyces cerevisiae* amplifiziert und in den Expressionsvektor pASK-IBA5-HA-XhoI inseriert. Dieser Vektor besitzt das Gen des HA₃-Tags unter Kontrolle des tetA-Promotors, welcher durch das Tetracyclin-Analogon AHT (Anhydrotetracyclin) induzierbar ist.

Benötigte Lösungen: 2 mg/ml AHT in DMF

Die Expressionsvektoren mit den verschiedenen HA₃-Fusionskonstrukten wurden in *E. coli* BL21 transformiert und über Nacht in Röhrchen mit 6 ml LB-Medium, Ampicillin (EK = 0,1 mg/ml) und Chloramphenicol (EK = 0,05 mg/ml) bei 37°C im Schüttler angezogen.

Am nächsten Tag wurde ca. 1 ml der Vorkultur in Erlenmeyerkolben mit 50 ml YT-G Medium umgesetzt. Bei einer optischen Dichte von 0,4 - 0,6 (gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm) wurde die Expression der HA₃-markierten Proteine durch Zugabe von 10 µl AHT-Lösung induziert. 2 Stunden nach Induktion wurden die Flüssigkulturen in 50 ml Falcons überführt und durch 20-minütige Zentrifugation bei 4°C und 4000 rpm geerntet. Die Pellets wurden bei -20°C gelagert oder in 3 ml PBS resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen.

5.15.2 Expression der GST-Fusionsproteine

Die entsprechenden Leserahmenkassetten aus *Saccharomyces cerevisiae* wurden in den Expressionsvektor pGEX-SCS kloniert. Dieser Vektor ermöglicht die IPTG-induzierte Expression von GST-Fusionsgenen unter Kontrolle des *P_{tac}*-Promotors. Auf dem Plasmid befinden sich weiterhin das *lacI^q*-Gen, welches für den lac-Repressor codiert, Erkennungsstellen für Thrombin zur enzymatischen Abspaltung des GST-Anteils sowie das *Amp^r*-Gen für die Selektion von transformierten Zellen.

Benötigte Lösungen: 100 mM IPTG-Stammlösung

Die pGEX-SCS-Varianten mit den diversen GST-Fusionskonstrukten wurden in *E. coli* BL21 transformiert und über Nacht in Röhrchen mit 6 ml LB-Medium, Ampicillin (EK = 0,1 mg/ml) und Chloramphenicol (EK = 0,05 mg/ml) bei 37°C im Schüttler angezogen.

Am nächsten Tag wurde ca. 1 ml der Vorkultur in Erlenmeyerkolben mit 50 ml YT-G Medium umgesetzt. Bei einer optischen Dichte von 0,4 - 0,6 (gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm) wurde die Expression der GST-Translationsfusionsproteine durch Zugabe von 500 µl 100 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) induziert. 2 Stunden nach Induktion wurden die Flüssigkulturen

in 50 ml Falcons übergeführt und durch 20-minütige Zentrifugation bei 4°C und 4000 rpm geerntet. Die Pellets bei -20°C gelagert oder in 3 ml PBS resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen.

5.15.3 Affinitätschromatografische Aufreinigung der GST-Fusionsproteine im „batch“-Verfahren

Proteine, die sich nach dem Aufschluss im Überstand befanden:

Benötigte Lösungen: Glutathion-Sepharose in 20% Ethanol; Fa. Amersham Biosciences
 20 mM Glutathion (reduziert) in 100 mM Tris/HCl, 200mM NaCl, pH = 8,0

Vor Gebrauch wurde 1 ml der Glutathion-Sepharose mit 10 ml eiskaltem PBS gewaschen, um das aus Haltbarkeitsgründen vom Hersteller zugefügte Ethanol zu entfernen. Nach Zentrifugation und einem erneuten PBS-Waschschritt wurde der Überstand verworfen und die Sepharose in 1 ml PBS aufgenommen. Die so vorbereitete Sepharosematrix konnte bis zu etwa 1 Monat bei 4°C gelagert werden. Die aufgetauten Zellanzuchten mit GST-Fusionsproteinen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen und für 10 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Reagiergefäß pipettiert, mit 80 µl Glutathion-Sepharose vermischt und für mindestens 60 min bei RT auf einem Rotor bewegt, um die Interaktion zwischen dem GST-Anteil der Fusionsproteine und dem Matrix-gebundenen Glutathion zu ermöglichen. Anschließend wurde der Ansatz 1-mal mit 500 µl PBS gewaschen und 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt. Danach wurde dieses Glutathion-Sepharose-Pellet mit dem gebundenen GST-Protein entweder für Interaktionsexperimente weiterverwendet oder das gebundene GST-Protein mit freiem GSH von der Matrix gelöst. Zur Elution wurden 80 µl einer 20 mM Glutathion-Lösung dazugegeben und die Proben für 30 min bei ständiger Durchmischung (vortexen) oder im Thermomixer der Firma Eppendorf bei 1300 rpm und 22°C inkubiert. Die Affinitätsmatrix wurde durch 3-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm sedimentiert und die freigesetzten Proteine in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Es konnte nun eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Blau-Anfärbung zur Expressionskontrolle der GST-Proteine stattfinden.

Proteine, die sich nach dem Aufschluss im Zelltrümmerpellet befanden:

Benötigte Lösungen: Glutathion-Sepharose in 20% Ethanol; Fa. Amersham Biosciences
 20 mM Glutathion (reduziert) in 100 mM Tris/HCl, 200mM NaCl, pH = 8,0
 10% SDS (Natrium-Dodecylsulfat)

Die aufgetauten Zellanzuchten mit GST-Fusionsproteinen wurden wie oben beschrieben mittels Ultraschall aufgeschlossen. Die proteinhaltige Suspension wurde mit 20 µl SDS/ml (Endkonzentration 0,2%) versetzt und für mindestens 2 Stunden bei 4°C auf dem Rotor inkubiert. Durch das Detergenz sollten die Einschlusskörper (Inclusion Bodies), in denen sich die exprimierten Proteine befanden, zerstört werden. Die Zelltrümmer wurden dann durch Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C für 10 min sedimentiert und der Proteinextrakt anschließend mit 80 µl gewaschener Glutathion-Sepharose versetzt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rotor inkubiert. Die nachfolgende Waschung

und das Eluieren erfolgte wie im Absatz zuvor (Proteine, die sich nach dem Aufschluss im Überstand befanden) beschrieben.

5.15.4 Proteinanfärbung mittels Coomassie-Blau

Benötigte Lösungen: Färbelösung: 0,05% Coomassie Brilliant Blue R-250 in A. dest.
 25% Ethanol (96%ig)
 10% Eisessig
 mit A. dest auf 1 l auffüllen
 Entfärber: 25% Ethanol
 10% Eisessig
 mit A. dest auf 1 l auffüllen

Mithilfe der Coomassie-Färbung können Proteine nach Auftrennung durch SDS-PAGE sichtbar gemacht werden. Dazu wurde das Polyacrylamid-Gel mit Färbelösung überschichtet, in der Mikrowelle für ca. 1 min erwärmt und für 10-20 min bei Raumtemperatur auf dem Schwenktisch inkubiert. Durch mehrstündiges Schütteln der gefärbten Gele in Entfärberlösung wurde der Farbstoff, der nicht an die Proteine gebunden hatte, wieder entfernt. Die Proteinbanden konnten im Anschluss auf einem Leuchttisch dokumentiert werden.

5.16 Affinitätschromatografischer GST-Pulldown zum *in vitro*- Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen

Das Prinzip des GST-Pulldown beruht auf einem affinitätschromatografischen Verfahren, bei dem ein Interaktionspartner über eine Translationsfusion an Glutathion-S-Transferase (GST) gekoppelt wird. Der zweite Interaktionspartner wird mit einer N-terminalen Hämagglutinin (HA₃)-Markierung versehen. Das GST-Fusionsprotein wird über den GST-Teil an eine Glutathion-Sepharose-Matrix gebunden. Nach Zugabe des HA₃-Fusionsproteins bleibt jenes im Falle einer Interaktion am Matrix-gebundenen Protein haften. Nach diversen Waschschritten wird mit Glutathion eluiert, wobei die im Überschuss vorliegenden freien Glutathionmoleküle die GST-gekoppelten Proteine kompetitiv von der Matrix verdrängen. Die Proteine werden nun in einer SDS-PAGE aufgetrennt und über einen Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran bzw. PVDF-Membran übertragen. Hat eine Protein-Protein-Interaktion stattgefunden, so ist diese über eine gegen den HA₃-Anteil gerichtete, Enzymgekoppelte Antikörperreaktion nachweisbar.

5.16.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten für affinitätschromatografische GST-Pulldown-Experimente

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten affinitätschromatografischen GST-Pulldown-Experimente wurden unter anderem Gesamtproteinextrakte aus Hefezellen verwendet. Die zu untersuchenden Proteine waren mit dem HA₃-Epitop (Kolodziej *et al.*, 1990) markiert und in den Hefestamm C13-ABYS.86 transformiert. Nach etwa 20-stündiger Anzucht in 200 ml Selektivmedium wurden die Zellen geerntet (3 min 3000 rpm), in 3 ml 1 x KPP resuspendiert, mithilfe von Glasperlen

oder Zirconia Beads aufgeschlossen und nach einem Zentrifugationsschritt (13000 rpm, 10 min, 4°C) im „Pulldown“ eingesetzt. Die Gewinnung von HA₃-Proteinextrakten aus *E. coli* erfolgte mittels Ultraschallaufschluss.

5.16.2 Vorklärung der HA₃-Proteine und Bindungsreaktion

Benötigte Lösungen: SA-125: 40 g Glycerin
30,8 mg DTT
74 mg EDTA
952 mg HEPES
2,46 g Kaliumacetat
2 g NP-40 (IGEPAL)

Glutathion-Sepharose in 20% Ethanol; Fa. Amersham Biosciences

20 mM Glutathion (reduziert): in 100 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, pH = 8,0

Um die einzusetzende Menge an HA₃-Protein-Extrakt abschätzen zu können, wurde die Expression der markierten Proteine zunächst im Western Blot überprüft. Ein Aliquot des Extrakts wurde mit 2 x-Probenpuffer versetzt und als Input-Kontrolle bei -20°C gelagert. In einem Reagiergefäß wurde ein geeignetes Volumen des Rohextraktes mit 300 µl SA-125 und 20 µl PBS-äquibrierter Glutathion-Sepharose versetzt und das Gemisch auf einem Rotor bei 4°C für mindestens 6 h vorgeklärt, um unspezifisch an die Glutathion-Sepharose bindende Proteine abzutrennen. Nach etwa der Hälfte der Zeit wurde der Ansatz für 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reagiergefäß überführt. Es wurden erneut 20 µl Glutathion-Sepharose und 80 µl SA-125 zugegeben und die Vorklärung fortgeführt. Anschließend wurde die Sepharose sedimentiert (3 min 13000 rpm) und der Überstand für die Bindungsreaktion eingesetzt.

