

***In vivo* Analyse der Chromatinstruktur ribosomaler DNA**
in *S. cerevisiae*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III - Biologie und Vorklinische Medizin der
Universität Regensburg

vorgelegt von
Katharina Merz aus *Regensburg*
Juni 2007

Promotionsgesuch eingereicht am: 21.06.2007

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Herbert Tschochner

Prüfungsausschuß:	Vorsitzender	Prof. Dr. Reinhard Wirth
	1. Gutachter und Prüfer	Prof. Dr. Herbert Tschochner
	2. Gutachter und Prüfer	Prof. Dr. Michael Thomm
	3. Prüfer	Prof. Dr. Wolfgang Seufert

Tag der mündlichen Prüfung: 08.08.2007

Diese Arbeit wurde unter Anleitung von Dr. Joachim Griesenbeck im Labor von Prof. Dr. Herbert Tschochner am Lehrstuhl Biochemie III des Instituts für Mikrobiologie, Genetik und Biochemie der Universität Regensburg angefertigt.

Hiermit erkläre ich, daß ich diese Arbeit selbst verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit war bisher noch nicht Bestandteil eines Prüfungsverfahrens, andere Promotionsversuche wurden nicht unternommen.

Regensburg, den 25. Juni 2007

Ich danke allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Herbert Tschochner danke ich für die interessante Aufgabenstellung und dafür, daß er mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit in seinem Labor durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Joachim Griesenbeck für seine außerordentliche Betreuung, seine ständige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung.

Dr. Helfried Mallow und Edith Aichinger danke ich für ihre Hilfe in Computer- und Verwaltungsangelegenheiten, sowie allen technischen Mitarbeitern für die unzähligen „infrastrukturellen“ Hilfen.

Ulrike Stöckl danke ich für die Konstruktion von Hefestämmen.

Bei Gisela Pöll möchte ich mich herzlichst für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die belebenden Gespräche am Morgen bedanken.

Prof. Dr. Michael Thomm und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die Möglichkeit zur Nutzung ihres Phosphorimagers.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Kollegen für die angenehme Laboratmosphäre, die gute Zusammenarbeit, anregende Diskussionen, konstruktive Kritik und die schöne Zeit in Regensburg bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
1. Einleitung	1
1.1. Chromatin.....	1
1.1.1. Nukleosomen.....	1
1.1.2. Übergeordnete Chromatinstrukturen.....	2
1.1.3. Eu- und Heterochromatin	3
1.1.4. Posttranslationale Histonmodifikationen und Histonvarianten.....	4
1.2 Struktur und Transkription ribosomaler DNA (rDNA) in <i>S. cerevisiae</i>	7
1.2.1. Struktur der rDNA.....	7
1.2.2. Transkription der rDNA	8
1.3. Regulation der RNA Polymerase I Transkription	11
1.3.1. Regulation der Transkriptionsinitiation	12
1.3.2. Regulation der Transkriptionselongation	13
1.4. Chromatinstruktur der rDNA	16
1.4.1. Chromatinzustände der rDNA.....	16
1.4.2. Stilllegung der rDNA (<i>rDNA silencing</i>).....	18
1.4.3. Organisation des rDNA Lokuses in <i>S. cerevisiae</i>	19
Zielstellung der Arbeit	21
2. Material und Methoden	23
2.1. Material	23
2.1.1. Chemikalien	23
2.1.2. Lösungen, Puffer und Medien.....	23
2.1.3. Nukleinsäuren.....	25
2.1.4. Enzyme und Polypeptide.....	31
2.1.5. Antikörper	32
2.1.6. Organismen	32
2.1.7. Geräte	38
2.2. Methoden.....	38
2.2.1. Enzymatische Manipulation von DNA	38
2.2.2. Reinigung von Nukleinsäuren.....	40
2.2.3. Quantitative und qualitative Analyse von Nukleinsäuren.....	42
2.2.4. Nukleipräparation.....	46
2.2.5. <i>In vitro</i> ChEC (<i>chromatin endogenous cleavage</i>).....	46
2.2.6. Psoralenvernetzung	47
2.2.7. Transformation und Kultur von <i>E. coli</i> zur Amplifikation rekombinanter DNA ..	48
2.2.8. Transformation und Kultur von <i>S. cerevisiae</i>	49
2.2.9. Proteinbiochemische Methoden	51

3. Ergebnisse	55
3.1. Lokalisierung chromatinassoziierter Faktoren an der rDNA mittels <i>in vitro</i> ChEC (<i>chromatin endogenous cleavage</i>)	55
3.1.1. Etablierung der MNase-Fusionsstämme	55
3.1.2. Lokalisierung chromatinassoziierter Faktoren im Wildtypstamm NOY505	56
3.1.3. Die Kombination von ChEC- und Psoralenvernetzungsanalyse ermöglicht die Bestimmung der Chromatinform, mit der rDNA-Bindeproteine assoziiert sind	61
3.2. Chromatinstruktur in Stämmen mit Deletionen funktioneller Pol I Transkriptionsfaktoren	64
3.2.1. MNase Verdauemuster des Wildtypstammes NOY505	64
3.2.2. Die Deletion von UAF oder CF Komponenten ändert die Chromatinstruktur der rDNA	65
3.2.3. Die Ausbildung alternativer Chromatinstrukturen ist von UAF abhängig	68
3.2.4. Die Deletion von HMO1 führt zu keiner detektierbaren Veränderung des MNase Verdauemusters der chromosomalen rDNA	69
3.2.5. Transkriptionsfaktoren sind nicht mehr mit der rDNA von UAF- und CF-Mutanten assoziiert	70
3.3. Chromatinstruktur temperatursensitiver Initiationsmutanten	71
3.3.1. Gpy11-6: Eine temperatursensitive Pol I-Mutante	72
3.3.2. YCC95: Eine temperatursensitive Rrn3p-Mutante	74
3.4. Bei Nährstoffentzug ist Rrn3p nicht mehr mit dem Promotor assoziiert	83
3.4.1. Bei Nährstoffentzug bleiben alle Histone und Transkriptionsfaktoren bis auf Rrn3p mit der rDNA assoziiert	83
3.4.2. Transkriptionsfaktoren (außer Rrn3p) und Histone bleiben bei Nährstoffentzug mit der gleichen Chromatinform assoziiert wie vor dem Entzug	87
3.5. NOY886: Ein konstitutiv aktiver Stamm	90
3.5.1. UAF ist nicht mit dem Enhancer des konstitutiv aktiven Stammes NOY886 assoziiert	90
3.6. Chromatinstruktur nach Uracildepletion	92
3.6.1. Die Depletion von Uracil führt zu einer veränderten Psoralenzugänglichkeit der rDNA von NOY886	92
3.6.2. Die Uracildepletion verhindert möglicherweise die Elongation von Pol I	93
3.6.3. Die Depletion von Uracil führt zu einer veränderten Psoralenzugänglichkeit der rDNA von NOY505-MNase-Fusionsstämmen	95
3.7. Nukleosomenpositionierung an der rDNA	98
3.7.1. Die aktive rDNA hat eine stark verminderte Nukleosomenokkupanz	98
3.7.2. Nukleosomale Organisation der rDNA in stationären Zellen	101
3.7.3. Nukleosomales <i>Spacing</i> am rDNA Locus	103
3.8. Die rDNA des Plasmids pKM6 des Stammes YKM1 besitzt eine alternative Chromatinstruktur	108
4. Diskussion	111

4.1. Organisation der rDNA	111
4.1.1. Ist die DNA des <i>upstream</i> Elements um UAF gewunden?	111
4.1.2. Existiert der „Ribomotor“?	114
4.2. Dynamik von Assoziations- und Dissoziationsereignissen an der rDNA	116
4.2.1. Rrn3p ist nach Nährstoffentzug kaum noch mit der rDNA assoziiert	116
4.2.2. Die Pol I Transkription wird auch auf Ebene der Elongation reguliert	117
4.2.3. Bindung von CF ist nicht zyklisch	117
4.2.4. Ist Hmo1p ein funktionelles Homolog zu UBF?	118
4.3. UAF ist für die Chromatinstruktur am rDNA Locus verantwortlich	119
4.4. Die Psoralenzugänglichkeit der rDNA hängt von der Polymerasepräsenz ab	121
4.5. Nukleosomen	125
4.6. Episomale rDNA unterscheidet sich von chromosomaler rDNA	128
5. Zusammenfassung	129
Abkürzungen	131
Literaturverzeichnis	133

1. Einleitung

1.1. Chromatin

Den Grundbaustein des Chromatins bildet das Nukleosom, welches aus einem Histonoktamer und der darum gewickelten DNA besteht (Kornberg, 1974). Weitere Bestandteile sind eine Vielzahl von Nichthistonproteinen und Enzymen, die mit der DNA assoziiert sind. Chromatin spielt neben der Verdichtung der DNA eine entscheidende Rolle bei allen DNA-abhängigen Prozessen, wie der Transkription, der Rekombination, der DNA-Replikation der DNA-Reparatur oder der Bindung regulatorischer Proteine.

1.1.1. Nukleosomen

Die Histone H2A, H2B, H3 und H4 sind die Hauptproteinkomponenten des Chromatins. Sie befinden sich im Zellkern der Eukaryoten und sind in ihrer Länge und Aminosäuresequenz hoch konserviert. Histon H1 hingegen ist evolutiv weniger stark konserviert und in manchen Geweben durch besondere Histone ersetzt. Hefen fehlt Histon H1 gänzlich.

Die vier Kernhistone sind kleine basische Proteine, mit einer Größe von elf bis 16 kDa, die einen hohen Anteil an den positiv geladenen Aminosäuren Lysin und Arginin aufweisen. Neben einer C-terminalen *histonfold*-Domäne, die aus drei α -Helices besteht und für die Wechselwirkungen der Histone untereinander, sowie mit der DNA verantwortlich ist, besitzen die Histone flexible N-terminale Aminoacylenden mit 20 bis 40 Aminosäureresten, die den Hauptteil des Lysins enthalten und aus der globulären Domäne herausragen (Arents et al., 1991). An diesen geladenen Aminoacylenden findet eine Vielzahl posttranslationaler Modifikationen statt, wie die Acetylierung und Methylierung von Lysin und Arginin, die Ubiquitinierung und Sumoylierung von Lysin, die Phosphorylierung von Serin und Threonin, sowie die ADP-Ribosylierung (Kapitel 1.1.4.).

Jedes Nukleosom besteht aus einem Histonkern und der sich darum windenden DNA. Der Histonkern, ein Oktamer, setzt sich aus jeweils zwei Molekülen der Histone H2A, H2B, H3 und H4 zusammen, wobei die Histone H3 und H4 ein stabiles Tetramer $(H3/H4)_2$ bilden, das sich an die DNA angelagert, woran sich schließlich zwei $(H2A/H2B)$ -Dimere lagern (Kleinschmidt et al., 1990). Um die so entstandene scheibenförmige Struktur des Proteinkerns windet sich die DNA linksgängig mit einer Länge von 146 Nukleotiden und 1,65 Windungen (Luger et al., 1997). Benachbarte Nukleosomen sind mit einer Verbindungs-DNA (im weitem als Linker-DNA bezeichnet) verbunden, deren Länge 15 bis 80 Basenpaare beträgt. Dadurch entsteht eine Struktur, mit einem Durchmesser von 10nm, die einer Perlenkette ähnelt (Olins and Olins, 1974).

Nackte DNA wird von sequenzunspezifischen Endonukleasen, wie der DNase I oder der Mikrokokken-Nuklease (MNase) vollständig verdaut, wobei die MNase AT-reiche Regionen

bevorzugt schneidet („hypersensitive Stellen“). Nukleosomal verpackte DNA hingegen, ist für Endonukleasen weniger sensitiv als die freie DNA des Verbindungsstückes zweier Nukleosomen. Zu diesem Schutz tragen auch die Linker-Histone in gewissem Maße bei. Bei einem unvollständigen MNase Verdau nukleosomaler DNA entsteht bei der Auftrennung der DNA nach ihrer Größe in einem Agarosegel eine „nukleosomale Leiter“, deren Abstände zwischen 150-200 Basenpaare betragen, was genau einem Nukleosom inklusive der Linker-DNA entspricht.

In proliferierenden Zellen wird der Hauptteil der Histone in der S-Phase des Zellzykluses synthetisiert und ist mit der Replikation verbunden, um die Verpackung der neu synthetisierten DNA zu gewährleisten. Histonvarianten hingegen werden außerhalb der S-Phase synthetisiert (s. 1.1.4.D.) und können replikationsunabhängig eingebaut oder ausgetauscht werden. In den Zusammenbau der Nukleosomen sind Histonchaperone involviert, die meist eine Vorzugsaffinität für H2A/H2B oder für H3/H4 besitzen.