Währenddessen wurden die aufgetauten GST-Anzuchten (*E. coli*) mittels Ultraschall aufgeschlossen und für 10 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein Reagiergefäß überführt, mit 80 µl Glutathion-Sepharose vermischt und für mindestens 60 min bei Raumtemperatur auf einem Rotor durchmischt, um die Interaktion zwischen dem GST-Anteil der Fusionsproteine und dem Matrix-gebundenen Glutathion zu ermöglichen. Anschließend wurde der Ansatz 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, einmal mit 500 µl PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Auf die sedimentierte und vom Überstand befreite Sepharose-Matrix mit den gebundenen GST-Proteinen wurde der vorgeklärte HA₃-Proteinextrakt gegeben. Dieser Ansatz wurde auf dem Rotor für etwa 16 - 18 h bei 4°C inkubiert. Hierbei fand die eigentliche *in vitro* Bindungsreaktion zwischen den zu untersuchenden mutmaßlichen Interaktionspartnern statt.

wurde fixiert und eisgekühlt (Kühlakku) in die Transferkammer eingesetzt. Diese wurde mit Transferpuffer befüllt und der Transfer gestartet. Der Proteintransfer erfolgte unter ständiger Durchmischung des Puffers auf dem Magnetrührwerk für 1 h bei einer Spannung von 100 V und 400 mA.

Blot auf PVDF mittels Semi-Dry-Blot:

Um Proteine aus einem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran zu übertragen, wurde eine Transferzelle des Modells Owl Separation Systems der Firma PeqLab verwendet. Bei diesem Modell handelt es sich um eine Semi Dry Blot Anlage, bei der das Whatman-Papier vorher lediglich in Transferpuffer getränkt und dann, ähnlich wie beim Sandwich im Tank Blot, zusammengebaut wird. Die Membran muss vor Benutzung für ca. 15 sec in reinem Methanol aktiviert werden und kann dann auch in Puffer eingelegt werden. Ausgehend von der Kathodenseite wird auch hier folgendermaßen gestapelt: dickes Whatman-Papier, Gel, aktivierte Membran, dickes Whatman-Papier. Überschüssiger Puffer wird entfernt und das obere Whatman-Papier noch einmal mit Puffer beträufelt. Der Transfer läuft dann für 1 h bei 15 V.

5.17.2 Immunologischer Nachweis HA₃-Epitop-markierter Proteine

Für die immunologische Nachweisreaktion wurden Peroxidase-gekoppelte Anti-HA-Antikörper der Firma Roche Diagnostics verwendet.

Benötigte Lösungen:	TBS:	50 mM Tris/HCl; pH 7,5 150 mM NaCl
	Blockierungslösung:	5% Magermilchpulver in TBS
	Antikörper-Lösung:	2,5 bzw. 5 µl Anti-HA-AK in 14 ml TBS
	Blottingsubstrat- Lösung:	Lösung A: 250 mM Luminol in DMSO Lösung B: 90 mM p-Courmarsäure in DMSO Lösung C: 1 M Tris-HCl pH 8,5
		Für 200 ml: 2,0 ml Lösung A 0,89 ml Lösung B 20 ml Lösung C Ad 200 ml A. dest
		Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 35%
		Entwickler-Stammlösung der Firma Tetenal
		Fixierer-Stammlösung der Firma Tetenal

Die folgenden Wasch- und Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur auf einem Schwenktisch durchgeführt. Nachdem die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Transfermembran übertragen wurden, erfolgte ein 10-minütiger Waschschrift mit TBS. Anschließend wurde die Membran in Blockierungslösung gegeben und 60 min inkubiert. Die in der Magermilch enthaltenen Proteine lagerten sich dabei an alle freien Stellen der Membran an, so dass bei der nachfolgenden Antikörperreaktion eine unspezifische Bindung der Anti-HA₃-Antikörper an die Membran verhindert wurde. Die blockierte Membran wurde 2-mal für 10 min mit 1 x TBS gewaschen und anschließend für 150

1 h in Antikörper-Lösung geschwenkt. Nachdem die Antikörper an die HA₃-markierten Proteine gebunden hatten, wurde die Membran 4-mal für 10 min mit TBS gewaschen. Alle weiteren Detektionsschritte wurden in der Dunkelkammer bei minimaler Rotlichtbeleuchtung ausgeführt: Zunächst wurden 4 µl Wasserstoffperoxid mit 10 ml Blottingsubstratlösung gemischt, auf die Membran gegeben und für 1 min inkubiert. An den Stellen, an denen sich ein Immunkomplex gebildet hatte, wurde eine enzymatische Reaktion ausgelöst, die zu einer Lichtemission führt. Schließlich wurde die Membran in Klarsichtfolie eingeschlagen, in eine Entwicklungskammer gelegt und mit einem Röntgenfilm bedeckt. Die Belichtungszeit wurde je nach Emissionsstärke variiert. Die belichteten Filme wurden bis zum Sichtbarwerden der Banden mit Entwickler- und Fixierer-Lösung behandelt, mit A. dest. abgespült und getrocknet.

Alternativ zur Detektion der Banden mittels Röntgenfilm wurde die Chemocam der Firma Intas verwendet. Hierfür wurde die Membran ebenfalls in relativer Dunkelheit (Lichteinwirkungen hatten allerdings keinen Einfluss auf die Reaktion) in 10 ml Blottingsubstratlösung und 4 µl Wasserstoffperoxid für 1 min geschwenkt, anschließend in eine Klarsichtfolie gelegt und in die vorbereitete Chemocam gelegt und mit einer Glasscheibe bedeckt. Zum Scannen wurde das Verfahren des Sequential Integrate verwendet mit 2 min Dauer für 10 Bilder. Dabei wurde alle 2 Minuten die Lichtemission detektiert, summiert und bildlich im entsprechenden Programm (ChemoStar Imager) dargestellt. Nach insgesamt 20 min war die Reaktion abgeschlossen und der Scanvorgang wurde beendet.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

1. Allen, B. L., Taatjes, D. J. (2015) The Mediator complex: a central integrator of transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16: 155-166
2. Ambroziak, J., Henry, S. A. (1994) *INO2* and *INO4* Gene Products, Positive Regulators of Phospholipid Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, Form a Complex That Binds to the *INO1* Promoter. *J Biol Chem*, 269: 15344-15349
3. Andel, F., 3rd, Ladurner, A. G., Inouye, C., Tjian, R., Nogales, E. (1999) Three-dimensional structure of the human TFIID-IIA-IIB complex. *Science*, 286: 2153-2156
4. Archer, C. T., Delahodde, A., Gonzalez, F., Johnston, S. A., Kodadek, T. (2008) Activation domain-dependent monoubiquitylation of Gal4 protein is essential for promoter binding in vivo. *J Biol Chem*, 283: 12614-12623
5. Aref, R. (Dissertation 2014). Comparative analysis of repressor interaction with pleiotropic corepressors Sin3 and Cyc8 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald*.
6. Bagby, S., Kim, S., Maldonado, E., Tong, K. I., Reinberg, D., Ikura, M. (1995) Solution Structure of the C-Terminal Core Domain of Human TFIIB: Similarity to Cyclin A and Interaction with TATA-Binding Protein. *Cell*, 82: 857-867
7. Bagby, S., Mal, T. K., Liu, D., Raddatz, E., Nakatani, Y., Ikura, M. (2000) TFIIA-TAF regulatory interplay: NMR evidence for overlapping binding sites on TBP. *FEBS Letters*, 486: 149-154
8. Bai, Y., Perez, G. M., Beechem, J. M., Weil, P. A. (1997) Structure-Function Analysis of TAF130: Identification and Characterization of a High-Affinity TATA-Binding Protein Interaction Domain in the N Terminus of Yeast TAFII130. *Mol Cell Biol*, 17: 3081-3093
9. Bailis, A. M., Lopes, J. M., Kohlwein, S. D., Henry, S.A. (1992) Cis and trans regulatory elements required for regulation of the *CHO1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 20: 1411-1418
10. Baker, S. P., Grant, P. A. (2007) The SAGA continues: expanding the cellular role of a transcriptional co-activator complex. *Oncogene*, 26: 5329-5340
11. Baptista, T., Grunberg, S., Minoungou, N., Koster, M. J. E., Timmers, H. T. M., Hahn, S., Devys, D., Tora, L. (2017) SAGA Is a General Cofactor for RNA Polymerase II Transcription. *Mol Cell*, 68: 130-143
12. Basehoar, A. D., Pugh, B. F., Zanton, S. J. (2004) Identification and Distinct Regulation of Yeast TATA Box-Containing Genes. *Cell*, 116: 699-709
13. Baumeister W., Walz J., Zühl F., Seemüller E. (1998) The Proteasome: Paradigm of a Self-Compartmentalizing Protease. *Cell*, 92: 367-380
14. Bhat, K. P., Turner, J. D., Myers, S. E., Cape, A. D., Ting, J. P-Y., Greer, S. F. (2008) The 19S proteasome ATPase Sug1 plays a critical role in regulating MHC class II transcription. *Mol Immunol*, 45: 2214-2224
15. Bhaumik, S. R., Green, M. R. (2001) SAGA is an essential *in vivo* target of the yeast acidic activator Gal4p. *Genes Dev*, 15: 1935-1945
16. Bhaumik, S. R., Raha, T., Aiello, D. P., Green, M. R. (2004) *In vivo* target of a transcriptional activator revealed by fluorescence resonance energy transfer. *Genes Dev*, 18: 333-343
17. Birnboim, H. C., Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7: 1513-1523
18. Biswas, D., Imbalzano, A. N., Eriksson, P., Yu, Y., Stillman, D. J. (2004) Role for Nhp6, Gcn5, and the Swi/Snf complex in stimulating formation of the TATA-binding protein-TFIIA-DNA complex. *Mol Cell Biol*, 24: 8312-8321
19. Björklund, S., Gustafsson, C. M. (2004) The mediator complex. *Adv Protein Chem*, 67: 43-65
20. Blackwell, T. K., Weintraub, H. (1990) Differences and Similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science*, 250: 1104-1110
21. Böhm, S., Frishman, D., Mewes, H. W. (1997) Variations of the C2H2 zinc finger motif in the yeast genome and classification of yeast zinc finger proteins. *Nucleic Acids Res*, 25: 2464-2469

22. Bourbon, H. M. (2008) Comparative genomics supports a deep evolutionary origin for the large, four-module transcriptional mediator complex. *Nucleic Acids Res*, 36: 3993-4008
23. Boyer, L. A., Langer, M. R., Crowley, K. A., Tan, S., Denu, J. M., Peterson, C. L. (2002) Essential role for the SANT domain in the functioning of multiple chromatin remodeling enzymes. *Mol Cell*, 10: 935-942
24. Brand, M., Leurent, C., Mallouh, V., Tora, L., Schultz, P. (1999) Three-dimensional structures of the TAFII-containing complexes TFIID and TFTC. *Science*, 286: 2151-2153
25. Broul, C., Chaudhary, S., Davidson, I., Lutz, Y., Wu, J., Egly, J.-M., Tora, L., Chambon, P. (1993) Distinct TFIID complexes mediate the effect of different transcriptional activators. *The EMBO Journal*, 12: 489-499
26. Brown, C. E., Howe, L., Sousa, K., Alley, S. C., Carrozza, M. J., Tan, S., Workman, J. L. (2001) Recruitment of HAT complexes by direct activator interactions with the ATM-related Tra1 subunit. *Science*, 292: 2333-2337
27. Brownell, J. E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D. G., Roth, S. Y., Allis, C. D. (1996) Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell*, 84: 843-851
28. Brzovic, P. S., Heikaus, C. C., Kisselev, L., Vernon, R., Herbig, E., Pacheco D., Warfield L., Littlefield, P., Baker, D., Klevit, R. E., Hahn S. (2011) The acidic transcription activator Gcn4 binds the mediator subunit Gal11/Med15 using a simple protein interface forming a fuzzy complex. *Mol Cell*, 44: 942-953
29. Buratowski, S., Zhou, H. (1993) Functional domains of transcription factor TFIIB. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 5633-5637
30. Cairns, B. R., Lorch, Y., Li, Y., Zhang, M., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Du, J., Laurent, B., Kornberg, R. D. (1996) RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell*, 87: 1249-1260
31. Chalkley, G. E., Verrijzer, C. P. (1999) DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAFII250–TAFII150 complex recognizes the Initiator. *The EMBO Journal*, 18: 4835-4845
32. Chimura, T., Kuzuhara, T., Horikoshi, M. (2002) Identification and characterization of CIA/ASF1 as an interactor of bromodomains associated with TFIID. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 9334-9339
33. Chou, S., Chatterjee, S., Lee, M., Struhl, K. (1999) Transcriptional Activation in Yeast Cells Lacking Transcription Factor IIA. *Genetics*, 153: 1573-1581
34. Chua, P., Roeder, G. S. (1995) Bdf1, a Yeast Chromosomal Protein Required for Sporulation. *Mol Cell Biol*, 15: 3685-3696
35. Ciriacy, M. (1975) Genetics of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Two loci controlling synthesis of the glucose-repressible ADH II. *Mol Gen Genet*, 138: 157-164
36. Clapier, C. R., Cairns, B. R. (2009) The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem*, 78: 273-304
37. Cler, E., Papai, G., Schultz, P., Davidson, I. (2009) Recent advances in understanding the structure and function of general transcription factor TFIID. *Cell Mol Life Sci*, 66: 2123-2134
38. Collins, S. R., Miller, K. M., Maas, N. L., Roguev, A., Fillingham, J., Chu, C. S., Schuldiner, M., Gebbia, M., Recht, J., Shales, M., Ding, H., Xu, H., Han, J., Ingvarsdottir, K., Cheng, B., Andrews, B., Boone, C., Berger, S. L., Hieter, P., Zhang, Z., Brown, G. W., Ingles, C. J., Emili, A., Allis, C. D., Toczyski, D. P., Weissman, J. S., Greenblatt, J. F., Krogan N. J. (2007) Functional dissection of protein complexes involved in yeast chromosome biology using a genetic interaction map. *Nature*, 446: 806-810
39. Cortes, P., Flores, O., Reinberg, D. (1992) Factors Involved in Specific Transcription by Mammalian RNA Polymerase II: Purification and Analysis of Transcription Factor IIA and Identification of Transcription factor III. *Mol Cell Biol*, 12: 413-421
40. Cote, J., Quinn, J., Workman, J. L., Peterson, C. L. (1994) Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science*, 265: 53-60
41. Coulombe, B., Killeen, M., Liljelund, P., Honda, B., Xiao, H., Ingles, C. J., Greenblatt, J. (1992) Identification of three mammalian proteins that bind to the yeast TATA box protein TFIID. *Gene Expression*, 2: 99-110

42. Davie, J. K., Edmondson, D. G., Coco, C. B., Dent, S. Y. (2003) Tup1-Ssn6 interacts with multiple class I histone deacetylases *in vivo*. *J Biol Chem*, 278: 50158-50162
43. DeJong, J., Roeder, R. G. (1993) A single cDNA, hTFIIA/alpha, encodes both the p35 and p19 subunit of human TFIIA. *Genes Dev*, 7: 2220-2234
44. Dettmann, A., Jäschke, Y., Triebel, I., Bogs, J., Schröder, I., Schüller, H. J. (2010) Mediator subunits and histone methyltransferase Set2 contribute to Ino2-dependent transcriptional activation of phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics*, 283: 211-221
45. Dietz, M., Heyken, W.-T., Hoppen, J., Geburtig, S., Schüller, H.-J. (2003) TFIIIB and subunits of the SAGA complex are involved in transcriptional activation of phospholipid biosynthetic genes by the regulatory protein Ino2 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, 48: 1119-1130
46. Dikstein, R., Ruppert, S., Tjian, R. (1996) TAFII 250 Is a Bipartite Protein Kinase That Phosphorylates the Basal Transcription Factor RAP74. *Cell*, 84: 781-790
47. Dimova, D., Nackerdien, Z., Furgeson, S., Eguchi, S., Osley, M. A. (1999) A role for transcriptional repressors in targeting the yeast Swi/Snf complex. *Mol Cell*, 4: 75-83
48. Donczew, R., Warfield, L., Pacheco, D., Erijman, A., Hahn, S. (2020) Two roles for the yeast transcription coactivator SAGA and a set of genes redundantly regulated by TFIID and SAGA. *Elife*, 9
49. Doulah, M. S. (1977) Mechanism of disintegration of biological cells in ultrasonic cavitation. *Biotechnol Bioeng*, 19: 649-660
50. Drysdale, C. M., Jackson, B. M., McVeigh, R., Klebanow, E. R., Bai, Y., Kokubo, T., Swanson, M., Nakatani, Y., Weil, P. A., Hinnebusch A. G. (1998) The Gcn4p Activation Domain Interacts Specifically *In Vitro* with RNA Polymerase II Holoenzyme, TFIID, and the Adap-Gcn5p Coactivator Complex. *Mol Cell Biol*, 18: 1711-1724
51. Durairaj, G., Kaiser, P. (2014) The 26S proteasome and initiation of gene transcription. *Biomolecules*, 4: 827-847
52. Dutta, A., Gogol, M., Kim, J. H., Smolle, M., Venkatesh, S., Gilmore, J., Florens, L., Washburn, M. P., Workman, J. L. (2014) Swi/Snf dynamics on stress-responsive genes is governed by competitive bromodomain interactions. *Genes Dev*, 28: 2314-2330
53. Dynlacht, B. D., Hoey, T., Tjian, R. (1991) Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell*, 66: 563-576
54. Edmondson, D. G., Smith, M. M., Roth, S. Y. (1996) Repression domain of the yeast global repressor Tup1 interacts directly with histones H3 and H4. *Genes Dev*, 10: 1247-1259
55. Erzberger, J. P., Berger, J. M. (2006) Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA proteins. *Annu. Reventuell Biophys. Biomol. Struct.*, 35: 93-114
56. Esposito, M., Sherr, G. L., Esposito, A., Kaluski, G., Ellington, F., Shen, C. H. (2020) Accumulation of unacetylatable Snf2p at the *INO1* promoter is detrimental to remodeler recycling supply for *CUP1* induction. *PLoS One*, 15
57. Feaver, W. J., Gileadi, O., Li, Y., Kornberg, R. D. (1991) CTD kinase associated with yeast RNA polymerase II initiation factor b. *Cell*, 67: 1223-1230
58. Feaver, W. J., Henry, N. L., Bushnell, D. A., Seyre, M. H., Brickner, J. H., Gileadi, O., Kornberg, R. D. (1994) Yeast TFIIIE-Cloning, Expression, and Homology to Vertebrate Proteins. *J Biol Chem*, 269: 27549-27553
59. Ferdous, A., Gonzalez, F., Sun, L., Kodadek, T., Johnston, S. A. (2001) The 19S Regulatory Particle of the Proteasome Is Required for Efficient Transcription Elongation by RNA Polymerase II. *Molecular Cell*, 7: 981-991
60. Ferdous, A., Sikder, D., Gillette, T., Nalley, K., Kodadek, T., Johnston, S. A. (2007) The role of the proteasomal ATPases and activator monoubiquitylation in regulating Gal4 binding to promoters. *Genes Dev*, 21: 112-123
61. Fields, S., Song, O.-K. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340: 245-246
62. Finley, D., Chen, X., Walters, K. J. (2016) Gates, Channels, and Switches: Elements of the Proteasome Machine. *Trends Biochem Sci*, 41: 77-93

63. Flanagan, P. M., Kelleher, R. J., 3rd, Sayre, M. H., Tschochner, H., & Kornberg, R. D. (1991) A mediator required for activation of RNA polymerase II transcription *in vitro*. *Nature*, 350: 436-438
64. Flores, O., Maldonado, E., Reinberg, D. (1989) Factors Involved in Specific Transcription by Mammalian RNA Polymerase II. *J Biol Chem*, 264: 8913-8921
65. Ford, J., Odeyale, O., Shen, C. H. (2008) Activator-dependent recruitment of SWI/SNF and INO80 during *INO1* activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 373: 602-606
66. Freiman, R. N. (2009) Specific variants of general transcription factors regulate germ cell development in diverse organisms. *Biochim Biophys Acta*, 1789: 161-166
67. Friden, P., Schimmel, P. (1988) *LEU3* of *Saccharomyces cerevisiae* Activates Multiple Genes for Branched-Chain Amino Acid Biosynthesis by Binding to a Common Decanucleotide Core Sequence. *Mol Cell Biol*, 8: 2690-2697
68. Fu, J., Hou, J., Liu, L., Chen, L., Wang, M., Shen, Y., Zhang, Z., Bao, X. (2013) Interplay between *BDF1* and *BDF2* and their roles in regulating the yeast salt stress response. *FEBS J*, 280: 1991-2001
69. Fujii-Nakata, T., Ishimi, Y., Okuda, A., Kikuchi, A. (1992) Functional Analysis of Nucleosome Assembly Protein, NAP-1. *J Biol Chem*, 267: 20980-20986
70. Fuller, F. (1982) A family of cloning vectors containing the lacUV5 promoter. *Gene*, 19: 43-54
71. Gangloff, Y. G., Romier, C., Thuault, S., Werten, S., Davidson, I. (2001) The histone fold is a key structural motif of transcription factor TFIID. *Trends Biochem Sci*, 26: 250-257
72. Garbett, K. A., Tripathi, M. K., Cencki, B., Layer, J. H., Weil, P. A. (2007) Yeast TFIID serves as a coactivator for Rap1p by direct protein-protein interaction. *Mol Cell Biol*, 27: 297-311
73. Garcia-Oliver, E., Ramus, C., Perot, J., Arlotto, M., Champleboux, M., Mietton, F., Battail, C., Boland, A., Deleuze, J.-F., Ferro, M., Couté, Y., Govin, J. (2017) Bdf1 Bromodomains Are Essential for Meiosis and the Expression of Meiotic-Specific Genes. *PLoS Genet*, 13
74. Gegonne, A., Devaiah, B. N., Singer, D. S. (2013) TAF7: traffic controller in transcription initiation. *Transcription*, 4: 29-33
75. Geiger, J. H., Hahn, S., Lee, S., Sigler, P. B. (1996) Crystal structure of the yeast TFIIA/TBP/DNA complex. *Science*, 272: 830-836
76. Georgakopoulos, T., Thireos, G. (1992) Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the GCN5 protein to promote normal levels of transcription. *The EMBO Journal*, 11: 4145-4152
77. Gibbons, B. J., Brignole, E. J., Azubel, M., Murakami, K., Voss, N. R., Bushnell, D. A., Asturias, F. J., Kornberg, R. D. (2012) Subunit architecture of general transcription factor TFIIF. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 1949-1954
78. Golderer, G., Gröbner, P. (1991) ADP-ribosylation of core histones and their acetylated subspecies. *Biochem J*, 277: 607-610
79. Gonzalez, F., Delahodde, A., Kodadek, T., Johnston, S. A. (2002) Recruitment of a 19S Proteasome Subcomplex to an Activated Promoter. *Science*, 296: 548-550
80. González-Barrera, S., Prado, F., Verhage, R., Brouwer, J., Aguilera, A. (2002) Defective nucleotide excision repair in yeast *hpr1* and *tho2* mutants. *Nucleic Acids Res*, 30: 2193-2201
81. Grant, P. A., Duggan, L., Coté, J., Roberts, S. M., Brownell, J. E., Candau, R., Ohba, R., Owen-Hughes, T., Allis, C. D., Winston, F., Berger, S. L., Workman, J. L. (1997) Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev*, 11: 1640-1650
82. Greenberg, M. L., Lopes, J. M. (1996) Genetic Regulation of Phospholipid Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, 60: 1-20
83. Grigat, M. (Dissertation 2016). Wechselwirkung genspezifischer Regulatorproteine mit pleiotropen Transkriptionsfaktoren der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. *Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald*.
84. Grigat, M., Jäschke, Y., Kliewe, F., Pfeifer, M., Walz, S., & Schüller, H. J. (2012) Multiple histone deacetylases are recruited by corepressor Sin3 and contribute to gene repression mediated by Opi1 regulator of phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics*, 287: 461-472