1.1.2. Übergeordnete Chromatinstrukturen

Im Gegensatz zu der in Lehrbuchabbildungen vermittelten Klarheit, ist tatsächlich nur sehr wenig über übergeordnete Chromatinstrukturen bekannt. Die Ausbildung dieser Strukturen scheint ein äußerst dynamischer Prozeß zu sein und kann in verschiedene Stufen unterteilt werden, wobei die Ausbildung der 10nm-Perlenschnur die erste Stufe darstellt (Abb. 1-1). Unter physiologischen Bedingungen bildet sich aus dieser eine kondensierte Faser mit einem Durchmesser von 30nm. Durch die Bindung der Linker-Histone H1 oder H5 an die Linker-DNA zwischen den Nukleosomen wird die Bildung der 30nm-Faser begünstigt, ist dafür jedoch nicht essentiell. Die Linker-Histone berühren die Kernproteine dabei nicht und sind kein Bestandteil der Nukleosomen. Sie stabilisieren jedoch die intermolekulare Faltung und die Interaktionen der Chromatinfasern untereinander (Carruthers et al., 1998). Die weitere Kompaktierung der DNA erfolgt vermutlich über die Assoziation von 30nm-Chromatinfaserschleifen mit einem flexiblen Chromosomengerüst aus Nichthistonproteinen, das als nukleare Matrix oder *scaffold* bezeichnet wird (Berezney and Coffey, 1974). Dadurch entsteht die für die Interphase charakteristische Form der dekondensierten Chromosomen. Durch die Spiralisierung des Gerüsts zu einer Helix und deren weitere Kondensation entsteht wahrscheinlich die für die Metaphase typische hoch kondensierte Struktur des Chromosoms.

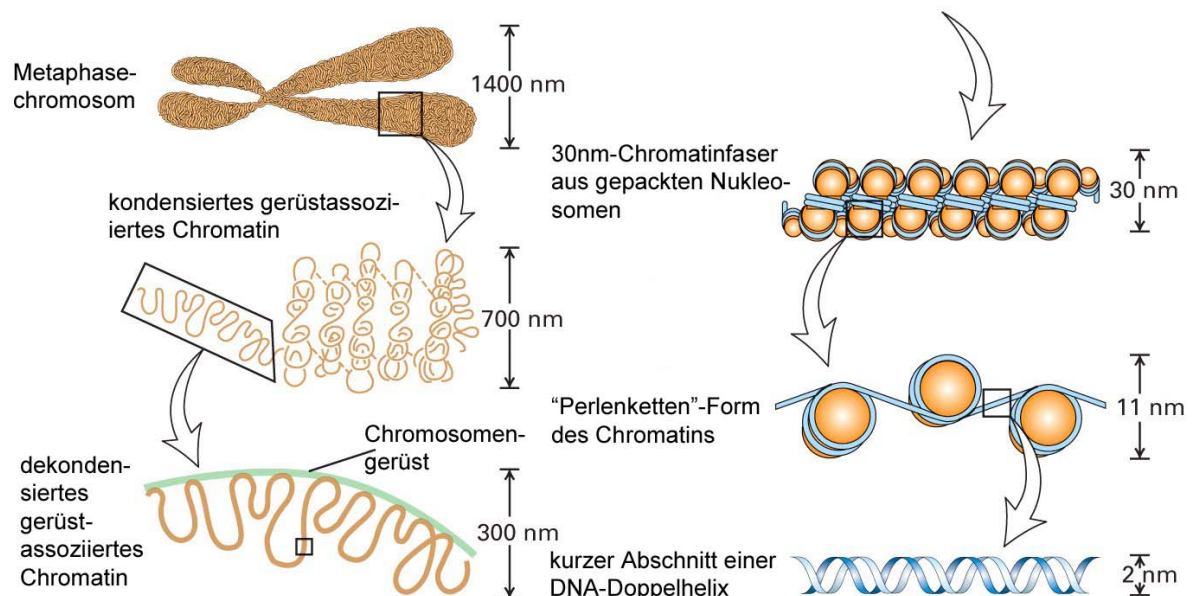


Abb. 1-1: Modell für die Packung des Chromatins und des Chromosomengerüsts in Metaphasechromosomen; aus Lodish et al., 2001.

1.1.3. Eu- und Heterochromatin

Chromatin wird nach funktionellen Aspekten in Eu- und Heterochromatin unterteilt.

Euchromatin entspricht dabei im allgemeinen genomischen Regionen, die transkriptionell aktiv sind und in der Interphase dekondensiert vorliegen. Die regulatorischen Sequenzen dieser Regionen sind für sequenzunspezifische Endonukleasen sensitiv und besitzen als charakteristisches Merkmal neben unmethylierten CpG-Inseln (nicht in Hefen, da diese keine DNA Methylierung besitzen), hyperacetylierte Lysine an den N-terminalen Aminoacylenden der Histone H3 und H4. Euchromatische Bereiche werden in der frühen S-Phase repliziert (Arney and Fisher, 2004; Grewal and Elgin, 2002). Die meisten für Proteine codierenden Gene liegen in dieser Form vor.

Heterochromatin hingegen ist transkriptionell inaktiv und hochkondensiert. Die DNA des Heterochromatins ist für Nukleasen, sowie DNA-Bindeproteine weniger zugänglich. Die CpG-Dimere sind normalerweise methyliert und die Aminoacylenden der Histone sind deutlich hypoacetyliert. Heterochromatin wird weiterhin in konstitutives und fakultatives Heterochromatin unterteilt.

Konstitutives Heterochromatin, das in allen somatischen Zellen vorkommt, ist genarm und bildet sich meist an repetitiven Sequenzen, wie dem Centromer und den Telomeren aus. Diese Regionen werden erst spät in der S-Phase repliziert. Die Histone H3 und H4 sind typischerweise an den Lysinen K9 (nicht in *S. cerevisiae*) bzw. K20 trimethyliert. In *S. cerevisiae*, wird die Genstilllegung an den Telomeren durch das Anlagern eines Multiproteinkomplexes aus Rap1p und den SIR Proteinen (*silent information regulator*) vermittelt (Grunstein, 1997).

Fakultatives Heterochromatin hingegen repräsentiert den Teil des Heterochromatins, an dem keine Genexpression stattfindet, da es während der Entwicklung transkriptionell abgeschaltet wurde. Beispiele hierfür sind die Inaktivierung des weiblichen X-Chromosoms der Säugetiere, der stillen Paarungstyploci (*mating-type*-Gene) der Hefen und der *Hox*-Gene von *Drosophila*. Die Histone H3 und H4 sind typischerweise an den Lysinen K9 (nicht in *S. cerevisiae*) bzw. K20 di- bzw. trimethyliert (Schotta et al., 2002). Für die Inaktivierung der stillen Paarungstyploci in *S. cerevisiae* wird neben den Proteinen zur Telomerstillegung zusätzlich Sir1p benötigt.

Das Chromatin einer Zelle ist keinesfalls starr, sondern äußerst dynamisch, so daß heterochromatische und euchromatische Bereiche aneinander anschließen. Die räumliche Verteilung stärker und schwächer entfalteter Chromatinabschnitte im Zellkern beeinflusst vermutlich nukleäre Funktionen, wie die Genaktivität (Chubb and Bickmore, 2003). Diese kann in euchromatischen Genen unterschiedlich reguliert werden. Euchromatische Gene, die sich in der Nähe heterochromatischer Bereiche befinden, können durch das Ausbreiten (*spreading*) des Heterochromatins entlang der DNA stillgelegt werden. Dieser Effekt wird als *position effect variegation* bezeichnet (Reuter and Spierer, 1992; Schotta et al., 2003).

An der Entstehung des Heterochromatins und dessen Erhaltung sind also eine Vielzahl von Faktoren beteiligt, die miteinander interagieren können. Dazu gehören vor allem die Histonmodifikationen, die Umgestaltung des Chromatins (*Chromatin remodeling*), die DNA Methylierung, sowie der RNA-Interferenz-Mechanismus höherer Eukaryoten (RNAi).

1.1.4. Posttranslationale Histonmodifikationen und Histonvarianten

In den Kernhistonen können über 30 Aminosäurereste im chromosomalen Kontext modifiziert werden, wobei eine Vielzahl der posttranslationalen Modifikationen an den N-terminalen Aminoacylenden stattfindet (Fischle et al., 2003). Zu den Hauptmodifikationen zählen die Acetylierung und Methylierung.

Die Hypothese des sogenannten *Histon Codes* besagt, daß eine bestimmte Kombination posttranslationaler Histonmodifikationen zur Rekrutierung spezieller transagierender Faktoren führt, die wiederum den funktionellen Zustand der lokalen Chromatinumgebung verändern (Jenuwein and Allis, 2001; Strahl and Allis, 2000). Es wird angenommen, daß die Histonmodifikationen als Markierungssystem dienen, welches von regulatorischen Proteinen erkannt und/oder gelesen (*dechiffriert*) wird. Diese Markierungen scheinen die Chromatinstruktur direkt zu beeinflussen. Somit spielen die Histonmodifikationen eine entscheidende Rolle bei der Dynamik der Chromatinstruktur und der damit verbundenen Regulation der Genexpression.

A. Acetylierung von Lysin

Die Histonacetylierung, wurde bereits 1964 mit dem Anstieg der transkriptionellen Aktivität in Zusammenhang gebracht (Allfrey et al., 1964). Hyperacetylierte Bereiche (mindestens

zwei Lysinreste beliebiger Kernhistone eines einzelnen Nukleosoms sind acetyliert) korrelieren dabei meist mit der transkriptionellen Aktivität, weniger starke Acetylierung korreliert mit dem reprimierten Zustand und kompaktiertes, stillgelegtes Chromatin liegt hypoacetyliert vor (Fischle et al., 2003; Grunstein, 1997; Katan-Khaykovich and Struhl, 2002). In *S. cerevisiae* ist der Großteil des Genoms transkriptionell aktiv, die Kernhistone sind hyperacetyliert (Clark et al., 1993), die wenigen stillgelegten Bereiche, wie die *mating-type*-Gene und die Telomere, besitzen hypoacetyliertes Histon H4 (Braunstein et al., 1993). Das Gleichgewicht von Acetylierung und Deacetylierung spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse, wie der genomweiten basalen Transkription, der Wahl des günstigsten Replikationszeitpunktes, der DNA-Reparatur oder der genspezifischen Transkription (Hasan and Hottiger, 2002; Kurdistanian and Grunstein, 2003).

B. Methylierung von Lysin und Arginin

Die Histonmethylierung wurde sowohl im Zusammenhang mit der transkriptionellen Reprimierung als auch der Aktivierung als wichtige Modifikation identifiziert (Margueron et al., 2005) und ist für die Histone H3 und H4 am besten untersucht. Sechs Lysinreste wurden dabei besonders intensiv erforscht (H3K4, -9, -27, -36 und -79 und H4K20) und sowohl mit der transkriptionellen Regulation als auch der DNA-Reparatur in Zusammenhang gebracht (Margueron et al., 2005; Martin and Zhang, 2005). Lysin kann mono-, di- oder trimethyliert werden (Bannister and Kouzarides, 2004), Arginin kann sowohl mono- als auch symmetrisch oder asymmetrisch dimethyliert werden (Bedford and Richard, 2005). Für die Funktionalität der Methylierung ist die Anzahl der Modifikationen in Kombination mit den Positionen der modifizierten Aminosäurereste entscheidend (Lachner and Jenuwein, 2002; Lachner et al., 2003).

Viele der kovalenten Histonmodifikationen sind reversibel. Dadurch kann die Zelle auf Änderungen schnell reagieren und die Genexpression entsprechend regulieren. Für die Methylierung galt die letzten 30 Jahre, daß sie irreversibel sei, doch LSD1 (Lysin spezifische Demethylase) wurde von Shi et al., 2004 als erste Histondemethylase identifiziert.

C. andere Histonmodifikationen

Neben den bereits genannten Modifikationen gibt es eine Vielzahl weiterer Histonmodifikationen. Die Phosphorylierung von Serin und Threonin wird beispielsweise mit der Mitose und der Transkriptionsaktivierung in Zusammenhang gebracht (Hsu et al., 2000). Eine neuere Studie gibt Hinweise darauf, daß die Phosphorylierung von Serin 1 des Histons H4 die Sporulation von *S. cerevisiae* reguliert und eine evolutiv konservierte Rolle bei der Kompaktierung des Chromatins in den späteren Stadien der Gametogenese spielt. (Krishnamoorthy et al., 2006). Die Peptide Ubiquitin und SUMO (*small ubiquitin-related modifier*) können kovalent an Lysin angehängt und auch wieder entfernt werden. Am häufigsten sind davon die Histone H2A und H2B höherer Eukaryoten betroffen. Die Ubiquitinierung ist meist mit transkriptionell aktivem Chromatin verbunden (Sun and Allis,

2002). Die Sumoylierung scheint hingegen mit der transkriptionellen Repression verbunden zu sein (Shiio and Eisenman, 2003). Die ADP-Ribosylierung, bei der ADP-Ribose auf eine Glutaminsäure oder auf Arginin der Kernhistone übertragen wird, spielt z.B. bei der Reparatur beschädigter DNA eine wichtige Rolle und ist für die transkriptionelle Aktivität bestimmter induzierbarer Gene wichtig, sowie an der Stilllegung anderer Gene beteiligt (Kraus and Lis, 2003). Über die Biotinylierung von Lysin, die mit stillgelegtem Chromatin verbunden scheint, ist bisher wenig bekannt. Einige der Kernhistone humaner Zellen sind davon betroffen (Stanley et al., 2004). Weitere Modifikationen sind die Glycosylierung und die Glutaminierung.