85. Grob, P., Cruse, M. J., Inouye, C., Peris, M., Penczek, P. A., Tjian, R., Nogales, E. (2006) Cryo-electron microscopy studies of human TFIIID: conformational breathing in the integration of gene regulatory cues. *Structure*, 14: 511-520
86. Grzenda, A., Lomberk, G., Zhang, J. S., Urrutia, R. (2009) Sin3: master scaffold and transcriptional corepressor. *Biochim Biophys Acta*, 1789: 443-450
87. Guarente, L. (1983) Yeast promoters and lacZ fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods Enzymol*, 101: 181-191
88. Guglielmi, B., van Berkum, N. L., Klapholz, B., Bijma, T., Boube, M., Boschiero, C., Bourbon, H. M., Holstege, F. C., Werner, M. (2004) A high resolution protein interaction map of the yeast Mediator complex. *Nucleic Acids Res*, 32: 5379-5391
89. Güldener, U., Heck, S., Fiedler, T., Beinbauer, J., Hegemann, J. H. (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res*, 24: 2519-2524
90. Guzder, S. N., Sung, P., Bailly, V., Prakash, L., Prakash, S. (1994) RAD25 is a DNA helicase required for DNA repair and RNA polymerase II transcription. *Nature*, 369: 578-581
91. Hahn, S., Young, E. T. (2011) Transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: transcription factor regulation and function, mechanisms of initiation, and roles of activators and coactivators. *Genetics*, 189: 705-736
92. Hampsey, M. (1998) Molecular Genetics of the RNA Polymerase II General Transcriptional Machinery. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 465-503
93. Hanson, P. I., Whiteheart, S. W. (2005) AAA+ proteins: have engine, will work. *Nature*, 6: 519-529
94. Haßlacher, M., Ivessa, A. S., Paltauf, F., Kohlwein, S. D. (1993) Acetyl-coA Carboxylase from Yeast Is an Essential Enzyme and Is Regulated by Factors That Control Phospholipid Metabolism. *J Biol Chem*, 268: 10946-10952
95. Hauk, G., Bowman, G. D. (2011) Structural insights into regulation and action of SWI2/SNF2 ATPases. *Curr Opin Struct Biol*, 21: 719-727
96. He, Y., Fang, J., Taatjes, D. J., Nogales, E. (2013) Structural visualization of key steps in human transcription initiation. *Nature*, 495: 481-486
97. Henry S. A., Patton-Vogt J. L. (1998) Genetic regulation of phospholipid metabolism: yeast as a model eukaryote. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 61: 133-179
98. Henry, N. L., Campbell, A. M., Feaver, W. I., Poon, D., Weil, P. A., Kornberg, R. D. (1994) TFIIF-TAF-RNA polymerase II connection. *Genes Dev*, 8: 2868-2878
99. Herbig, E., Warfield, L., Fish, L., Fishburn, J., Knutson, B. A., Moorefield, B., Pacheco, D., Hahn, S. (2010) Mechanism of Mediator recruitment by tandem Gcn4 activation domains and three Gal11 activator-binding domains. *Mol Cell Biol*, 30: 2376-2390
100. Heyken, W.-T., Repenning, A., Kumme, J., Schüller, H.-J. (2005) Constitutive expression of yeast phospholipid biosynthetic genes by variants of Ino2 activator defective for interaction with Opi1 repressor. *Mol Microbiol*, 56: 696-707
101. Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lücking, R., Lumbsch, T. H., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., Vilgalys, R., Aime, M. C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G. L., Castlebury, L. A., Crous, P. W., Dai, Y. C., Gams, W., Geiser, D. M., Griffith, G. W., Gueidan, C., Hawksworth, D. L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R. A., Hyde, K. D., Ironside, J. E., Kõljalg, U., Kurtzman, C. P., Larsson, K. H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J. M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J. D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J. P., Schüssler, A., Sugiyama, J., Thorn, R. G., Tibell, L., Untereiner, W. A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M. M., Winka, K., Yao, Y. J., Zhang, N. (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res*, 111: 509-547
102. Hiesinger, M., Wagner, C., Schüller, H.-J. (1997) The acetyl-CoA synthetase gene ACS2 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is coregulated with structural genes of fatty acid biosynthesis by the transcriptional activators Ino2p and Ino4p. *FEBS Letters*, 415: 16-20

103. Hintze, S. (Dissertation 2014). Interaktion genereller Transkriptionsfaktoren mit dem Aktivator Ino2 der Phospholipid- Biosynthese in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. *Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald*.
104. Hintze, S., Engelhardt, M., van Diepen, L., Witt, E., Schüller, H.-J., (2017) Multiple Taf subunits of TFIID interact with Ino2 activation domains and contribute to expression of genes required for yeast phospholipid biosynthesis. *Mol Microbiol* 106: 876-890
105. Hoffman, C. S., Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57: 267-272
106. Hoshizaki, D. K., Hill, J. E., Henry, S. A. (1990) The *Saccharomyces cerevisiae* *INO4* Gene Encodes a Small, Highly Basic Protein Required for Derepression of Phospholipid Biosynthetic Enzymes. *J Biol Chem*, 265: 4736-4745
107. Huang, M., Zhou, Z., Elledge, S. J. (1998) The DNA Replication and Damage Checkpoint Pathways Induce Transcription by Inhibition of the Crt1 Repressor. *Cell*, 94: 595-605
108. Husinga, K. L., Pugh, B. F. (2004) A genome-wide housekeeping role for TFIID and a highly regulated stress-related role for SAGA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell*, 13: 573-585
109. Imbalzano, A. N., Zaretz, K. S., Kingston, R. E. (1994) Transcription Factor (TF) IIB and TFIIA Can Independently Increase the Affinity of the TATA-binding Protein for DNA. *J Biol Chem*, 269: 8280-8286
110. Inostroza-Nieves, Y., Venkatraman, P., Zavala-Ruiz, Z. (2012) Role of Sug1, a 19S proteasome ATPase, in the transcription of MHC I and the atypical MHC II molecules, HLA-DM and HLA-DO. *Immunol Lett*, 147: 67-74
111. Iraqui, I., Vissers, S., André, B., Urrestarazu, A. (1999) Transcriptional Induction by Aromatic Amino Acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 19: 3360-3371
112. Ito, M., Yuan, C. X., Okano, H. J., Darnell, R. B., Roeder, R. G. (2000) Involvement of the TRAP220 component of the TRAP/SMCC coactivator complex in embryonic development and thyroid hormone action. *Mol Cell*, 5: 683-693
113. Jacobson, R. H., Ladurner, A. G., King, D. S., Tjian, R. (2000) Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science*, 288: 1422-1425
114. James, P., Halladay, J., Craig, E. A. (1996) Genomic Libraries and a Host Strain Designed for Highly Efficient Two-Hybrid Selection in Yeast. *Genetics*, 144: 1425-1436
115. James, P., Halladay, J., Craig, E. A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, 144: 1425-1436
116. Jäschke, Y., Schwarz, J., Clausnitzer, D., Muller, C., Schüller, H. J. (2011) Pleiotropic corepressors Sin3 and Ssn6 interact with repressor Opi1 and negatively regulate transcription of genes required for phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics*, 285: 91-100
117. Jedidi, I., Zhang, F., Qiu, H., Stahl, S. J., Palmer, I., Kaufman, J. D., Nadaud, P. S., Mukherjee, S., Wingfield, P. T., Jaroniec, C. P., Hinnebusch, A. G. (2010) Activator Gcn4 employs multiple segments of Med15/Gal11, including the KIX domain, to recruit mediator to target genes in vivo. *J Biol Chem*, 285: 2438-2455
118. Jesch, S. A., Zhao, X., Wells, M. T., Henry, S. A. (2005) Genome-wide analysis reveals inositol, not choline, as the major effector of Ino2p-Ino4p and unfolded protein response target gene expression in yeast. *J Biol Chem*, 280: 9106-9118
119. John, S., Howe, L., Tafrov, S. T., Grant, P. A., Sternglanz, R., Workman, J. L. (2000) The Something About Silencing protein, Sas3, is the catalytic subunit of NuA3, a γ TAFII30-containing HAT complex that interacts with the Spt16 subunit of the yeast CP (Cdc68/Pob3)-FACT complex. *Genes Dev*, 14: 1196-1208
120. Joliot, V., Demma, M., Prywes, R. (1995) Interaction with RAP74 subunit of TFIIF is required for transcriptional activation by serum response factor. *Nature*, 373: 632-635
121. Jonker, H. R. A., Wechselberger, R. W., Boelens, R., Folkers, G. E., Kaptein, R. (2005) Structural Properties of the Promiscuous VP16 Activation Domain. *Biochemistry*, 44: 827-839

122. Kadonaga, J. T. (2004) Regulation of RNA Polymerase II Transcription by Sequence-Specific DNA Binding Factors. *Cell*, 116: 247-257
123. Kadosh, D., Struhl, K. (1997) Repression by Ume6 Involves Recruitment of a Complex Containing Sin3 Corepressor and Rpd3 Histone Deacetylase to Target Promoters. *Cell*, 89: 365-371
124. Kasten, M. M., Dorland, S., Stillman, D. J. (1997) A Large Protein Complex Containing the Yeast Sin3p and Rpd3p Transcriptional Regulators. *Mol Cell Biol*, 17: 4852-4858
125. Kelleher, R. J., 3rd, Flanagan, P. M., Kornberg, R. D. (1990) A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus. *Cell*, 61: 1209-1215
126. Kim, J. H., Saraf, A., Florens, L., Washburn, M., Workman, J. L. (2010) Gcn5 regulates the dissociation of SWI/SNF from chromatin by acetylation of Swi2/Snf2. *Genes Dev*, 24: 2766-2771
127. Kim, J. L., Nikolov, D. B., Burley, S. K. (1993) Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of a TATA element. *Nature*, 365: 520-527
128. Kim, Y. C., Li, X., Thompson, D., DeMartino, G. N. (2013) ATP binding by proteasomal ATPases regulates cellular assembly and substrate-induced functions of the 26 S proteasome. *J Biol Chem*, 288: 3334-3345
129. Kliewe F., Engelhardt M., Aref R., Schüller H. J., (2017) Promoter recruitment of corepressors Sin3 and Cyc8 by activator proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*. 63: 739-750
130. Kliewe, F. (Dissertation 2013). Interaktion des Repressors Opi1 der Phospholipid-Biosynthese mit Regulatoren des Phosphat-Stoffwechsels und pleiotropen Corepressoren in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. *Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald*.
131. Klug, A., Schwabe, J. W. (1995). Protein motifs 5. Zinc fingers. *FASEB J*, 9: 597-604
132. Kodaki, T., Hosaka, K., Nikawa, J., Yamashita, S. (1991) Identification of the upstream activation sequences responsible for the expression and regulation of the *PEM1* and *PEM2* genes encoding the enzymes of the phosphatidylethanolamine methylation pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem*, 109: 276-287
133. Kokubo, T., Swanson, M. J., Nishikawa, J.-I., Hinnebusch, A. G., Nakatani, Y. (1998) The Yeast TAF145 Inhibitory Domain and TFIIA Competitively Bind to TATA-Binding Protein. *Mol Cell Biol*, 18: 1003-1012
134. Kokubo, T., Takada, R., Yarnashita, S., Gong, D.-W., Roeders, R. G., Horikoshi, M., Nakatani, Y. (1993) Identification of TFIIID Components Required for Transcriptional Activation by upstream Stimulatory Factor. *J Biol Chem*, 268: 17554-17556
135. Kokubo, T., Yamashita, S., Horikoshi, M., Roeder, R. G., Nakatani, Y. (1994) Interaction between the N-terminal domain of the 230-kDa subunit and the TATA box-binding subunit of TFIIID negatively regulates TATA-box binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 3520-3524
136. Kolodziej, P. A., Woychik, N., Liao, S. M., Young, R. A. (1990) RNA polymerase II subunit composition, stoichiometry, and phosphorylation. *Mol Cell Biol*, 10: 1915-1920
137. Komachi, K., Johnson, A. D. (1997) Residues in the WD Repeats of Tup1 Required for Interaction with alpha2. *Mol Cell Biol*, 17: 6023-6028
138. Koonin, E. V., Aravind, L., Leipe, D.D., Iyer, L. M. (2004) Evolutionary history and higher order classification of AAA ATPases. *J. Struct. Biol.* 146: 11-31
139. Kormanitsky, P. B., Klebanow, E. R., Weil, P. A., Denis, C. L. (1998) ADR1-Mediated Transcriptional Activation Requires the Presence of an Intact TFIIID Complex. *Mol Cell Biol*, 18: 5861-5867
140. Kostrewa, D., Zeller, M. E., Armache, K. J., Seizl, M., Leike, K., Thomm, M., Cramer, P. (2009) RNA polymerase II-TFIIIB structure and mechanism of transcription initiation. *Nature*, 462: 323-330
141. Kotani, T., Banno, K., Ikura, M., Hinnebusch, A. G., Nakatani, Y., Kawaiichi, M., Kokubo, T. (2000) A role of transcriptional activators as antirepressors for the autoinhibitory activity of TATA box binding of transcription factor IID. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 7178-7183
142. Kotani, T., Miyake, T., Tsukihashi, Y., Hinnebusch, A. G., Nakatani, Y., Kawaiichi, M., Kokubo, T. (1998) Identification of Highly Conserved Amino-terminal Segments of dTAFII230 and yTAFII145 That Are Functionally Interchangeable for Inhibiting TBP-DNA Interactions *in vitro* and in Promoting Yeast Cell Growth *in vivo*. *J Biol Chem*, 273: 32254-32264

143. Kraemer, S. M., Goldstrohm, D. A., Berger, A., Hankey, S., Rovinsky, S. A., Scott Moye-Rowley, W., Stargell, L. A. (2006) TFIIA plays a role in the response to oxidative stress. *Eukaryot Cell*, 5: 1081-1090
144. Kraemer, S. M., Ranallo, R. T., Ogg, R. C., Stargell, L. A. (2001) TFIIA interacts with TFIID via association with TATA-binding protein and TAF40. *Mol Cell Biol*, 21: 1737-1746
145. Kumme, J., Dietz, M., Wagner, C., Schüller, H. J. (2008) Dimerization of yeast transcription factors Ino2 and Ino4 is regulated by precursors of phospholipid biosynthesis mediated by Opi1 repressor. *Curr Genet*, 54: 35-45
146. Kuras, L., Kosa, P., Mencia, M., Struhl, K. (2000) TAF-Containing and TAF-independent forms of transcriptionally active TBP *in vivo*. *Science*, 288: 1244-1248
147. Kurdistani, S. K., Grunstein, M. (2003) Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 276-284
148. Kwon, H., Imbalzano, A. N., Khavari, P. A., Kingston, R. E., Green, M. R. (1994) Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SW1/SNF complex. *Nature*, 370: 477-481
149. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 22: 680-685
150. Lagrange, T., Kapanidis, A. N., Tang, H., Reinberg, D., Ebright, R. H. (1997) New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev*, 12: 34-44
151. Landschulz, W. H., Johnson, P. F., McKnight, S. L. (1988) The Leucine Zipper: A Hypothetical Structure Common to a New Class of DNA Binding Proteins. *Science*, 240: 1759-1764
152. Lariviere, L., Seizl, M., Cramer, P. (2012) A structural perspective on Mediator function. *Curr Opin Cell Biol*, 24: 305-313
153. Lassot, I., Latreille, D., Rousset, E., Sourisseau, M., Linares, L. K., Chable-Bessia, C., Coux, O., Benkirane, M., Kiernan, R. E. (2007) The proteasome regulates HIV-1 transcription by both proteolytic and nonproteolytic mechanisms. *Mol Cell*, 25: 369-383
154. Lee, D., Ezhkova, E., Li, B., Pattenden, S. G., Tansey, W. P., Workman, J. L. (2005) The proteasome regulatory particle alters the SAGA coactivator to enhance its interactions with transcriptional activators. *Cell*, 123: 423-436
155. Lee, K. K., Sardiu, M. E., Swanson, S. K., Gilmore, J. M., Torok, M., Grant, P. A., Florens, L., Workman, J. L., Washburn, M. P. (2011) Combinatorial depletion analysis to assemble the network architecture of the SAGA and ADA chromatin remodeling complexes. *Mol Syst Biol*, 7: 503
156. Lee, M., Chatterjee, S., Struhl, K. (2000) Genetic Analysis of the Role of Pol II Holoenzyme Components in Repression by the Cyc8-Tup1 Corepressor in Yeast. *Genetics*, 155: 1535-1542
157. Lee, T. I., Causton, H. C., Holstege, F. C. P., Shenk, W.-C., Hannett, N., Jennings, E. G., Winston, F., Greenk, M. R., Young, R. A. (2000) Redundant roles for the TFIID and SAGA complexes in global transcription. *Nature*, 405: 701-704
158. Leurent, C., Sanders, S. L., Demény, M. A., Garbett, K. A., Ruhlmann, C., Weil, P. A., Tora, L., Schultz, P. (2004) Mapping key functional sites within yeast TFIID. *The EMBO Journal*, 23: 719-727
159. Li, Y., Björklund, S., Jiang, Y. W., Kim, Y.-J., Lane, W. S., Stillman, D. J., Kornberg, R. D. (1995) Yeast global transcriptional regulators Sin4 and Rgr1 are components of mediator complex/RNA polymerase II holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 10864-10868
160. Lim, M. K., Tang, V., Le Saux, A., Schuller, J., Bongards, C., Lehming, N. (2007) Gal11p dosage-compensates transcriptional activator deletions via Taf14p. *J Mol Biol*, 374: 9-23
161. Lin, A., Du, Y., Xiao, W. (2020) Yeast chromatin remodeling complexes and their roles in transcription. *Curr Genet*, 66: 657-670
162. Lin, L., Chamberlain, L., Zhu, L. J., Green, M. R. (2012) Analysis of Gal4-directed transcription activation using Tra1 mutants selectively defective for interaction with Gal4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 1997-2002