D. Histonvarianten

Zusätzlich zu den Histonmodifikationen können die Kernhistone durch Histonvarianten ersetzt sein. Diese unterscheiden sich von den normalen Histonen meist in der Zusammensetzung ihrer N-terminalen Aminoacylenden und verleihen den Nukleosomen somit eine spezialisierte Funktion (Henikoff et al., 2004). Einige dieser Varianten reichern sich in spezifischen chromosomalen Bereichen an. Histonvarianten von H2A und H3 sind seit langem bekannt und in die Ausbildung alternativer Chromatinzustände involviert. Das centromerische Protein A (CENP-A) ist eine Histon H3 Variante und für die Struktur und Funktion von Centromeren essentiell (Ahmad and Henikoff, 2001). Höhere Eukaryoten haben außerdem eine H3 Austauschvariante, H3.3, die sich in nur vier Aminosäureresten von H3 unterscheidet. H3.3 wird während des gesamten Zellzykluses synthetisiert und mit Hilfe des HIRA-Komplexes in die Nukleosomen eingebaut (Tagami et al., 2004), Histon H3 hingegen wird nur während der Replikation eingebaut. Euchromatin und hoch transkribierte Regionen, wie die ribosomale DNA, sind besonders reich an H3.3. Replikationsunabhängiger Einbau von H3.3 zeichnet aktives Chromatin aus (Ahmad and Henikoff, 2002). H2A.Z ist eine weitere Histonvariante, die mit transkriptionell aktivem Chromatin assoziiert ist. In *S. cerevisiae* wird die H2A.Z-Variante Htz1 in der Nähe stillgelegter Chromatinbereiche des Genoms eingebaut und verhindert damit das Ausbreiten des Heterochromatins (s. 1.1.3.) (Meneghini et al., 2003).

1.2 Struktur und Transkription ribosomaler DNA (rDNA) in *S. cerevisiae*

1.2.1. Struktur der rDNA

Die rDNA ist in vielerlei Hinsicht einzigartig. Sie ist eines der redundantesten Gene eines eukaryotischen Genoms, sie besitzt ihre eigene RNA Polymerase (Pol I) und nur etwa die Hälfte ihrer Genkopien wird aktiv transkribiert. Eukaryoten besitzen drei zelluläre RNA Polymerasen zur Synthese eines jeweils anderen RNA Typs. RNA Polymerase II transkribiert alle proteincodierenden Gene (mRNA), sowie kleine Kern-RNAs (*small nuclear RNAs*, snRNAs), RNA Polymerase III synthetisiert die 5S rRNA, die tRNA und andere kurze, relativ stabile RNAs. RNA Polymerase I (Pol I) ist für die Transkription der ribosomalen DNA (rDNA) zuständig. In einer Hefezelle beträgt die Transkription der rDNA ~60% der Gesamttranskription und die der ribosomalen Proteine ~50% der Pol II Transkription (Rudra and Warner, 2004; Warner, 1999). Die rDNA codiert für ein 35S-rRNA-Vorläufertranskript, das zu den drei großen ribosomalen Struktur-RNAs, der 18S, 25S und 5.8S rRNA prozessiert und anschließend mit der 5S rRNA und den ribosomalen Proteinen zu den Ribosomenuntereinheiten zusammengebaut wird. Das Ribosom besteht aus der kleinen 40S- (beinhaltet die 18S rRNA) und der großen 60S- (beinhaltet die 5S, 5.8S und 25S rRNA) Untereinheit. Die Synthese und Prozessierung der rRNA, sowie der Ribosomenzusammenbau finden im Nukleolus statt. Die fertigen Ribosomen werden mit Hilfe der Noc-Proteine vom Zellkern ins Zytoplasma transportiert, wo sie schließlich für die Proteinsynthese zur Verfügung stehen.

Die rDNA Kopienzahl kann von Hunderten in Säugern bis hin zu Tausenden in Pflanzen reichen. Die rRNA Gene können dabei gruppiert auf einem oder mehreren Chromosomen lokalisiert sein. Werden diese Bereiche aktiv abgelesen, können sie in EM-Analysen als distinkte nukleäre Strukturen, sog. Nukleolus organisierende Regionen (NORs), erkannt werden. In *S. cerevisiae* sind 150-200 Kopien auf dem rechten Arm von Chromosom XII tandemartig in „Kopf-Schwanz“-Formation (*head to tail*) angeordnet und machen ungefähr ein Zehntel des gesamten Genoms aus. Eine einzelne Transkriptionseinheit umfaßt einen Bereich von 9,1kb und enthält die Information für alle vier rRNA-Spezies. Die 35S rDNA wird von zwei extern transkribierten *Spacern* (5'ETS und 3'ETS) umgeben, die Sequenzen der „reifen“ rRNAs (18S, 5.8S und 25S) werden durch zwei intern transkribierte *Spacer* (ITS1 und ITS2) voneinander getrennt (Abb. 1-2). Am 3'Ende der 35S rDNA liegt der Terminator und unmittelbar dahinter, ein Enhancer benannter DNA-Bereich, welcher als trans-Element der Regulation von RNA Pol I abhängiger Transkription beschrieben wurde. Der Enhancer ist allerdings für das Zellwachstum entbehrlich (Wai et al., 2001). Die 5S rDNA liegt hinter der 35S rDNA, zwischen zwei intergenen *Spacern* (IGS1 und IGS2) und wird bezüglich der 35S rDNA in gegenläufiger Richtung von Pol III transkribiert. Zwischen der 35S und der 5S rDNA liegt die Barriere für die Replikationsgabel (*replication fork*

barrier RFB), zwischen der 5S rDNA und der nächsten Transkriptionseinheit liegt eine autonome Replikationssequenz (ARS), die als Replikationsursprung dient (s. 1.4.3.).

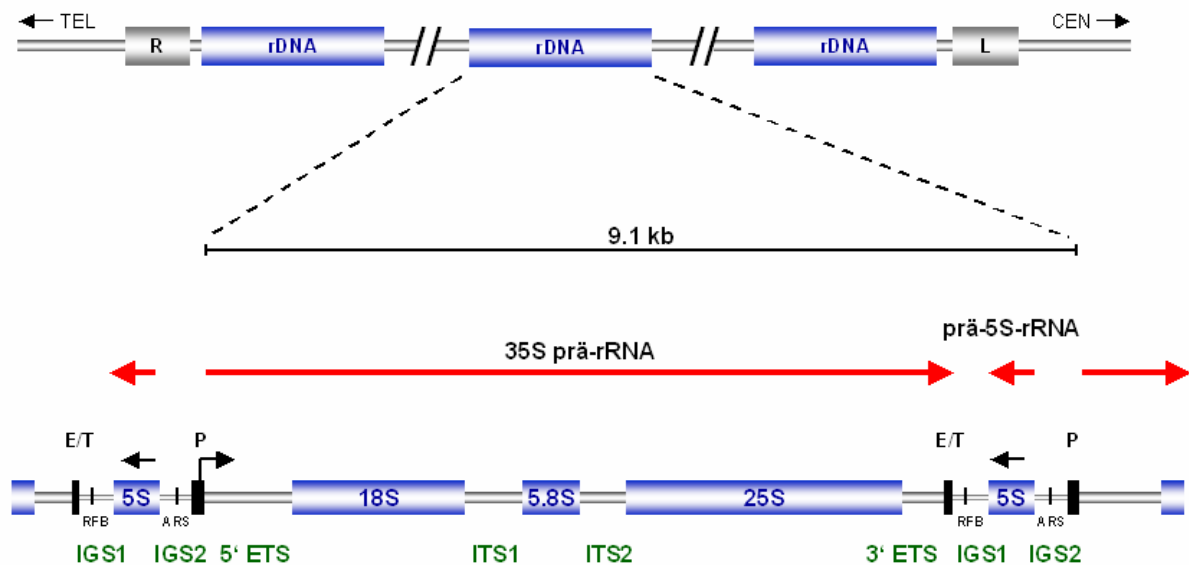


Abb. 1-2: Schematische Darstellung des rDNA Lokuses in *S. cerevisiae*. R/L rechts und links flankierende Sequenzen der rDNA, TEL Telomer, CEN Zentromer, P Promotor, E Enhancer, T Terminator, RFB Replikationsgabelbarriere, ARS autonome Replikationssequenz, IGS1/2 intergener *Spacer* 1 und 2, ITS1/2 intern transkribierter *Spacer* 1 und 2, ETS extern transkribierter *Spacer*.

1.2.2. Transkription der rDNA

Für die Initiation der rDNA Transkription in *S. cerevisiae* sind neben der RNA Polymerase I, die aus 14 Untereinheiten besteht, zwei weitere Multiproteinkomplexe erforderlich, die an den rDNA Promotor binden (Abb. 1-3). Dieser erstreckt sich über rund 150bp und enthält neben dem *core* Element (CE; von -28 bis +8) im Bereich des Transkriptionsstarts, das *upstream* Element (UE; von -146 bis -51; Choe et al., 1992; Kulkens et al., 1991). An das UE bindet der *upstream activating* Faktor (UAF), bestehend aus den sechs Untereinheiten Rrn5p, Rrn9p, Rrn10p, Uaf30p, sowie den Histonen H3 und H4 (Keener et al., 1997; Keys et al., 1996; Siddiqi et al., 2001a). Der *core* Faktor (CF), der aus den drei Polypeptiden Rrn6p, Rrn7p und Rrn11p besteht, bindet daraufhin an das CE (Keys et al., 1994; Lin et al., 1996). Beide Multiproteinkomplexe sind über das TATA-Bindeprotein (TBP) miteinander verbunden (CF über Rrn6p und UAF über Rrn9p; Steffan et al., 1998). Die Assoziation von UAF mit dem Promotor ist sehr stabil und UAF bleibt während des gesamten Transkriptionszykluses an ihn gebunden. UAF fördert die Bindung des für die Transkription essentiellen CFs, dessen Bindung hingegen zyklisch sein könnte (Aprikian et al., 2001; Bordi et al., 2001). Deletionen von UAF-Komponenten (Rrn5p, Rrn9p oder Rrn10p) führen dazu, daß die Pol I Transkription komplett abgeschaltet wird. Die Umstellung der endogenen rDNA Transkription von Pol I auf Pol II, auch *polymerase switch for growth* (PSW) genannt, verleiht Hefen mit einer solchen Mutation die Fähigkeit zu wachsen, wenn auch nur extrem

langsam und kaum dazu befähigt, Kolonien zu bilden. Für den PSW ist neben einer Deletion in UAF und der Expansion der chromosomalen rDNA Kopien Rpd3p erforderlich. Rpd3p wird für eine effiziente Pol II Transkription, nicht jedoch für die Pol I Transkription der rDNA benötigt (Oakes et al., 2006a). Hefen mit einer Uaf30p-Deletion weisen eine höhere Wachstumsrate auf und können sowohl von Pol I als auch Pol II transkribiert werden (Siddiqi et al., 2001a). Mutationen in Genen, die die Rekombination der rDNA Kopien beeinflussen, wie *fohl* (*replication fork blocking*; Kobayashi and Horiuchi, 1996) oder *sir2* (*silent information regulator 2*), vermindern bzw. steigern die Fähigkeit zum PSW. Mutationen der Pol I oder anderer Transkriptionsfaktoren, wie CF oder Sir2p, können nicht eigenständig zur rDNA Transkription durch Pol II führen. UAF nimmt somit eine spezielle Rolle dabei ein, die Transkription der rDNA durch Pol II zu unterbinden (Conrad-Webb and Butow, 1995; Oakes et al., 1999; Siddiqi et al., 2001b; Siddiqi et al., 2001a; Vu et al., 1999). Daß Pol II dazu befähigt ist, funktionale rRNA zu synthetisieren wurde bereits in Mutanten gezeigt, denen eine funktionelle Pol I fehlte und die die rDNA von einem Helferplasmid unter Kontrolle von dem RNA Polymerase II abhängigen GAL7-Promotor abschrieben (Nogi et al., 1991).