163. Liu, D., Ishima, R., Tong, K. I., Bagby, S., Kokubo, T., Muhandiram, D. R., Kay, L. E., Nakatani, Y., Ikura, M. (1998) Solution Structure of a TBP-TafII230 Complex: Protein Mimicry of the Minor Groove Surface of the TATA Box Unwound by TBP. *Cell*, 94: 573-583
164. Liu, N., Balliano, A., Hayes, J. J. (2011) Mechanism(s) of SWI/SNF-induced nucleosome mobilization. *Chembiochem*, 12: 196-204
165. Liu, W. L., Coleman, R. A., Ma, E., Grob, P., Yang, J. L., Zhang, Y., Dailey, G., Nogales, E., Tjian, R. (2009) Structures of three distinct activator-TFIID complexes. *Genes Dev*, 23: 1510-1521
166. Lo, W.-S., Gamache, E. R., Henry, K. W., Yang, D., Pillus, L., Berger, S. L. (2005) Histone H3 phosphorylation can promote TBP recruitment through distinct promoter-specific mechanisms. *The EMBO Journal*, 24: 997-1008
167. Loewen, C. J., Gaspar, M. L., Jesch, S. A., Delon, C., Ktistakis, N. T., Henry, S. A., Levine, T. P. (2004) Phospholipid metabolism regulated by a transcription factor sensing phosphatidic acid. *Science*, 304: 1644-1647
168. Loewen, C. J., Roy, A., Levine, T. P. (2003) A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP. *EMBO J*, 22: 2025-2035
169. Lohr, D., Venkov, P., Zlatanova, J. (1995) Transcriptional regulation in the yeast GAL gene family: a complex genetic network. *FASEB J*, 9: 777-787
170. Lopes, J. M., Hirsch, J. P., Chorgo, P. A., Schulze K. L., Henry, S. A. (1991) Analysis of sequences in the *INO1* promoter that are involved in its regulation by phospholipid precursors. *Nucleic Acids Res*, 19: 1687-1693
171. Luger, K., Rechsteiner, T. J., Flaus, A. J., Wayne, M. M., Richmond, T. J. (1997) Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. *J Mol Biol*, 272: 301-311
172. Luger, K., Richmond, T. J. (1998a) DNA binding within the nucleosome core. *Curr Opin Struct Biol*, 8: 33-40
173. Luger, K., Richmond, T. J. (1998b). The histone tails of the nucleosome. *Curr Opin Genet Dev*, 8: 140-146
174. Lupas, A. N., Frickey, T. (2004) Phylogenetic analysis of AAA proteins. *J. Struct. Biol.* 146: 2-10
175. Ma, D., Watanabe, H., Mermelstein, F., Admon, A., Oguri, K., Sun, X., Wada, T., Imai, T., Shiroya, T., Reinberg, D., Handa, H. (1993) Isolation of a cDNA encoding the largest subunit of TFIIA reveals functions important for activated transcription. *Genes Dev*, 7: 2246-2257
176. Magbanua, J. P., Ogawa, N., Harashima, S., Oshima, Y. (1997) The transcriptional activators of the PHO regulon, Pho4p and Pho2p, interact directly with each other and with components of the basal transcription machinery in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem*, 121: 1182-1189
177. Mal, T. K., Masutomi, Y., Zheng, L., Nakata, Y., Ohta, H., Nakatani, Y., Kokubo, T., Tikura, M. (2004) Structural and functional characterization on the interaction of yeast TFIID subunit TAF1 with TATA-binding protein. *J Mol Biol*, 339: 681-693
178. Malavé T. M., Dent, S. Y. R. (2006) Transcriptional repression by Tup1-Ssn6. *Biochem Cell Biol*, 84: 437-443
179. Maldonado, E., Ha, I., Cortes, P., Weis, L., Reinberg, D. (1990) Factors Involved in Specific Transcription by Mammalian RNA Polymerase II: Role of Transcription Factors IIA, IID, and IIB during Formation of a Transcription-Competent Complex. *Mol Cell Biol*, 10: 6335-6347
180. Matangkasombut, O., Buratowski, R. M., Swilling, N. W., Buratowski, S. (2000) Bromodomain factor 1 corresponds to a missing piece of yeast TFIID. *Genes Dev*, 14: 951-962
181. Maxon, M. E., Goodrich, J. A., Tjian, R. (1994) Transcription factor HE binds preferentially to RNA polymerase IIa and recruits TFIID: a model for promoter clearance. *Genes Dev*, 8: 515-524
182. Meisterernst, M., Roeder, R. G. (1991) Family of proteins that interact with TFIID and regulate promoter activity. *Cell*, 67: 557-567
183. Mencia, M., Struhl, K. (2001) Region of yeast TAF 130 required for TFIID to associate with promoters. *Mol Cell Biol*, 21: 1145-1154

184. Mennella, T. A., Klinkenberg, L. G., Zitomer, R. S. (2003) Recruitment of Tup1-Ssn6 by yeast hypoxic genes and chromatin-independent exclusion of TATA binding protein. *Eukaryot Cell*, 2: 1288-1303
185. Mizzen, C. A., Yang, X.-J., Kokubo, T., Brownell, J. E., Bannister, A. J., Owen-Hughes, T., Workman, J., Wang, L., Berger, S. L., Kouzarides, T., Nakatani, Y., Allis, C. D. (1996) The TAFII250 Subunit of TFIID Has Histone Acetyltransferase Activity. *Cell*, 87: 1261-1270
186. Moqtaderi, Z., Yale, J. D., Struhl, K., Buratowski, S. (1996) Yeast homologues of higher eukaryotic TFIID subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 14654-14658
187. Morrison, A. J., Highland, J., Krogan, N. J., Arbel-Eden, A., Greenblatt, J. F., Haber, J. E., Shen, X. (2004) INO80 and gamma-H2AX interaction links ATP-dependent chromatin remodeling to DNA damage repair. *Cell*, 119: 767-775
188. Müller, F., Zaucker, A., Tora, L. (2010) Developmental regulation of transcription initiation: more than just changing the actors. *Curr Opin Genet Dev*, 20: 533-540
189. Mullis, K. B., Faloona, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155: 335-350
190. Mumberg, D., Müller, R., Funk, M. (1994) Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Res*, 22: 5767-5768
191. Nasmyth, K., Stillman, D., Kipling, D. (1987) Both positive and negative regulators of HO transcription are required for mother-cell-specific mating-type switching in yeast. *Cell*, 48: 579-587
192. Natarajan, K., Jackson, B. M., Zhou, H., Winston, F., Hinnebusch, A. G. (1999) Transcriptional Activation by Gcn4p Involves Independent Interactions with the SWI/SNF Complex and the SRB/Mediator. *Molecular Cell*, 4: 657-664
193. Nathan, D., Sterner, D. E., Berger, S. L. (2003) Histone modifications: Now summoning sumoylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 13118-13120
194. Neely, K. E., Hassan, A. H., Brown, C. E., Howe, L., Workman, J. L. (2002) Transcription activator interactions with multiple SWI/SNF subunits. *Mol Cell Biol*, 22: 1615-1625
195. Neely, K. E., Hassan, A. H., Wallberg, A. E., Steger, D. J., Cairns, B. R., Wright, A. P. H., Workman, J. L. (1999) Activation Domain-Mediated Targeting of the SWI/SNF Complex to Promoters Stimulates Transcription from Nucleosome Arrays. *Molecular Cell*, 4: 649-655
196. Neis, D., Thiem, A. (1999) Ultrasound in wastewater and sludge treatment. Ultrasound in environmental engineering. *GFEU, Hamburg*, 1: 39-61
197. Ng, H. H., Bird, A. (2000) Histone deacetylases: silencers for hire. *Trends Biochem Sci* 25: 121-126
198. Nikoloff, D. M., McGraw, P., Henry, S. A. (1992) The *INO2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a helix-loop-helix protein that is required for activation of phospholipid synthesis. *Nucleic Acids Res*, 20: 3253
199. Nikolov, D. B., Burley, S. K. (1997) RNA polymerase II transcription initiation: A structural view. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 15-22
200. Norton, V. G., Imai, B. S., Yau, P., Bradbury, E. M. (1989) Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number change. *Cell*, 57: 449-457
201. Norton, V. G., Marvin, K. W., Yau, P., Bradbury, E. M. (1990) Nucleosome Linking Number Change Controlled by Acetylation Histones H3 and H4. *J Biol Chem*, 265: 19848-19852
202. Nowak, S. J., Corces, V. G. (2004) Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet*, 20: 214-220
203. O'Brien, T., Tjian, R. (1998) Functional analysis of the human TAFII250 N-terminal kinase domain. *Mol Cell*, 1: 905-911
204. Ohkuma, Y., Sumimoto, H., Hoffmann, A., Shimasaki, S., Horikoshi, M., Roeder, R. G. (1991) Structural motifs and potential sigma homologies in the large subunit of human general transcription factor TFIIE. *Nature*, 354: 398-401
205. Osley, M. A. (2004) H2B ubiquitylation: the end is in sight. *Biochim Biophys Acta*, 1677: 74-78

206. Ozer, J., Lezina, L. E., Ewing, J., Audi, S., Lieberman, P. M. (1998) Association of Transcription Factor IIA with TATA Binding Protein Is Required for Transcriptional Activation of a Subset of Promoters and Cell Cycle Progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 18: 2559-2570
207. Pacheco, D., Warfield, L., Brajich, M., Robbins, H., Luo, J., Ranish, J., Hahn, S. (2018) Transcription Activation Domains of the Yeast Factors Met4 and Ino2: Tandem Activation Domains with Properties Similar to the Yeast Gcn4 Activator. *Mol Cell Biol*, 38
208. Papai, G., Tripathi, M. K., Ruhlmann, C., Layer, J. H., Weil, P. A., Schultz, P. (2010) TFIIA and the transactivator Rap1 cooperate to commit TFIID for transcription initiation. *Nature*, 465: 956-960
209. Papai, G., Weil, P. A. Schultz, P. (2011) New insights into the function of transcription factor TFIID from recent structural studies. *Curr Opin Genet Dev*, 21: 219-224
210. Papamichos-Chronakis, M., Conlan, R. S., Gounalaki, N., Copf, T., Tzamarias, D. (2000) Hrs1/Med3 is a Cyc8-Tup1 corepressor target in the RNA polymerase II holoenzyme. *J Biol Chem*, 275: 8397-8403
211. Papamichos-Chronakis, M., Ktistaki, E., Topalidou, I., Petrakis, T., Tzamarias, D. (2002) Cti6, a PHD Domain Protein, Bridges the Cyc8-Tup1 Corepressor and the SAGA Coactivator to Overcome Repression at *GAL1*. *Molecular Cell*, 9: 1297-1305
212. Park, J. M., Kim, H.-S., Han, S. J., Hwang, M.-S., Lee, Y. C., Kim, Y.-J. (2000) *In Vivo* Requirement of Activator-Specific Binding Targets of Mediator. *Mol Cell Biol*, 20: 8709-8719
213. Patel, A. B., Louder, R. K., Greber, B. J., Grunberg, S., Luo, J., Fang, J., Liu, Y., Ranish, J., Hahn, S., Nogales, E. (2018) Structure of human TFIID and mechanism of TBP loading onto promoter DNA. *Science*, 362
214. Patton-Vogt, J. L., Henry, S. A. (1998) GIT1, a Gene Encoding a Novel Transporter for Glycerophosphoinositol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 149: 1707-1715
215. Peterson, C. L., Herskowitz, I. (1992) Characterization of the yeast SWI1, SWI2, and SWI3 genes, which encode a global activator of transcription. *Cell*, 68: 573-583
216. Peterson, C. L., Workman, J. L. (2000) Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr Opin Genet Dev*, 10: 187-192
217. Poon, D., Weil, P. A. (1993) Immunopurification of Yeast TATA-binding Protein and Associated Factors. *J Biol Chem*, 268: 15325-15328
218. Prochasson, P., Neely, K. E., Hassan, A. H., Li, B., Workman, J. L. (2003) Targeting activity is required for SWI/SNF function *in vivo* and is accomplished through two partially redundant activator-interaction domains. *Mol Cell*, 12: 983-990
219. Proft, M., Pacual-Ahuir, A., Nadal, E. d., Arino, J., Serrano, R., Posas, F. (2001) Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *The EMBO Journal*, 20: 1123-1133
220. Proft, M., Struhl, K. (2002) Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Mol Cell*, 9: 1307-1317
221. Ranish, J. A., Lane, W. S., Hahn, S. (1992) Isolation of two genes that encode subunits of the yeast transcription factor IIA. *Science*, 255: 1127-1129
222. Reese, J. C., Apone, L., Walker, S. S., Griffin, L. A., Green, M. R. (1994) Yeast TAFIIS in a multisubunit complex required for activated transcription. *Nature*, 371: 523-527
223. Rhee, H. S., Pugh, B. F. (2012) Genome-wide structure and organization of eukaryotic pre-initiation complexes. *Nature*, 483: 295-301
224. Roberts, S. G., Green, M. R. (1994) Activator-induced conformational change in general transcription factor TFIIB. *Nature*, 371: 717-720
225. Rothstein, R. (1991) Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast. *Methods Enzymol*, 194: 281-301
226. Rubin, D. M., Coux, O., Wefes, I., Hengartner, C., Young, R. A., Goldberg, A. L., Finley, D. (1996) Identification of the gal4 suppressor Sug1 as a subunit of the yeast 26S proteasome. *Nature*, 379: 655-657
227. Ruiz-Garcia, A. B., Sendra, R., Pamblanco, M., Tordera, V. (1997) Gcn5p is involved in the acetylation of histone H3 in nucleosomes. *FEBS J*, 403: 186-190

228. Russell, S. J., Johnston, S. A. (2001) Evidence that proteolysis of Gal4 cannot explain the transcriptional effects of proteasome ATPase mutations. *J Biol Chem*, 276: 9825-9831
229. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491
230. Sainsbury, S., Bernecky, C., Cramer, P. (2015) Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16: 129-143
231. Sanders, S. L., Garbett, K. A., Weil, P. A. (2002) Molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* TFIID. *Mol Cell Biol*, 22: 6000-6013
232. Santiago, T. C., Mamoun, C. B. (2003) Genome expression analysis in yeast reveals novel transcriptional regulation by inositol and choline and new regulatory functions for Opi1p, Ino2p, and Ino4p. *J Biol Chem*, 278: 38723-38730
233. Sauer, B. (1987) Functional Expression of the cre-lox Site-Specific Recombination System in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 7: 2087-2096
234. Saunders, A., Core, L. J., Lis, J. T. (2006) Breaking barriers to transcription elongation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7: 557-567
235. Schjerling, P., Holmberg, S. (1996) Comparative amino acid sequence analysis of the C6 zinc cluster family of transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res*, 24: 4599-4607
236. Schüller, H. J., Richter, K., Hoffmann, B., Ebbert, R., Schweizer, E. (1995) DNA binding site of the yeast heteromeric Ino2p/Ino4p basic helix-loop-helix transcription factor: structural requirements as defined by saturation mutagenesis. *FEBS Lett*, 370: 149-152
237. Schüller, H.-J., Hahn, A., Troster, F., Schütz, A., Schweizer, E. (1992a) Coordinate genetic control of yeast fatty acid synthase genes *FAS1* and *FAS2* by an upstream activation site common to genes involved in membrane lipid biosynthesis. *The EMBO Journal*, 11: 107-114
238. Schüller, H.-J., Schorr, R., Hoffmann, B., Schweizer, E. (1992b) Regulatory gene *INO4* of yeast phospholipid biosynthesis is positively autoregulated and functions as a trans- activator of fatty acid synthase genes *FAS1* and *FAS2* from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 20: 5955-5961
239. Schwank, S., Ebbert, R., Rautenstraub, K., Schweizer, E., Schüller, H.-J. (1995) Yeast transcriptional activator *INO2* interacts as an Ino2p/Ino4p basic helix-loop-helix heteromeric complex with the inositol/choline responsive element necessary for expression of phospholipid biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 23: 230-237
240. Sikorski, R. S., Boguski, M. S., Goebel, M., Hieter, P. (1990) A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis. *Cell*, 60: 307-317
241. Silverstein, R. A., Ekwall, K. (2005) Sin3: a flexible regulator of global gene expression and genome stability. *Curr Genet*, 47: 1-17
242. Smith, C. L., Horowitz-Scherer, R., Flanagan, J. F., Woodcock, C. L., Peterson, C. L. (2003) Structural analysis of the yeast SWI/SNF chromatin remodeling complex. *Nat Struct Biol*, 10: 141-145
243. Smith, R. L., Johnson, A. D. (2000) Turning genes off by Ssn6–Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *TIBS*, 25: 325-330
244. Smith, S., Stillman, B. (1989) Purification and characterization of CAF-I, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication in vitro. *Cell*, 58: 15-25
245. Soni, R., Carmichael, J. P., Murray, J. A. (1993) Parameters affecting lithium acetate-mediated transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and development of a rapid and simplified procedure. *Curr Genet*, 24: 455-459
246. Stargell, L. A., Ogg, R. C., Adkins, J. N., Robinson, M. M., Lumb, K. J. (2001) Transcriptional activity of the TFIIA four-helix bundle *in vivo*. *Proteins*, 43: 227-232
247. Sternberg, P. W., Stern, M. J., Clark, I., & Herskowitz, I. (1987) Activation of the yeast HO gene by release from multiple negative controls. *Cell*, 48: 567-577

248. Sterner, D. E., Berger, S. L. (2000) Acetylation of Histones and Transcription-Related Factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64: 435-459
249. Sudarsanam, P., Iyer, V. R., Brown, P. O., Winston, F. (2000) Whole-genome expression analysis of snf/swi mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 3364-3369
250. Sulahian, R., Sikder, D., Johnston, S. A., Kodadek, T. (2006) The proteasomal ATPase complex is required for stress-induced transcription in yeast. *Nucleic Acids Res*, 34: 1351-1357
251. Sullivan, S. M., Horn, P. J., Olson, V. A., Koop, A. H., Niu, W., Ebright, R. H., Triezenberg, S. J. (1998) Mutational analysis of a transcriptional activation region of the VP16 protein of herpes simplex virus. *Nucleic Acids Res*, 26: 4487-4496
252. Sumimoto, H., Ohkuma, Y., Sinn, E., Kato, H., Shimasaki, S., Horikoshi, M., Roeder, R. G. (1991) Conserved sequence motifs in the small subunit of human general transcription factor TFIIE. *Nature*, 354: 401-404
253. Sun, Z. W., Allis, C. D. (2002) Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature*, 418: 104-108
254. Sung, M. K., Huh, W. K. (2007) Bimolecular fluorescence complementation analysis system for in vivo detection of protein-protein interaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 24: 767-775
255. Svejstrup, J. Q., Wang, Z., Feaver, W. J., Wu, X., Bushnell, D. A., Donahue, T. F., Friedberg, E. C., Kornberg, R. D. (1995) Different Forms of TFIIF for Transcription and DNA Repair: Holo-TFIIF and a Nucleotide Excision Repairosome. *Cell*, 80: 21-28
256. Swaffield J. C., Bromberg J. F., Johnston S. A. (1992) Alterations in a yeast protein resembling HIV Tat-binding protein relieve requirement for an acidic activation domain in *GAL4*. *Nature*, 357: 698-700
257. Swaffield, J. C., Melcher, K., Johnston, S. A. (1995) A highly conserved ATPase protein as a mediator between acidic activation domains and the TATA-binding protein. *Nature*, 374: 88-91
258. Takahata, S., Ryu, H., Ohtsuki, K., Kasahara, K., Kawaichi, M., Kokubo, T. (2003) Identification of a novel TATA element-binding protein binding region at the N terminus of the *Saccharomyces cerevisiae* TAF1 protein. *J Biol Chem*, 278: 45888-45902
259. Tan, S., Hunziker, Y., Sargent, D. F., Richmond, T. J. (1996) Crystal structure of a yeast TFIIA/TBP/ DNA complex. *Nature*, 381: 127-151
260. Theisen, J. W., Lim, C. Y., Kadonaga, J. T. (2010) Three key subregions contribute to the function of the downstream RNA polymerase II core promoter. *Mol Cell Biol*, 30: 3471-3479
261. Tomar, R. S., Zheng, S., Brunke-Reese, D., Wolcott, H. N., Reese, J. C. (2008) Yeast Rap1 contributes to genomic integrity by activating DNA damage repair genes. *The EMBO Journal*, 27: 1575-1584
262. Tora, L. (2002) A unified nomenclature for TATA box binding protein (TBP)-associated factors (TAFs) involved in RNA polymerase II transcription. *Genes Dev*, 16: 673-675
263. Treitel, M. A., Carlson, M. (1995) Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 3132-3136
264. Tzamarias, D., Struhl, K. (1994) Functional dissection of the yeast Cyc8-Tup1 transcriptional co-repressor complex. *Nature*, 369: 758-761
265. Tzamarias, D., Struhl, K. (1995) Distinct TPR motifs of Cyc8 are involved in recruiting the Cyc8-Tup1 corepressor complex to differentially regulated promoters. *Genes Dev*, 9: 821-831
266. Uesugi, M., Verdine, G. L. (1999) The alpha-helical FXXφφ motif in p53: TAF interaction and discrimination by MDM2. *PNAS*, 96: 14801-14806
267. van Attikum, H., Fritsch, O., Hohn, B., Gasser, S. M. (2004) Recruitment of the INO80 complex by H2A phosphorylation links ATP-dependent chromatin remodeling with DNA double-strand break repair. *Cell*, 119: 777-788
268. Vignali, M., Hassan, A. H., Neely, K. E., Workman, J. L. (2000) ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol* 20: 1899-1910
269. Vogelauer, M., Wu, J., Suka, N., und Grunstein, M. (2000) Global histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature*, 408: 495-498

270. Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 10: 1793-1808
271. Wagner, C., Blank, M., Strohmann, B., und Schüller, H.-J. (1999) Overproduction of the Opi1 repressor inhibits transcriptional activation of structural genes required for phospholipids biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 15: 843-854
272. Wagner, C., Dietz, M., Wittmann, J., Albrecht, A., Schüller, H.-J. (2001) The negative regulator Opi1 of phospholipid biosynthesis in yeast contacts the pleiotropic repressor Sin3 and the transcriptional activator Ino2. *Mol Microbiol.*, 41: 155-166
273. Walker, E. J., Saraste, M., Runswick, M. J., Gay, N. J. (1982) Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinase and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO Journal*, 1: 945-951
274. Wang, H., Clark, I., Nicholson, P. R., Herskowitz, I., Stillman, D. J. (1990) The *Saccharomyces cerevisiae* SIN3 Gene, a Negative Regulator of HO, Contains Four Paired Amphipathic Helix Motifs. *Mol Cell Biol*, 10: 5927-5936
275. Wang, H., Curran, E. C., Hinds, T. R., Wang, E. H., Zheng, N. (2014) Crystal structure of a TAF1-TAF7 complex in human transcription factor IID reveals a promoter binding module. *Cell Res*, 24: 1433-1444
276. Warfield, L., Ramachandran, S., Baptista, T., Devys, D., Tora, L., Hahn, S. (2017) Transcription of Nearly All Yeast RNA Polymerase II-Transcribed Genes Is Dependent on Transcription Factor TFIID. *Mol Cell*, 68: 118-129 e115
277. Washburn, B. K., Esposito, R. E. (2001) Identification of the Sin3-binding site in Ume6 defines a two-step process for conversion of Ume6 from a transcriptional repressor to an activator in yeast. *Mol Cell Biol*, 21: 2057-2069
278. Weake, V. M., Workman, J. L. (2012) SAGA function in tissue-specific gene expression. *Trends Cell Biol*, 22: 177-184
279. White, M. J., Hirsch, J. P., Henry, S. A. (1991) The *OPI1* Gene of *Saccharomyces cerevisiae*, a Negative Regulator of Phospholipid Biosynthesis, Encodes a Protein Containing Polyglutamine Tracts and a Leucine Zipper. *J Biol Chem*, 266: 863-872
280. Williams, F. E., Trumbly, R. J. (1990) Characterization of TUP1, a Mediator of Glucose Repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 10: 6500-6511
281. Workman, J. L., Kingston, R. E. (1998). Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem*, 67: 545-579
282. Woychik, N. A., Hampsey, M. (2002) The RNA Polymerase II Machinery: Structure Illuminates Function. *Cell*, 108: 453-463
283. Wright, K. J., Marr, M. T., 2nd Tjian, R. (2006) TAF4 nucleates a core subcomplex of TFIID and mediates activated transcription from a TATA-less promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 12347-12352
284. Wu, J., Carmen, A. A., Kobayashi, R., Suka, N., Grunstein, M. (2001) HDA2 and HDA3 are related proteins that interact with and are essential for the activity of the yeast histone deacetylase HDA1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 4391-4396
285. Wu, W.-H., Hampsey, M. (1999) An activation-specific role for transcription factor TFIIB *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 2764-2769
286. Xie, J., Collart, M., Lemaire, M., Stelzer, G., Meisterernst, M. (2000) A single point mutation in TFIIA suppresses NC2 requirement *in vivo*. *The EMBO Journal*, 19: 672-682
287. Yang, X., Zaurin, R., Beato, M., Peterson, C. L. (2007) Swi3p controls SWI/SNF assembly and ATP-dependent H2A-H2B displacement. *Nat Struct Mol Biol*, 14: 540-547
288. Yokomori, K., Admon, A., Goodrich, J. A., Chen, J.-L., Tjian, R. (1993) Drosophila TFIIA-L is processed into two subunits that are associated with the TBP/TAF complex. *Genes Dev*, 7: 2235-2245
289. Yoshimura T., Kameyama K., Takagi T., Ikai A., Tokunaga F., Koide T., Tanahashi N., Tamura T., Cejka Z., Baumeister W. (1993) Molecular characterization of the 26S proteasome complex from rat liver. *J Struct Biol* 111: 200-211