Nach der Bindung der basalen Transkriptionsfaktoren wird die Transkription durch die Rekrutierung der Pol I initiiert, wobei diese nur mit Rrn3p komplexiert initiationskompetent ist. Rrn3p interagiert dabei neben der A43-Untereinheit von Pol I auch mit Rrn6p des *core* Faktors (Milkereit and Tschochner, 1998; Peyroche et al., 2000; Yamamoto et al., 1996). Nach der Initiation der Transkription geht die rRNA Synthese in die Elongationsphase über, bei der keiner der Transkriptionsfaktoren mit Pol I verbunden bleibt. Rrn3p dissoziiert von Pol I, während oder kurz nachdem diese den Promotor verläßt (Bier et al., 2004). Die Termination wird durch Reb1p vermittelt, das an eine definierte Bindesequenz am 3'Ende der Transkriptionseinheit bindet und die Termination direkt stromaufwärts über eine T-reiche Sequenz, die als Entlassungselement für die Polymerase dient, fördert (Lang et al., 1994; Lang and Reeder, 1993). Kempers-Veenstra et al., 1986 postulierten das Modell des

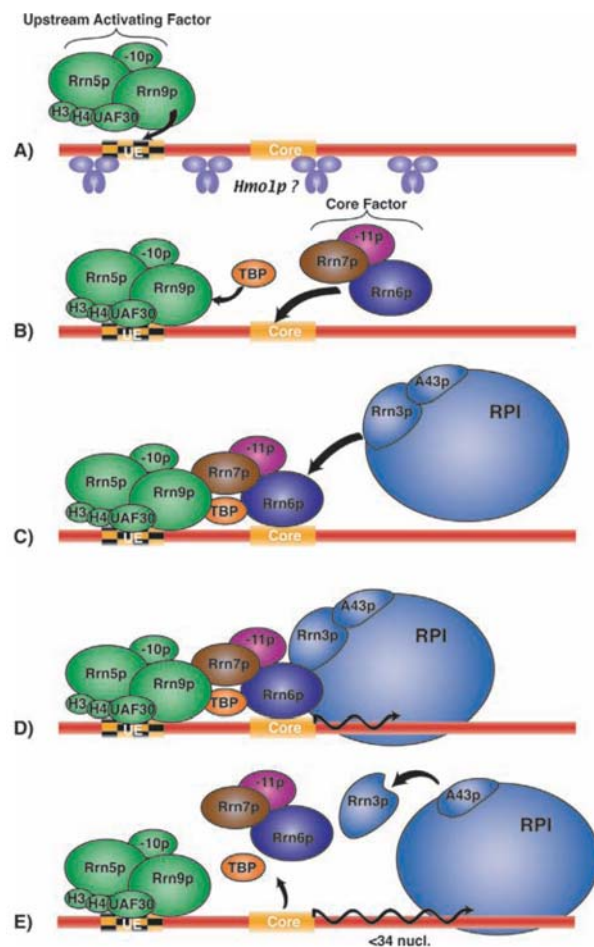


Abb. 1-3: Bindung des RNA Polymerase I Transkriptionskomplexes an den rDNA Promotor und Initiation der Transkription in *S.cerevisiae*. UE upstream Element, Core core Element, TBP Tatabindeprotein, RPI RNA Polymerase I; aus Moss et al., 2007.

„Ribomotors“, welches die Vorstellung vertritt, daß jede rDNA Einheit die Form einer Schleife (*loop*) annimmt, so daß der Promotor und das Terminator/Enhancer-Element der gleichen, sowie der benachbarten Transkriptionseinheit in unmittelbare Nähe gebracht werden. Terminierende Pol I Moleküle könnten somit direkt vom Terminator/Enhancer-Element auf den Promotor der gleichen oder der proximal stromabwärts gelegenen Transkriptionseinheit übergehen, ohne zuvor in den freien *Pool* überzutreten. Die Bindung von Reb1p an eine zweite Bindestelle, ca. 215bp stromaufwärts der 35S rDNA Transkriptionsstartstelle (Morrow et al., 1989), wurde mit möglichen Änderungen der Chromatinstruktur in Zusammenhang gebracht, die über das Wechselspiel von Enhancer, Promotor und Transkriptionsfaktoren die Transkription regulieren könnten (Kulkens et al., 1992). Eine andere Studie hingegen schließt eine unmittelbare Beteiligung von Reb1p bei der Pol I Transkription aus (Bordi et al., 2001). Rpa12p, die kleine Untereinheit der Pol I, die zu den Untereinheiten Rpb9p von Pol II und Rpc11p von Pol III, die beide in die Transkriptionstermination involviert sind, homolog ist, spielt möglicherweise auch bei der Termination der Pol I Transkription eine Rolle (Prescott et al., 2004). Nach der Termination und dem Abdissoziieren der Pol I von der rDNA, bleibt die Polymerase ohne einen Austausch ihrer Untereinheiten vorzunehmen intakt und steht für weitere Transkriptionsrunden zur Verfügung (Schneider and Nomura, 2004).

Hmo1p, ist ein sequenzunspezifisches HMG-Box Protein, das als „funktionelles“ Homolog des rDNA Transkriptionsfaktors UBF (*upstream binding factor*) diskutiert wird. Wie der humane UBF assoziiert Hmo1p mit dem gesamten rDNA Lokus und neben seiner Rolle in der Transkription wird dieses Protein für die Prozessierung der rRNA benötigt (Hall et al., 2006). Hmo1p agiert synergistisch mit Rpa49p und scheint die Transkription der rRNA Gene zu steigern (Gadal et al., 2002). Vor kurzem konnte gezeigt werden, daß es kooperativ mit den Transkriptionsfaktoren Rap1p und Fhl1p an die Promotoren vieler ribosomaler Proteine (rPs) bindet (Martin et al., 2004; Schawalder et al., 2004; Wade et al., 2004). Die Bindung dieser Faktoren ist für eine effiziente Transkription der rPs notwendig. Hmo1p könnte somit eine Rolle bei der Koordination der Transkription ribosomaler und der für ribosomale Proteine codierenden Gene spielen (Hall et al., 2006). Zur Übersicht siehe Comai, 2004; Moss, 2004; Moss et al., 2007; Russell and Zomerdijs, 2005.

Die Transkriptionsmaschinerie von Pol II und Pol III ist in Hefen und Vertebraten weitgehend konserviert. Obwohl UAF und UBF, sowie CF und SL1 ähnliche biochemische Eigenschaften besitzen, besteht der grundlegende Unterschied der Pol I Transkription von Hefen und Vertebraten darin, daß in der Hefe bisher keinerlei Homologe für SL1 und UBF gefunden wurden (Comai, 2004). Die Transkriptionsinitiation läuft bei den Säugern jedoch auf ähnliche Weise ab. UBF, ein Dimer, bindet über seine HMG-Boxen an das *upstream control element* (UCE), woraufhin der Selektivitätsfaktor (SL1; in der Maus: TIF-IB), bestehend aus TBP und mindestens drei TBP-assoziierten Faktoren (TAF), TAF₄₈, TAF_{68/63} und TAF_{95/110}, an CE bindet. TAF₆₈ ist zu Rrn7p und TAF₄₈ zu Rrn11p des *core* Faktors der Hefe homolog (Russell and Zomerdijs, 2005 und Referenzen darin). TBP besitzt die Fähigkeit zur Bildung eines *Enhanceosoms*, bei dem ein UBF-Dimer die DNA mit

einer Länge von 140bp einmal um 360° windet (Bazett-Jones et al., 1994), so daß eine nukleosomenähnliche Struktur entsteht, und somit die Interaktion von SL1 und UBF unterstützt. Die Bindung von UBF ist jedoch nicht nur auf die regulatorischen Sequenzen der rDNA beschränkt, es ist wie Hmo1p vielmehr über die gesamte rDNA verteilt (O'Sullivan et al., 2002). Das unterscheidet dieses von einem „klassischen“ *Enhanceosom*, welches nur an den Enhancer bindet und die Initiation der Transkription beeinflusst. Der Phosphorylierungszustand von UBF spielt hingegen bei der Elongation der Pol I Transkription eine Rolle (s. 1.3.2.). Im Gegensatz zur Pol II Transkription bindet TBP nicht an die DNA und die Promotorerkennung erfolgt anstelle von TBP über die TAFs (Grummt, 2003). Pol I, die wiederum mit hRrn3p (Maus: TIF-IA) assoziiert ist (Bodem et al., 2000; Moorefield et al., 2000), wird daraufhin durch die Interaktionen der SL1 Untereinheiten TAF_I63 und TAF_I110 und Rrn3p, sowie des UBFs mit PAF53 (Homolog von Rpa49p der Hefe), rekrutiert (Hanada et al., 1996; Seither et al., 1997). In neueren Studien wurde TAF_I41 als weiterer Bestandteil von transkriptionell aktivem SL1 identifiziert. SL1, inklusive der TAF_I41 Untereinheit, könnte eine Rolle bei der Rekrutierung von Pol I und somit bei der Ausbildung des Preinitiationskomplexes *in vivo* spielen (Gorski et al., 2007). In der Maus ist zusätzlich noch der Faktor TIF-IC mit Pol I assoziiert, der sowohl in die Transkriptionsinitiation, sowie die Elongation involviert ist (Schnapp et al., 1994). Die Transkription wird durch den Transkriptionsterminationsfaktor I TTF-I beendet (Jansa and Grummt, 1999). Zur Übersicht siehe Comai, 2004; Moss, 2004; Moss et al., 2007; Russell and Zomerdijs, 2005.

1.3. Regulation der RNA Polymerase I Transkription

Als Reaktion auf intra- wie extrazelluläre Wachstumsignale wie Nährstoffangebot, Temperatur oder Streß wird die Ribosomenbiogenese streng reguliert (Gasch et al., 2000; Ju and Warner, 1994; Warner, 1999). Der TOR (*target of rapamycin*) Kinase Signaltransduktionsweg ist ein wichtiger Signaltransduktionsweg für die Modulation der rRNA, der ribosomalen Proteine und der 5S rRNA als Reaktion auf die Verfügbarkeit von Nährstoffen. Er ist bei Nährstoffverfügbarkeit aktiv und bei Nährstoffmangel inaktiv. TOR wird durch das Antibiotikum Rapamycin inaktiviert, wobei der Effekt eines Nährstoffmangels imitiert wird (Crespo and Hall, 2002). Die Unterdrückung des TOR Signaltransduktionsweges durch Rapamycin reprimiert die rDNA Transkription von Pol I und Pol III, sowie die Pol II Transkription ribosomaler Proteine (Powers and Walter, 1999; Zaragoza et al., 1998), wobei über die genaue Regulation der Synthese ribosomaler Komponenten durch TOR noch wenig bekannt ist. Während die TOR Inaktivierung bei der Pol I Transkription die Bildung des Rrn3p-Pol I Initiationskomplexes verhindert (Claypool et al., 2004), werden bei der Pol II abhängigen Transkription der ribosomalen Proteine

Transkriptionsfaktoren in ihrer Funktion beeinflusst (Jorgensen et al., 2004; Martin et al., 2004; Schawalder et al., 2004; Wade et al., 2004).

Die Regulation der Ribosomenbiogenese auf Ebene der rRNA Synthese ist ein Objekt intensiver Forschungsbemühungen. Laferte et al., 2006 konnten vor kurzem zeigen, daß die Genexpression ribosomaler Proteine in *S. cerevisiae* von der rRNA Syntheserate abhängt. Lange Zeit wurde darüber diskutiert, ob die Transkription durch die Anzahl aktiver rRNA Gene oder die Transkriptionsrate aktiver rRNA Gene reguliert würde. Da die Anzahl der aktiven rRNA Gene auch nach dem Abschalten der Pol I Transkription weitgehend konstant bleibt (Claypool et al., 2004; Conconi et al., 1989; Fahy et al., 2005; French et al., 2003) ist offensichtlich nur deren Transkriptionsrate von Bedeutung. Im Gegensatz zu den für Proteine codierenden Genen, wird die Pol I Transkription nur auf Ebene der Transkriptionsinitiation und -Elongation reguliert.

1.3.1. Regulation der Transkriptionsinitiation

Die Regulation der rRNA-Synthese durch Wachstumssignale, wie Nährstoffangebot, Temperatur oder Streß ist evolutiv hoch konserviert und wurde in Bakterien, Hefen, Pflanzen und Vertebraten gefunden.

Für die Initiation der Transkription durch Pol I ist die Assoziation der Pol I mit Rrn3p essentiell, wobei nur ein geringer Teil ($< 2\%$) der Pol I komplexiert vorliegt. Fehlt dieser transkriptionskompetente Pol I-Rrn3p Komplex, wie es z.B. während der stationären Phase der Fall ist, wird die rDNA Transkription herunter reguliert (Milkereit and Tschochner, 1998). Für die Bildung des funktionellen Pol I-Rrn3p-Komplexes, ist die Phosphorylierung der Pol I erforderlich. Rrn3p liegt ebenfalls in phosphorylierter Form vor, die Phosphorylierung scheint jedoch in der Hefe, im Gegensatz zu den Säugern, keine Voraussetzung für die Initiation der Transkription zu sein (Fath et al., 2001). Kurz nach der Transkriptionsinitiation verläßt Rrn3p den Komplex und seine Initiationsfähigkeit ist erschöpft (Milkereit and Tschochner, 1998). Für die Elongation ist die Dissoziation des Pol I-Rrn3p Komplexes jedoch nicht erforderlich (Laferte et al., 2006).

Nährstoffmangel oder Inhibitoren der Proteinbiosynthese führen bei Säugern wie Hefen gleichermaßen zur Inaktivierung von Rrn3p. Rrn3p ist also der Schlüsselregulator der rDNA Transkription. In Säugerzellen wird die Pol I Transkription durch die mTOR und MAP-Kinase (EGF (*epidermal growth factor*) und ERK (*extracellular signal-regulated kinase*)) Signaltransduktionswege über hRrn3p beeinflusst (Russell and Zomerdijs, 2005). In Hefezellen wird das Eintreten in die stationäre Phase durch den RAS/Protein Kinase A und den TOR Kinase Signaltransduktionsweg reguliert (Thevelein and de Winder, 1999). Rapamycinbehandlung von Hefezellen (Claypool et al., 2004) und das Eintreten in die stationäre Phase (Milkereit and Tschochner, 1998) reduzieren die rRNA-Syntheserate etwa auf ein Zehntel, ebenso die Mengen an Pol I und Rrn3p. „Miller *spread*“ Analysen der rRNA Gene zeigen, daß Rapamycin die Anzahl der Polymerasen eines einzelnen rRNA Gens

reduziert, die Anzahl an aktiv transkribierten rRNA Genen jedoch nicht verändert (Claypool et al., 2004).

Weder in Hefen noch in Säugern wurde bisher eine vom Zellwachstum abhängige Regulation der Initiationskomplexe UAF/CF und SL1 gefunden. Im Gegensatz zu den Hefen wird die Transkription in Säugerzellen auch in Abhängigkeit des Zellzykluses reguliert. Die Transkription ist in der S und G2 Phase am höchsten, wird während der Mitose abgeschaltet und beginnt langsam wieder in der G1 Phase. Änderungen im Phosphorylierungsmuster von UBF spielen dabei eine Schlüsselrolle. UBF kann an den beiden N-terminalen HMG1-Boxen durch ERK1/2 reversibel phosphoryliert werden, was für die Initiation der Transkription nötig ist. Jüngste Ergebnisse zeigen, daß diese Phosphorylierung auch die Transkriptionselongation reguliert (s. 1.3.2.). Die Phosphorylierung des C-Terminuses von UBF durch die Casein Kinase II erleichtert die Interaktion von UBF mit SL1 (Tuan et al., 1999). In ruhenden Zellen ist UBF hypophosphoryliert und transkriptionell inaktiv (Voit et al., 1995; Voit et al., 1992). Die Acetylierung des UBFs durch die Histonacetyltransferase CBP steigert die Pol I Aktivität (Hirschler-Laszkiewicz et al., 2001). SL1 kann ebenfalls phosphoryliert und acetyliert werden. Die Acetylierung von TAF₁68 durch PCAF erleichtert die Bindung des TAF₁68 an die DNA, wohingegen seine Deacetylierung durch mSir2a die Pol I Transkription reprimiert (Muth et al., 2001). TAF₁110 ist während der Mitose durch CDK1/Cyklin B phosphoryliert, wodurch die Fähigkeit des SL1 zur Interaktion mit UBF reprimiert wird und die Transkription abgestellt wird (Heix et al., 1998). Zur Übersicht siehe Grummt, 2003.

1.3.2. Regulation der Transkriptionselongation

„Miller *spread*“ Analysen der rRNA Gene zeigen, daß die rDNA mit einer außerordentlich hohen Dichte an Pol I Komplexen beladen ist (Miller and Beatty, 1969). Während die meisten Pol II transkribierten Gene mit nur einer Polymerase assoziiert sind (Jackson et al., 1998), befindet sich auf der rDNA schätzungsweise alle 110-130 Nukleotide ein Pol I Komplex (French et al., 2003). Dies schließt eine großartige Steigerung der Beladung der Gene mit Pol I aus. In Tierzellen wurde tatsächlich beobachtet, daß die Anzahl der Pol I Komplexe an der rDNA trotz großen Unterschieden in der rRNA Synthese nahezu konstant bleibt, was dafür spricht, daß die Elongation *in vivo* reguliert werden muß (Moss et al., 2007; Stefanovsky et al., 2006b).

Eine bemerkenswerte Ausnahme bildet jedoch *S. cerevisiae*, die ihre rRNA Synthese durch das Anpassen der Polymerasedichte an aktiven Genen regulieren kann. So produzieren beispielsweise exponentiell wachsende Hefezellen eines Stammes (NOY886), der nur ~42 rDNA Kopien besitzt, die gleiche rRNA Menge und zeigen ein ähnliches Wachstumsverhalten auf wie ein Wildtypstamm mit ~143 rDNA Kopien, von denen etwa die Hälfte aktiv ist ($\sim 50 \pm 20$ Polymerasen/Gen, d.h. eine Polymerase/ ~ 132 nt; Abb. 1-4). Im 42- Kopienstamm hingegen sind alle rRNA Gene aktiv ($\sim 100 \pm 29$ Polymerasen/Gen, d.h.

eine Polymerase/ ~ 67 nt). Die Anzahl der aktiven Polymerasen pro Nukleus ist demnach die gleiche, obwohl die Anzahl der aktiven Gene um das zweifache variiert. Dies zeigt, daß die Transkription nicht von der Anzahl aktiver Gene, sondern von der Gesamtinitiationsrate bestimmt wird (French et al., 2003). Ein weiteres Beispiel ist der Eintritt der Hefezellen in die stationäre Phase, bei dem die Stilllegung der Transkription mit der Reduktion der Anzahl an transkribierenden Polymerasen pro Gen korreliert (Dammann et al., 1993; Sandmeier et al., 2002), wobei die Anzahl der aktiven rRNA Gene zeitgleich reduziert wird. Letztere Resultate beruhen auf Ergebnissen von Psoralenvernetzungsanalysen (s. 1.4.3) mit ganzen Hefezellen. Werden hingegen Nuklei aus stationären Zellen mit Psoralen vernetzt, ist die beobachtete Reduktion aktiver rRNA Gene deutlich geringer (Fahy et al., 2005, s. 1.4.3.). Für die Stilllegung der rRNA Gene beim Eintritt in die stationäre Phase wird die Histondeacetylase Rpd3p benötigt. Deren Verlust verhindert den Übergang von rRNA Genen von einem Psoralen zugänglichen zu einem Psoralen unzugänglichen Zustand, er verhindert jedoch nicht, daß die Transkription abgeschaltet wird. Dies deutet darauf hin, daß die Transkriptionsregulation und die über Psoralenzugänglichkeit gemessene Geninaktivierung zwei voneinander unabhängigen Mechanismen unterliegen (Sandmeier et al., 2002).

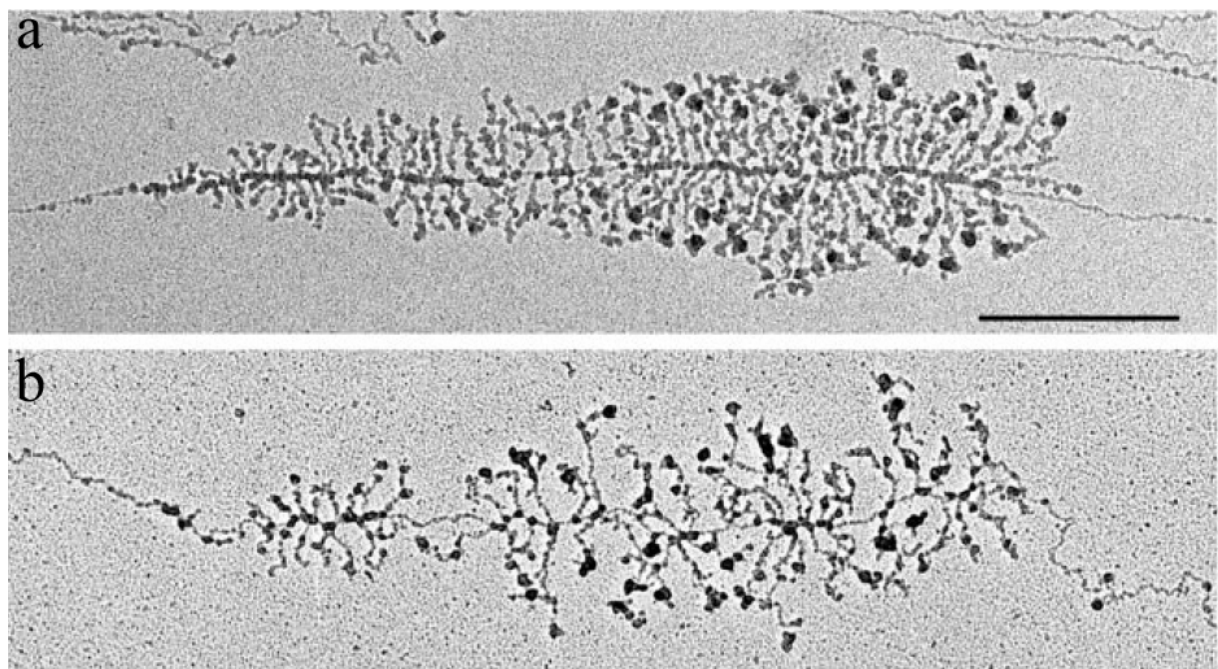


Abb. 1-4: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von transkribierten rRNA Genen im (a) ~ 42 Kopienstamm und (b) Wildtypstamm. Die rRNA Gene des 42 Kopienstammes ist dichter mit Polymerasen besetzt als der Wildtypstamm. Der Balken entspricht $0,5\mu\text{m}$; aus French et al., 2003.

Für Vertebraten hingegen wird seit einiger Zeit diskutiert, daß die Transkription auf Ebene der Elongation reguliert werden müsse, indem die Geschwindigkeit der Elongation durch nachfolgende Prozesse wie Prozessierung der rRNA oder den Ribosomenzusammenbau kontrolliert wird (Moss et al., 2006). In Säugern besitzt UBF die Fähigkeit zur Bildung eines *Enhanceosoms* (Bazett-Jones et al., 1994; s.1.2.2.). Kürzlich konnte gezeigt werden, daß die

Phosphorylierung von UBF durch ERK das *Enhanceosom* umgestaltet und dadurch tatsächlich die Transkriptionselongationsrate der Pol I Komplexe durch das nukleoläre Chromatin bestimmt (Abb. 1-5; Stefanovsky et al., 2006a; Stefanovsky et al., 2006b). Die Pol I Transkription der Säuger wird durch EGF aktiviert. Diese Reaktion wird wahrscheinlich durch die direkte Interaktion von ERK mit den HMG-Boxen, die es phosphoryliert, vermittelt (Stefanovsky et al., 2001).

Mutationen in den ERK-Stellen von UBF inhibieren dessen normale Funktion und blockieren die Aktivierung der ribosomalen Transkription durch EGF. Die Phosphorylierung durch ERK, sowie Mutationen, die diese Phosphorylierung simulieren, vermindern die Affinität der einzelnen

HMG-Boxen des UBFs für lineare rDNA. Sie haben aber nur einen geringen oder keinen Effekt auf das Bindevormögen von diesen HMG-Boxen an gekrümmte DNA-Strukturen und beeinflussen die Gesamtbindekonstante von UBF an die DNA nicht. Elektronenspektroskopische Untersuchungen ergaben, daß Stämme mit Mutationen in den ERK-Stellen des UBFs das charakteristische *Looping* der DNA zum *Enhanceosom* nicht induzieren und UBF mit weniger als der Hälfte der *enhanceosomal*en DNA assoziiert. Die Phosphorylierung von UBF durch ERK verhindert dessen Bindung über seine ersten zwei HMG-Boxen an die DNA, was zu einer kooperativen Entfaltung des *Enhanceosoms* führt (Stefanovsky et al., 2006a; Stefanovsky et al., 2006b). Somit scheint die *enhanceosomale* DNA das Passieren elongierender Pol I Komplexe zu blockieren und die Umgestaltung des *Enhanceosoms* nach der Phosphorylierung der HMG-Boxen das Fortsetzen der Elongation zu ermöglichen.

Neuerdings gibt es Hinweise darauf, daß die Transkription in *S. cerevisiae* möglicherweise auch auf Ebene der Elongation reguliert werden könnte. Die Pol II Elongationsfaktoren Spt4 und Spt5 sind vermutlich als Spt4/5 Komplex ebenfalls in die Transkriptionselongation von Pol I und evtl. die rRNA Prozessierung involviert. Demnach führt die Deletion von Spt4 zu einer Beeinträchtigung der Elongationseffizienz von Pol I, indem die Prozessivität des Enzyms reduziert wird. Es wurde vorgeschlagen, daß die verminderte Elongationsrate zu Defekten bei der rRNA Prozessierung und dem Ribosomenzusammenbau führt (Schneider et al., 2006). Zwei weitere Faktoren, die die Pol II Elongation beeinflussen, wurden bereits

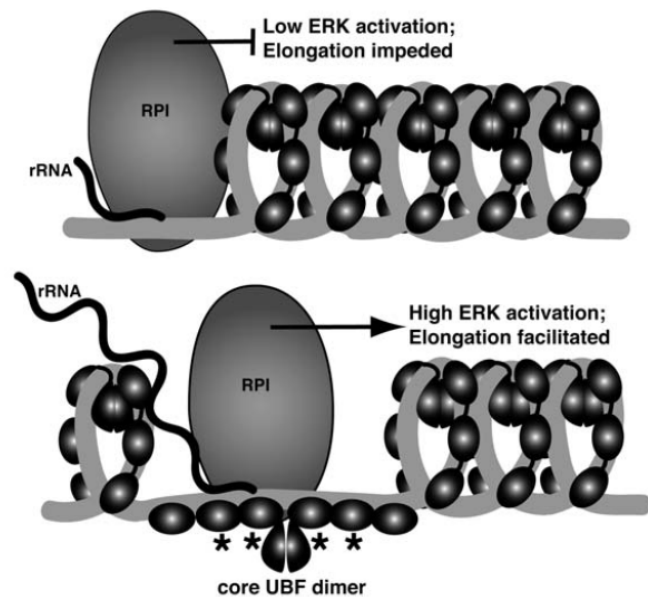


Abb. 1-5: Modell der Elongationsregulation durch UBF-Phosphorylierung. Oben sind mehrere *Enhanceosome* zu sehen, die das Passieren der Pol I (RPI) verhindern, wohingegen unten die lokale Entfaltung des *Enhanceosoms* durch die ERK-vermittelte Phosphorylierung von UBF (*) die Elongation ermöglicht. Die DNA ist in hellgrau, die *core*-UBF-Dimere in dunkelgrau und das Transkript in schwarz dargestellt. Aus Stefanovsky et al., 2006b.

früher mit der Pol I Elongation in Zusammenhang gebracht. Zum einen Fcp1p, eine Phosphatase, die die C-terminale Domäne (CTD) von Pol II dephosphoryliert und für die Pol II Transkription benötigt wird und zum anderen die CTD Kinase 1 (CTDK-1; Bouchoux et al., 2004; Fath et al., 2004).