290. Yoshimura, T., Kameyama, K., Takagi, T., Ikai, A., Tokunaga, F., Koide, T., Tanahashi, N., Tamura, T., Cejka, Z., Baumeister, W., Tanaka, K., Ichihara, A. (1993) Molecular Characterization of the "26 S" Proteasome Complex from rat Liver. *J Structural Biology*, 111: 200-211
291. Yudkovsky, N., Logie, C., Hahn, S., Peterson, C. L. (1999) Recruitment of the SWI/SNF chromatin remodeling complex by transcriptional activators. *Genes Dev*, 13: 2369-2374
292. Yudkovsky, N., Ranish, J. A., Hahn, S. (2000) A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature*, 408: 225-229
293. Zamenhof, S. (1957) Preparation and assay of deoxyribonucleic acids from animal tissue. *Meth Enzymol*, 3: 696-704
294. Zhang, C., Huang, H., Deng, W., Li, T. (2019) Genome-Wide Analysis of the Zn(II)(2)Cys(6) Zinc Cluster-Encoding Gene Family in *Tolypocladium guangdongense* and Its Light-Induced Expression. *Genes (Basel)*, 10
295. Zhang, Y., Reinberg, D. (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev*, 15: 2343-2360
296. Ziegler, L. M., Khapersky, D. A., Ammerman, M. L., Ponticelli, A. S. (2003) Yeast RNA polymerase II lacking the Rpb9 subunit is impaired for interaction with transcription factor IIF. *J Biol Chem*, 278: 48950-48956

6.2 Abkürzungsverzeichnis

μM Mikromolar	<i>HID</i> histone deacetylase interaction domain
<i>A</i> Alanin	<i>HIS3</i> Histidin
<i>ABD</i> Aktivatorbindedomäne	<i>HLA</i> human leucozyte antigen
<i>ADE2</i> adenine requiring	<i>I</i> Isoleucin
<i>ADP</i> Adenosindiphosphat	<i>IC</i> Inositol/Cholin
<i>AHT</i> Anhydrotetracyclin	<i>ICRE</i> inositol/choline-responsive element
<i>ALT</i> Adenin-Leucin-Tryptophan	<i>IDR</i> intrinsically disordered region
<i>APS</i> Ammoniumpersulfat	<i>INO1</i> Gen der Inositol-1-Phosphat-Synthase
<i>Aro80</i> aromatic amino acid requiring	<i>Ino2</i> Aktivator der Phospholipidbiosynthesegene
<i>AS</i> Aminosäure	<i>Ino4</i> Aktivator der Phospholipidbiosynthesegene
<i>ATP</i> Adenosintri-phosphat	<i>Inr</i> Initiator
<i>Bdf</i> Bromodomänenfaktor	<i>IPTG</i> Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
<i>BRE</i> TFIIIB recognition element	<i>K</i> Lysin
<i>bZIP</i> basisches Zippermodul	<i>kb</i> Kilobasen
<i>ChiP</i> Chromatin-Immunopräzipitation	<i>L</i> Leucin
<i>CHO2</i> choline requiring	<i>lacZ</i> Gen des Lactose Operons
<i>CTD</i> Carboxy-terminale Domäne der RNA-Polymerase II	<i>LEU2</i> Leucin
<i>Cyc1</i> Cytochrom C	<i>LT</i> Leucin-Tryptophan
<i>Cyc8</i> Cytochrome C	<i>M</i> Methionin
<i>D</i> Asparaginsäure	<i>MAT</i> mating type
<i>DTT</i> Dithiothreitol	<i>MET25</i> Methionin-Promotor
<i>DMF</i> N,N-Dimethylformamid	<i>mg</i> Milligramm
<i>DMSO</i> Dimethylsulfoxid	<i>mg/l</i> Milligramm je Liter
<i>E. coli</i> Escherichia coli	<i>MHC</i> major histocompatibility complex
<i>EDTA</i> Ethylendiamintetraessigsäure	<i>mM</i> Millimolar
<i>EK</i> Endkonzentration	<i>MTE</i> motif ten element
<i>F</i> Phenylalanin	<i>N</i> Asparagin
<i>FOA</i> 5-Fluororotsäure	<i>NaCl</i> Natriumchlorid
<i>G418</i> Geneticin	<i>NC2</i> negative cofactor 2
<i>Gal4</i> galactose metabolism	<i>nm</i> Nanometer
<i>GSH</i> Glutathion	<i>OD</i> Optische Dichte
<i>GST</i> Glutathion-S-Transferase	<i>Opi1</i> overproducer of inositol, Repressor der Phospholipidbiosynthesegene
<i>HA</i> Hämagglutinin	<i>ONPG</i> ortho-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
<i>Hac1</i> homologous to Atf/Creb1	<i>P</i> Prolin
<i>HCR</i> highly conserved region	<i>PAH</i> paired amphipatic helices
<i>HF</i> high fidelity	<i>PCI</i> Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
<i>HFD</i> histone fold domain	<i>PCR</i> polymerase chain reaction
	<i>Pho4</i> phosphate metabolism
	<i>PIC</i> Präinitiationskomplex

Ptac Promotorkombination für Tryptophan- und Lactose-Operon

R Arginin

RID Repressorinteraktionsdomäne

RNA Ribonucleinsäure

rpm rotation per minute

SAGA Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase complex

SCD soybean casein digest

SDS sodium dodecyl sulfate

SAP shrimp alkaline phosphatase

Sin3 switch independent 3

Sug suppressor of Gal4

SWI/SNF Chromatinremodellierungskomplex

Swi2 Untereinheit des SWI/SNF-Komplexes

SWR1 Swi2/Snf2-related, Swi2/Snf2-related

T Threonin

TAD Transkriptionsaktivierungsdomäne

TAF TBP-assozierte Faktoren

TAND Taf-N-terminal domain

TBE Tris/Borat/EDTA-Puffer

TBP TATA-Box Bindeprotein

TEMED Tetramethylethyldiamin

TFIIA Transkriptionsfaktor IIA

TFIID Transkriptionsfaktor IID

Toa1 Untereinheit des Transkriptionsfaktors IIA

Toa2 Untereinheit des Transkriptionsfaktors IIA

TPR tetratricopeptide repeat

Trp Tryptophan

Tup1 dTMP-uptake

U Units

U/mg Units je Milligramm

UAS upstream activation site

UPR unfolded protein response

URA3 Uracil

UV Ultraviolett

V Valin

Y Tyrosin

6.3 Publikationen

Kliewe, F., Engelhardt, M., Aref, R., Schüller, H.-J., (2017) Promoter recruitment of corepressors Sin3 and Cyc8 by activator proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet.* 63: 739-750

Hintze, S., Engelhardt, M., van Diepen, L., Witt, E., Schüller, H.-J., (2017) Multiple Taf subunits of TFIID interact with Ino2 activation domains and contribute to expression of genes required for yeast phospholipid biosynthesis. *Mol Microbiol.* 106: 876-890

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit bisher von mir weder an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald noch an einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel und Hilfen benutzt und keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen habe.

Maike Engelhardt

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Maike Engelhardt, geb. Spierling
Geburtsdatum	03.06.1991
Geburtsort	Wismar
Familienstand	verheiratet

Schulische Ausbildung

2001-2009	Abitur am Gymnasium „Tisa von der Schulenburg, Dorf Mecklenburg“
-----------	--

Studium

10/2009-09/2012	Bachelorstudium im Fach Biologie an der Universität Greifswald, Bachelorarbeit am Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung, Abteilung Genetik der Mikroorganismen zum Thema: „Epitopmarkierung TBP-assoziiierter Faktoren der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und Interaktionsstudien mit dem Aktivator Ino2.“
-----------------	---

10/2012-10/2014	Masterstudium im Fach Molekularbiologie und Physiologie an der Universität Greifswald, Masterarbeit im Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung, Abteilung Genetik der Mikroorganismen zum Thema: „Bedeutung der TFIIID-Untereinheiten Taf10 und Taf12 für die Aktivierung von Genen der Phospholipid-Biosynthese in der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .“
-----------------	--

Beruflicher Werdegang

11/2014-2020	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Universität Greifswald im Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung, Abteilung Genetik der Mikroorganismen, Dissertation zum Thema: „Interaktionen zwischen Transkriptionsaktivatoren und Coaktivatoren sowie Corepressoren in der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> “
--------------	---

Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Schüller für die Bereitstellung des Promotionsthemas, die Betreuung dieser Arbeit und das entgegengebrachte Vertrauen. Außerdem vielen Dank für die Gesprächsbereitschaft und die zahlreichen fachlichen Anregungen.

Weiterhin möchte ich mich bei den Kollegen der AG Schüller bedanken: Karola und Gudrun für die technische und moralische Unterstützung; Stefan für die Einarbeitung und jahrelange Betreuung; Mathias und Julia, die mir als langjährige Kollegen und Freunde die Zeit im und außerhalb des Labors versüßt haben.

Weiterer Dank gilt „meinen Studentinnen“ Irena, Lorena, Emi, Thea und Eva, deren Daten in diese Arbeit eingegangen sind.

Vielen Dank an meine Familie und Freunde, allen voran Hannes, die immer hinter mir standen.