1.4. Chromatinstruktur der rDNA

1.4.1. Chromatinzustände der rDNA

Frühe Studien aus den 1970er und 80er Jahren führten zu der Hypothese von zwei in der gleichen Zelle koexistierenden rDNA Zuständen (Elgin and Weintraub, 1975; Foe et al., 1976; Franke et al., 1976; Gottesfeld et al., 1976; Higashinakagawa et al., 1977; Labhart and Koller, 1982; Laird et al., 1976; Mathis and Gorovsky, 1976; Matsui and Busch, 1977; Ness et al., 1983; Piper et al., 1976; Reeder, 1975; Reeves, 1976; Reeves, 1977; Reeves, 1978a; Reeves, 1978b; Reeves and Jones, 1976; Weintraub and Groudine, 1976). Diese Hypothese bestätigte sich in den folgenden Jahrzehnten durch grundlegende Arbeiten des Labors von José Sogo. MNase Verdaue isolierter Nuklei zeigten ein nukleosomales Muster, das von einem „Schmier“ überlagert wurde, was für die Koexistenz verschiedener Chromatinformen sprach (Conconi, 1987). Diese Resultate zeigen jedoch auch, daß der MNase Verdau zur Untersuchung der ribosomalen Chromatinstruktur in seiner Aussagekraft limitiert ist: Das beobachtete Protektionsmuster repräsentiert die DNA-Zugänglichkeit in einer Mischung verschiedener Chromatinformen, die nicht eindeutig zugeordnet werden können. Desweiteren ist es mit Nukleaseverdauen nicht möglich, die Faktoren zu bestimmen, die die DNA vor Nukleasen schützen. Neben den Nukleosomen kommen alle anderen DNA-Bindeproteine (z.B. Transkriptionsfaktoren) in Betracht. Eine Methode, die zwischen aktivem und inaktivem Chromatinzustand unterscheiden kann, ist die Psoralenvernetzung (Abb. 1-6). Psoralen ist ein aus drei Ringen bestehendes Furocumarin, das von Pflanzen der Gattung der *Psoralea* produziert wird. Es kann in doppelsträngige DNA interkalieren, und nach der Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (UVA, z.B. 288nm) kovalente Bindungen mit zwei Thymidinen unterschiedlicher DNA-Stränge eingehen und somit zur Vernetzung der DNA-Stränge untereinander führen. Der Psoraleneinbau geschieht bevorzugt in den Linkerregionen zwischen Nukleosomen (Cech and Pardue, 1977) und in nukleosomenfreien Regionen, wie Promotoren, Enhancern oder rDNA codierender Regionen, ohne dabei die Nukleosomenstruktur oder höhere Chromatinstrukturen zu beeinträchtigen (Conconi et al., 1984; Gale and Smerdon, 1988). Nach der Aufreinigung der DNA bleibt die Signatur des Chromatins in Form einer charakteristischen Psoralenvernetzung erhalten. Wird die DNA anschließend mit einer Restriktionsendonuklease fragmentiert, über ein Agarosegel aufgetrennt und mittels Southernblot analysiert, so kann hochvernetzter DNA von weniger stark vernetzter DNA durch ein unterschiedliches Laufverhalten unterschieden werden.

Werden solche Untersuchungen mit Fragmenten aus dem codierenden Bereich des rDNA Lokuses durchgeführt, so können zwei Banden beobachtet werden, eine schneller migrierende (*f-band*, *fast migrating band*), die aktive nukleosomale, schwach vernetzte rDNA Population repräsentierende und eine langsamer migrierende Bande (*s-band*, *slow migrating band*), die die aktive nukleosomenfreie, stark vernetzte rDNA repräsentiert. Dammann et al., 1993 haben die Banden für die aktive und inaktive Population aus einem Agarosegel isoliert und einzeln unter dem Elektronenmikroskop analysiert. Für die aktive Bande sahen sie eine stark vernetzte doppelsträngige DNA, wohingegen sie für die inaktive Fraktion einzelsträngige blasenartige Strukturen mit regelmäßigen Abständen sahen, wie es für Nukleosomen charakteristisch ist. Um herauszufinden, ob die *s*-Bande tatsächlich die transkriptionell aktive DNA enthält, markierten sie die RNA unter *run-on* Bedingungen mit $\alpha^{32}\text{P}$ -CTP und $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP und vernetzten die Zellen anschließend mit Psoralen. Die DNA wurde linearisiert, im Agarosegel aufgetrennt und das Gel direkt analysiert. Nur die langsamer migrierende *s*-Bande war markiert, so saß sie bestätigen konnten, daß nur die stark psoralenzugängliche Fraktion transkriptionell aktive Gene enthält. Das Verhältnis der beiden Banden spiegelt das Verhältnis von aktiver zu inaktiver rDNA Population einer Zelle wider (Conconi et al., 1984; Conconi et al., 1989; Wellinger and Sogo, 1998). Es ist stark variabel und vom Organismus und Zelltyp abhängig, die aktive Fraktion kann 20% bis hin zu 70% stellen (Toussaint et al., 2005).

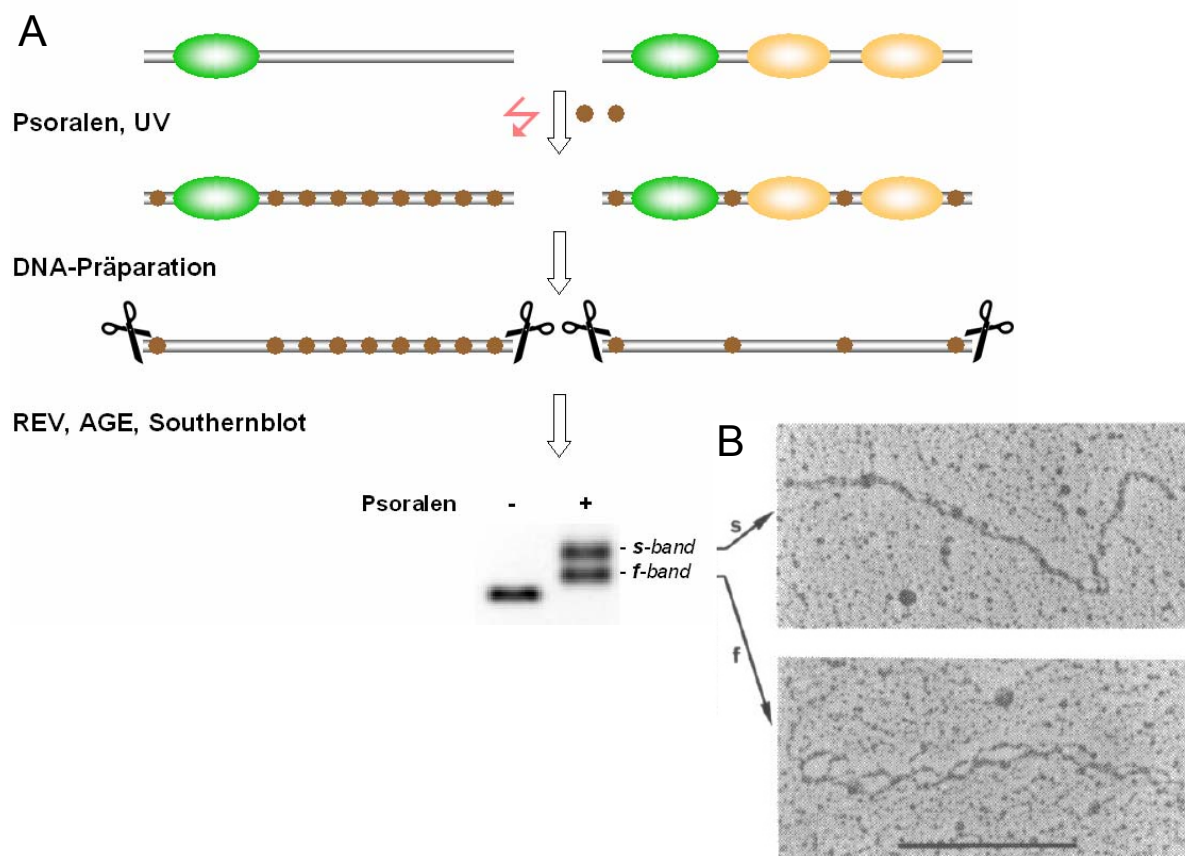


Abb. 1-6: **(A)** Schematische Darstellung der Psoralvernetzung und **(B)** elektronenmikroskopische Aufnahmen der langsam (*s-band*) und schnell (*f-band*) migrierenden Banden. Der Balken entspricht 1kb; aus Dammann et al., 1993.

1.4.2. Stillegung der rDNA (*rDNA silencing*)

In *S.cerevisiae* sind nur drei Loci bekannt, an denen Genstillegung stattfindet, die stillen Paarungstyploci, die Telomere und die rDNA. Die Stillegung der rDNA unterdrückt die übermäßige Rekombination von rRNA Genen (Gottlieb and Esposito, 1989) und die Transkription von Pol II transkribierten Genen, die in den rDNA Lokus integriert wurden (Bryk et al., 1997; Fritze et al., 1997; Smith and Boeke, 1997). Die Stillegung der Pol II transkribierten Gene am rDNA Lokus wird durch den RENT Komplex (*regulator of nucleolar silencing and telophase exit*) vermittelt, der Sir2p, eine NAD-abhängige Protein- und Histondeacetylase enthält, die für die Deacetylierung der Lysine 9 und 14 des Histons H3 und Lysin 16 des Histons H4 verantwortlich ist (Fritze et al., 1997; Huang and Moazed, 2003; Imai et al., 2000). Diese Deacetylierung ist für die Ausbildung des eukaryotischen Heterochromatins essentiell. Für die rDNA Stillegung wird zusätzlich Set1p, eine Histonmethyltransferase benötigt (Briggs et al., 2001; Bryk et al., 2002). Als weiterer Faktor, der entweder direkt oder indirekt in die rDNA Stillegung involviert ist, wurde der Swi/Snf-Komplex, ein ATP-abhängiger Chromatinumgestaltungskomplex (*remodeling* Komplex), der die Transkription aktivieren oder reprimieren kann, identifiziert. Die Stillegung durch den Swi/Snf-Komplex scheint durch einen von Sir2p und Set1p unabhängigen Mechanismus vermittelt zu werden. Swi/Snf wird auch für die Stillegung der Telomere, nicht jedoch für die der stillen Paarungstyploci benötigt (Dror and Winston, 2004).

Pol II transkribierte Reportergene, die in inaktive rDNA Gene, denen der Pol I Promotor fehlte, integriert wurden, wurden im chromosomalen Kontext nicht stillgelegt (Cioci et al., 2003). Die Stillegung von Reportergenen war in Stämmen mit ~25 rDNA Kopien, die alle transkriptionell aktiv waren, wesentlich stärker ausgeprägt als in Kontrollstämmen mit ~190 Kopien. Dies führte zum Modell der wechselseitigen Beziehung von RNA Polymerase I und II bei der Genexpression (*reciprocal silencing*): rDNA Chromatinstrukturen, die die Pol I Transkription der rRNA Gene begünstigen, vermindern die Genexpression von Pol II transkribierten Reportern oder legen sie still und umgekehrt (Cioci et al., 2003).

Während am rDNA Lokus von *S. cerevisiae* bisher nur die Stillegung Pol II transkribierter Gene gefunden wurde, werden bei höheren Eukaryoten die Pol I transkribierten rRNA Gene stillgelegt. In der Maus wird die Stillegung von rRNA Genen durch NoRC (*nucleolar remodeling complex*) vermittelt, wobei NoRC mit dem Transkriptionsterminationsfaktor TTF-I interagiert. Diese Interaktion ist für die Bindung von TTF-I an eine promotornahe Bindestelle und die Rekrutierung von NoRC an den Promotor verantwortlich. Nach der Rekrutierung verändert NoRC die Position eines promotorgebundenen Nukleosoms und unterdrückt somit die Pol I Transkription (Längst et al., 1997). NoRC spielt somit eine wichtige Rolle bei der Stillegung der rRNA Gene höherer Eukaryoten und trägt durch Interaktionen mit DNA- und histonmodifizierenden Enzymen zur Erhaltung dieser Stillegung bei (Strohner et al., 2004). In inaktiven Genen korreliert die Methylierung des Promotors mit hypoacetyliertem Histon H4 und der Methylierung von Lysin 9 des Histons H3 (Santoro et al., 2002). In *S. cerevisiae* gibt es weder die Methylierung der DNA noch die von H3K9.

1.4.3. Organisation des rDNA Lokuses in *S. cerevisiae*

Die rRNA Gene liegen also gleichzeitig in mindestens zwei funktionellen Zuständen in der Zelle vor, als aktiv transkribiertes, nukleosomenfreies Euchromatin und als inaktives, nukleosomales Chromatin. Die aktiven und inaktiven rDNA Kopien sind zufällig über den gesamten rDNA Lokus verteilt, wobei immer ein bis drei Gene eine aktive Gruppe bilden (Dammann et al., 1995). Bei der Replikation transkriptionell aktiver Gene entstehen zwei Tochterstränge mit regelmäßig angeordneten Nukleosomen (Lucchini and Sogo, 1995), die sich direkt nach der Replikation innerhalb von Sekunden an der neu synthetisierten DNA positionieren (Lucchini et al., 2001). Der nichtnukleosomale Anteil der rRNA Gene muß also nach jeder Replikationsrunde wiederhergestellt werden, so daß alle rRNA Gene, unabhängig von ihrem Ausgangszustand, die gleiche Wahrscheinlichkeit zur Aktivierung besitzen. In *S. cerevisiae* ist nur ein kleiner Teil der autonomen Replikationssequenzen (ARS) als Replikationsursprung aktiv und die Replikation kann nur stromabwärts von transkriptionell aktiven Genen initiiert werden (Muller et al., 2000). Die Replikation startet bidirektionell, wobei die vom Promotor stromaufwärts wandernde Replikationsgabel am 3'Ende aktiver rRNA Gene an der Replikationsgabelbarriere (RFB) gestoppt wird. Die stromabwärts wandernde Replikationsgabel setzt ihre Arbeit fort, bis sie auf die erste angehaltene Replikationsgabel stößt (Lucchini and Sogo, 1994). Somit werden aktive und inaktive rRNA Gene in der gleichen Richtung wie die rDNA Transkription repliziert. Die intergenen *Spacer*, die inaktive rDNA Kopien flankieren, sind in regelmäßigen Abständen mit Nukleosomen besetzt, wohingegen die *Spacer*, die aktive Gene flankieren, sowohl mit Nukleosomen als auch regulatorischen Proteinen assoziiert sind (Dammann et al., 1995; Vogelauer et al., 1998). Da nach der DNA-Replikation alle *Spacer* nukleosomal sind, muß auch die Bindung aller regulatorischen Proteine hinterher wiederhergestellt werden (Lucchini and Sogo, 1994). Am 3'Ende der 35S rDNA, ca. 2kb stromabwärts vom Promotor der nächsten Transkriptionseinheit, liegt der Enhancer. Psoralenanalysen zeigten, daß der Enhancer am 3'Ende eines jeden aktiv transkribierten Genes frei von Nukleosomen ist, wohingegen auf inaktive, nukleosomale Gene ein regelmäßig mit Nukleosomen besetzter Enhancer folgt. Die offene Chromatinstruktur von Enhancern ist von der Transkription jedoch unabhängig, da in Pol I Mutanten, ebenfalls nukleosomenfreie Enhancer gefunden wurden. Dies deutet auf spezifische Protein-DNA Interaktionen an den Enhancern vor Beginn der Transkription hin. Zusätzlich fand man in diesen Mutanten, daß alle rDNA codierenden Sequenzen nukleosomal sind, was ein Hinweis darauf ist, daß für die Ausbildung der offenen Chromatinstruktur elongierende Pol I Komplexe benötigt werden (Dammann et al., 1995).

In exponentiell wachsenden Hefezellen sind etwa 50% der Gene aktiv. Beim Eintritt der Zellen in die stationäre Phase sinkt die Pol I Transkription der rRNA Gene drastisch, wobei die Anzahl der aktiven rRNA Gene nahezu konstant bleibt. So konnte bei der Psoralenvernetzung ganzer Hefezellen eine Reduktion der aktiven rRNA Gene von 10-17% gemessen werden (Dammann et al., 1993; Sandmeier et al., 2002), wofür Rpd3p erforderlich

ist. Fahy et al., 2005 detektierten für psoralenvernetzte Nuklei hingegen nur eine reproduzierbare Reduktion von vier bzw. 6% in der frühen bzw. späten stationären Phase. Die Differenz in der Abnahme ist vermutlich auf unterschiedliche Vernetzungseffizienzen ganzer Zellen und Nuklei zurückzuführen (Fahy et al., 2005). Nachdem die Zellen in frischem Medium resuspendiert wurden, stieg die Transkription innerhalb weniger Minuten wieder an und das Verhältnis von aktiven zu inaktiven rDNA Kopien wurde wiederhergestellt (Fahy et al., 2005). Auch das Abschalten der Pol I Transkription durch Wachstumsfaktoren, wie etwa die Behandlung mit Rapamycin ändert am Verhältnis von offenen zu geschlossenen rRNA Genen nichts (Claypool et al., 2004). Dies zeigt, daß der TOR-Signaltransduktionsweg nicht am Wechsel der rRNA Gene vom offenen in den geschlossenen Zustand beteiligt ist und somit von Rpd3p unabhängig sein sollte. Gestützt wird diese Annahme durch zahlreiche Experimente, wie Puls-labeling oder elektronenmikroskopische Analysen des rDNA Lokuses von Oakes et al., 2006a, die zeigen konnten, daß Rpd3p für die Inaktivierung der Pol I Transkription durch Rapamycin nicht benötigt wird.

In exponentiell wachsenden Hefen liegen die rRNA Gene also immer in zwei Chromatinformen vor, der offenen, psoralenzugänglichen, transkriptionell aktiven und der inaktiven, psoralenunzugänglichen Form. MNase Studien haben gezeigt, daß die geschlossene Form nukleosomal ist und die offene Fraktion eine andere Chromatinstruktur besitzt. Es ist inzwischen weitgehend akzeptiert, daß transkriptionell aktive rDNA frei von regulären Nukleosomen ist. Analysen mit *in vitro* assembliertem Chromatin haben ergeben, daß alleine die Histone H3/H4 ausreichen, um die DNA vor Psoralenzugänglichkeit zu schützen (Sogo et al., 1984). Die codierenden Sequenzen transkriptionell aktiver rRNA Gene könnten also frei von den meisten Nukleosomen sein und nur mit Proteinen, die an der Pol I Transkription beteiligt sind, assoziiert sein. Neuere Studien besagen hingegen, daß die Histone H3 und H4 für die Pol I Transkription benötigt werden, denn ihre Deletion führt zur Unterdrückung der Transkription, nicht nur auf Ebene der Initiation (als Komponenten von UAF), sondern auch auf Ebene der Elongation (Tongaonkar et al., 2005). Ein anderes Modell schlägt den Besatz der rDNA mit strukturell veränderten Nukleosomen, sogenannten Lexosomen, vor (Prior et al., 1983). Studien dazu zeigten, daß diese Lexosomen die gleiche Psoralenzugänglichkeit wie nukleosomenfreie DNA aufweisen (Conconi et al., 1984). Mit dem Psoralencrosslink kann also nicht geklärt werden, ob sich Lexosomen auf der aktiven rDNA befinden oder nicht. Somit bleibt die Frage nach der tatsächlichen Chromatinstruktur transkriptionell aktiver rRNA Gene bisher ungeklärt.

Nach dem Abschalten der Transkription wurde beobachtet, daß das Verhältnis von offenen zu geschlossenen rRNA Genen nahezu konstant bleibt (Claypool et al., 2004; Conconi et al., 1989; Fahy et al., 2005; Sandmeier et al., 2002). Auch hier stellt sich nun die Frage, inwiefern sich die Chromatinkomposition und -Struktur der offenen, transkriptionell inaktiven rRNA Gene gegenüber den transkriptionell aktiven Genen ändert. Bleiben Transkriptionsfaktoren, Komponenten der Pol I Transkriptionsmaschinerie, Nukleosomen

oder andere Proteine mit der psoralenzugänglichen Form assoziiert? Zur Beantwortung dieser Fragen stoßen die bekannten Methoden an ihre Grenzen und die Antworten stehen noch aus.

Zielstellung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Komposition und Struktur ribosomalen Chromatins in Abhängigkeit von der transkriptionellen Aktivität *in vivo* zu untersuchen.

Zum einen kamen klassische Methoden wie die Psoralenvernetzung und Endonukleaseverdaue mit der MNase zum Einsatz, um zu klären, ob und inwiefern sich die Chromatinstruktur nach dem Abschalten der Pol I Transkription ändert. Dazu wurden temperatursensitive Stämme mit Mutationen in der Pol I Transkriptionsmaschinerie (Rpa43p, Rrn3p) und Stämme mit Deletionen von Transkriptionsfaktoren (UAF, CF, Hmo1p) untersucht. Deletionen in UAF führen zum PSW von Pol I zu Pol II (siehe 1.2.2.; (Oakes et al., 1999; Siddiqi et al., 2001b; Siddiqi et al., 2001a; Vu et al., 1999)), so daß die Chromatinstruktur der rDNA auch in Abhängigkeit von der Pol II Transkription untersucht werden konnte.

Die präzise Lokalisierung einzelner chromatinassoziierter Faktoren wurde andererseits durch den Einsatz einer neuen Methode, dem ChEC (*chromatin endogenous cleavage*) möglich (Schmid et al., 2004). Diese Methode basiert auf der Expression eines C-terminalen Fusionsproteins, das aus dem Protein, dem das Interesse gilt, und einer MNase besteht. Zur Aktivierung benötigt die MNase Ca^{2+} , dessen cytoplasmatische und nukleäre Konzentration zur Aktivierung zu gering sind. Nach der Formaldehydvernetzung und Nukleipräparation, wird die MNase durch Ca^{2+} -Zugabe aktiviert, so daß die DNA an den Stellen geschnitten wird, an denen sie mit dem Fusionsprotein assoziiert ist. Die genaue Lokalisierung der Assoziationsstellen erfolgt mittels Southernblot und indireker Endmarkierung. Zur Analyse der Dynamik von Assoziations- und Dissoziationsereignissen an der rDNA, in Abhängigkeit von der transkriptionellen Aktivität, wurde eine Kollektion von Hefestämmen mit Fusionsproteinen bekannter rDNA-Bindeproteine etabliert.

Zur Klärung der Frage, mit welcher der beiden Chromatinformen bestimmte Faktoren assoziiert sind und inwiefern sich die Chromatinkomposition und/oder -Struktur der offenen, transkriptionell inaktiven rRNA Gene gegenüber den transkriptionell aktiven Genen ändert, sollte die Kombination von ChEC- und Psoralenvernetzungsanalysen beitragen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Die verwendeten Grob- und Feinchemikalien stammen, soweit nicht an entsprechender Stelle anders vermerkt, von ROTH, der SIGMA-ALDRICH Firmengruppe oder von MERCK und waren von analytischer Reinheit.

H₂O steht für deionisiertes Wasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage (ELGA).

2.1.2. Lösungen, Puffer und Medien

Es wurde immer, wenn nicht anders angegeben, H₂O als Lösungsmittel verwendet. Die pH-Werte beziehen sich auf Raumtemperatur. Prozentangaben sind immer, falls nicht anders angemerkt, als Masse pro Volumen (m/v) zu verstehen.

LB-Medium	Trypton (BD BIOSCIENCES)	10g/l
	Hefeextrakt (BD BIOSC.)	5g/l
	NaCl	5g/l
	1M NaOH	1ml/l
	Agar (Platten) (BD BIOSC.)	20g/l
	autoklaviert	
LB/Amp bzw. LB/Tet	Ampicillin bzw. Tetracyclin im respektiven LB-Medium; Zusatz nach Abkühlen auf ≤ 50°C	50µg/ml
Soc-Medium	Trypton	20g/l
	Hefeextrakt	5g/l
	NaCl	0,5g/l
	Glucose	3,6g/l
	KCl	2,5mM
	MgCl ₂	10mM
	1M NaOH	1ml/l
YPD	autoklaviert	
	Hefeextrakt	10g/l
	Pepton (BD BIOSCIENCES)	20g/l
	Glukose	20g/l
	Agar (Platten)	20g/l
	autoklaviert	

YPG	Hefeextrakt Pepton Galaktose Agar (Platten) autoklaviert	10g/l 20g/l 20g/l 20g/l
YPD/ Geneticin YPG/ Geneticin	Geneticin (Gibco) im respektiven YP-Medium; Zusatz nach Abkühlen auf $\leq 50^{\circ}\text{C}$	400mg/l
CSM (<i>complete supplement mixture</i>)	YNB (<i>yeast nitrogen base</i>) (SUNRISE SCIENCE PRODUCTS) Zucker CSM-dropout (BIO101 [®] SYSTEMS) Zusatz fehlender Aminosäuren Agar (Platten) autoklaviert	6,7g/l 20g/l nach Herstellerangabe 1x 20g/l
50x Lysin	Lysin	2,5mg/ml
50x Uracil	Uracil	1mg/ml
IR-Puffer	Tris-HCl pH 8 EDTA	50mM 20mM
IRN-Puffer	Tris-HCl pH 8 EDTA NaCl	50mM 20mM 0,5M
TAE-Puffer	Tris Essigsäure EDTA	40mM 20mM 1mM
TBE-Puffer	Tris Borsäure EDTA	90mM 90mM 1mM
10x Ladepuffer	Bromphenolblau Glycerin	0,25% 40%
TE-Puffer	Tris EDTA pH 7,5 oder 8 mit HCl	10mM 1mM
20x SSC	NaCl Trinatriumcitrat pH 7 mit HCl	3M 0,3M

50x Denhardts Reagens	BSA	10mg/ml
	Ficoll	10mg/ml
	Polyvinylpyrrolidon	10mg/ml
5x MaBS	Maleinsäure	0,5M
	NaCl	0,75M
	pH 7,5 mit NaOH	ca. 40g/l
Puffer A	Tris-HCl (pH 7,4)	15 mM
	Spermin	0,2mM
	Spermidin	0,5mM
	KCl	80mM
	EDTA	2mM
Puffer Ag	Puffer A ohne EDTA, mit EGTA	0,1mM
Proteaseinhibitoren 100x (PI)	Benzamidin	33mg/ml
	PMSF	17mg/ml
	Pepstatin A	137µg/ml
	Leupeptin	28,4µg/ml
	Chymostatin	200µg/ml
4x <i>Upper</i> Tris	Tris	0,5M
	SDS	0,4%
	Bromphenolblau	
	pH 6,8 mit HCl	
4x <i>Lower</i> Tris	Tris	1,5M
	SDS	0,4%
	pH 8,8 mit HCl	
10x Elektrophorese- puffer (SDS-PAGE)	Tris	250mM
	Glycin	1,9M
	SDS	1 %
10x PBS	NaCl	1,37M
	KCl	27mM
	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	10mM
	KH ₂ PO ₄	20mM
	pH 7,4 mit HCl oder NaOH	

2.1.3. Nukleinsäuren

A. Nukleotide

Zur Synthese von DNA wurde der „Desoxynucleotide Solution Mix“ von NEW ENGLAND BIOLABS benutzt, der jedes der vier Desoxyribonukleotide in einer Konzentration von 10mM enthält.

B. Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG-BIOTECH synthetisiert (Tab. 2-1). Die Primersequenzen sind in 5'-3'-Richtung angegeben.

Tabelle 2-1: Oligonukleotide.

Nr	Gen	Name	ATG	Schnitt- stelle	Sequenz	Funktion
1	HIS3	His 3 start	1		ATGACAGAGCAGAAAGCCC	Integration Kontrolle
243	RRN3	Rrn3-pYM-rev.			TAGTTTGTGACGGGCATGTCTCGAAGAT ACCTATGAAAAAGACCATCGATGAATTC GAGCTCG	Integration (pYM)
503	HIS3	His3_R			CCTTTGCAAACCAAGTTTCG	Integration Kontrolle (rev Primer)
587	rDNA	qPCR_1-for	88		CGTCAAACGGTGGAGAGAGT	real-time PCR
588	rDNA	qPCR_1-rev	367		AGTCTTGCGACCGGCTATT	real-time PCR
589	rDNA	qPCR_2-for	332		GGGGAATGCCTTGTGAATA	real-time PCR
590	rDNA	qPCR_2-rev	634		CCCACCTATTCCCTCTTGCT	real-time PCR
593	rDNA	qPCR_4-for	-206		GGGCACCTGTCACTTTGGA	real-time PCR
594	rDNA	qPCR_4-rev	-91		TTTGCCCTCTCTGTCGCTCT	real-time PCR
595	rDNA	qPCR_5-for	-110		GAGCGACAGAGAGGGCAAA	real-time PCR
596	rDNA	qPCR_5-rev	111		AGCGACTCTCTCCACCGTTT	real-time PCR
605	rDNA	rDNA-130_for	-130		AAATTGAAGTTTTTCTCGGC	Sonde (UE-kurz)
606	rDNA	rDNA-38_rev	-38		CCATGACTAAACCCCCC	Sonde (UE-kurz)
623	rDNA	rDNA-Kreise-for			CCTCGAGGGAGCTTGCAT	zur Kontrolle der Rekombination
624	rDNA	rDNA+147-for	147		CGTGTTTAATTGACATGGG	Sonde (EcoRV- Promotor)
625	rDNA	rDNA+396-rev	396		TGAGAGGAGGTTACACTTGA	Sonde (EcoRV- Promotor)
626	rDNA	rDNA+433-for	433		CCATTCCGTGAAACACC	Sonde (EcoRV-ORF)
627	rDNA	rDNA+682-rev	682		AAGAAAGAAACCGAAATCTC	Sonde (EcoRV-ORF)
791	MNase	MN-for			CGGATCCCCGGGTAAATTAA	Sonde (MNase)
792	MNase	MN-rev			CGCGCCTCATTATTGACCTG	Sonde (MNase)
797	H3 (Hht1)	H3-MN-for			TCAAGTTGGCTAGAAGATTAAGAGGTGA AAGATCACGGATCCCCGGGTAAATTAA	Integration, PCR- Klonierung
799	Rrn10	Rrn10-MN-for			AACATATTGATTATAGGCATGCGCCAGG TAATATCCGGATCCCCGGGTAAATTAA	Integration, PCR- Klonierung
817	rDNA	rDNA-709_for	-709		GAGGGACGGTTGAAAGTG	Sonde (XcmI- Promotor)
818	rDNA	rDNA-461_rev	-461		ATACGCTTCAGAGACCCTAA	Sonde (XcmI- Promotor)
839	pYM1	R12			TGGAGCGAAGACAACGCTGATTCAAGGTC AAATCTTTTACCCATACGATGT	PCR-Klonierung (3HA-Tag)
840	pYM1	R13			ATTCGCTTATTTAGAAGTGG	PCR-Klonierung (3HA-Tag)
843	Uaf30	S3-Uaf30-MNase		KpnI	GATGGTACCCATCGTTTCAGATTCCGAG CAATCAGATACAAAGGGCATTTCGTACG CTGCAGGTCGAC	Integration (nur MNase!), PCR- Klonierung
844	Uaf30	S2-Uaf30-MNase		SacII	CTACCGCGGACAACACAAATTTCAACGC CTTGAAATTTTCATGATATCCTTGATATC GATGAATTCGAGCTCG	Integration, PCR- Klonierung

845	Rrn10	S2-Rrn10-MNase		SacII	CTACCGCGGAGCCTTCCATCCTCCCCAG CCGCAAAAGCCAGGTTTTGCTACATAT CGATGAATTCGAGCTCG	Integration, PCR- Klonierung
846	H2B (Htb1)	S2-H2B-MNase		SacII	CTACCGCGGCCATATAAATAATAATATTA ATTATAACCAAAGGAAGTTGATTTCAATC GATGAATTCGAGCTCG	Integration, PCR- Klonierung
847	H3 (Hht1)	S2-H3-MNase		SacII	CTACCGCGGTGTGTTTTGTTCGTTTTTT ACTAAACTGATGACAATCAACAAAATCG ATGAATTCGAGCTCG	Integration, PCR- Klonierung
913	Rrn9	Rrn9-for_(+78)	78		GCTTACCACTACAACCGCTGA	Integration Kontrolle
914	Rrn9	Rrn9-rev_(+663)	663		ATGGGCTCGTCGTCTATCTG	Integration Kontrolle
915	Rrn7	Rrn7-for_(+856)	856		TGACACTGTGGGAAAGAACG	Integration Kontrolle
916	Rrn7	Rrn7-rev_(+1978)	1978		CAACGGGGCAATAAACAAAC	Integration Kontrolle
917	Leu2	Leu2-for_(+894)	894		GGTCAACCCTATCGCCACTA	Integration Kontrolle
918	rDNA	rDNA+3078_for	3078		CTGGCCTTTTCATTGGATGT	Sonde (Psoralen)
919	rDNA	rDNA+4002_rev	3329		ATCCCGGTTGGTTTCTTTTC	Sonde (Psoralen)
935	Hmo1	Hmo1-for-MNase		KpnI	GATGGTACCAAGAAGAAGAAGGATAAGA AGAAGGACAAATCCAACCTCTCTATTTTCG TACGCTGCAGGTCGAC	Integration (nur MNase!), PCR- Klonierung
936	Hmo1	S2-Hmo1-MNase		SacII	CTACCGCGGATTTTAGAAAGACAGTAGA GTAATAGTAACGAGTTTGTCCGTCCAAT CGATGAATTCGAGCTCG	Integration (nur MNase!), PCR- Klonierung
937	Rpa43	Rpa43-for-MNase		KpnI	GATGGTACCGAAAAACACCAGTGAAAGCA ATGATGGTGAATCGAGTGATAGTGATTC GTACGCTGCAGGTCGAC	Integration (nur MNase!), PCR- Klonierung
938	Rpa43	S2-Rpa43-MNase		SacII	CTACCGCGGAACGTATATCTTTATTTGTT TTGATTTTTTCTCATTTTTCCCGTCATCGA TGAATTCGAGCTCG	Integration, PCR- Klonierung
939	Rpa49	Rpa49-for-MNase		KpnI	GATGGTACCTTTAAGCTACCTGAAATGA CAAGAAGAGGAAGAGGTCCAAGACGTTTC GTACGCTGCAGGTCGAC	Integration (nur MNase!), PCR- Klonierung
940	Rpa49	S2-Rpa49-MNase		SacII	CTACCGCGGAAAACAGAGCAAACCAAA TGCTCAGTATATACCTCTAGGTAACATATC GATGAATTCGAGCTCG	Integration, PCR- Klonierung
941	Rpa190	Rpa190-for-MNase		KpnI	GATGGTACCGGTACGGGTTTCAATTTGATG TGTTAGCAAAGGTTCCAAATGCGGCTTC GTACGCTGCAGGTCGAC	Integration (nur MNase!), PCR- Klonierung
942	Rpa190	S2-Rpa190-MNase		SacII	CTACCGCGGAACTAATATTAATCGTAA TAATTATGGGACCTTTTGCCTGCTTATCG ATGAATTCGAGCTCG	Integration, PCR- Klonierung
1016	H2B (Htb2)	S3-HTB2-MNase		KpnI	GATGGTACCGAAGGTACTAGGGCTGTTA CCAAATACTCCTCCTCTACTCAAGCCTC GTACGCTGCAGGTCGAC	Integration (nur MNase!), PCR- Klonierung
1017	H2B (Htb2)	S2-HTB2-MNase		SacII	CTACCGCGGTAATAAAAAAGAAAACATGA CTAAATCACAATACCTAGTGAGTGACATC GATGAATTCGAGCTCG	Integration (nur MNase!), PCR- Klonierung
1018	H2B (Htb1)	S3-H2B-MNase		KpnI	GATGGTACCGAAGGTACTAGAGCTGTTA CCAAGTACTCTTCTCTACTCAAGCATCG TACGCTGCAGGTCGAC	Integration (nur MNase!), PCR- Klonierung
1154	H4 (Hhf2)	S3-HHF2-MNase		KpnI	GATGGTACCTATGCTTTGAAGAGACAAG GTAGAACCTTATATGGTTTCGGTGTTTC GTACGCTGCAGGTCGAC	Integration, PCR- Klonierung
1155	H4 (Hhf2)	S2-HHF2-MNase		SacII	CTACCGCGGGGCATGAAAATAATTTCAA ACACCGATTGTTTAACCAACCGATTGTATC GATGAATTCGAGCTCG	Integration, PCR- Klonierung

1156	Rrn3	S3-Rrn3-MNase		KpnI	GATGGTACCTGGAGTGAAGCAAGCGGG GAATATGAAAGTGATGGGTCGGATGACT CGTACGCTGCAGGTCGAC	Integration, PCR- Klonierung
1157	Rrn7	S3-Rrn7-MNase		KpnI	GATGGTACCGACTGCATTTCAAGGATCA AAAATGCCTGTCTGCATAGGATGAATTC GTACGCTGCAGGTCGAC	Integration, PCR- Klonierung
1158	Rrn7	S2-Rrn7-MNase		SacII	CTACCGCGGAGTATGCATAGAAATAGCA ATCCAGCGAGAATAATTTAAAAGGAGAT CGATGAATTCGAGCTCG	Integration, PCR- Klonierung
1159	Rpb4	S3-Rpb4-MNase		KpnI	GATGGTACCTTGAAAGGATACTAAAGG AATTGTCAAACCTAGAAACACTCTATTTC TACGCTGCAGGTCGAC	Integration, PCR- Klonierung
1160	Rpb4	S2-Rpb4-MNase		SacII	CTACCGCGGGGGTGAAAATTCATTACTA GTTACACACACGTATACATACAGTTAATC GATGAATTCGAGCTCG	Integration, PCR- Klonierung
1161	rDNA	rDNA-968_for	-968		CAGGTTATGAAGATATGGTGCAA	Sonde (XcmI-5S rDNA)
1162	rDNA	rDNA-719_rev	-719		AAAATGGCCTATCGGAATACA	Sonde (XcmI-5S rDNA)
1163	Gal1	Gal1+138-for	138		TGTTGCTAGATCGCCTGGTA	Sonde (GAL)
1164	Gal1	Gal1+433-rev	433		TTTCCGGTGCAAGTTTCTTT	Sonde (GAL)
1165	Mdm30	Mdm30+1179-for	1179		CAGGCCATTTGAGGGATA	Sonde (RPS22B)
1166	Mdm30	Mdm30+1429-rev	1429		CATTTGGTTCCTTAAGAGCAT	Sonde (RPS22B)
1167	Nup57	Nup57+759-for	759		TGGATCTAATTTACAGCAGCA	Sonde (RPS23A)
1168	Nup57	Nup57+1012-rev	1012		CCTGATCCCACTCTTCTTGA	Sonde (RPS23A)

C. Längenstandards

- 2-log Leiter (DNA-Längenstandard) von NEW ENGLAND BIOLABS

Die Fragmentgrößen in bp sind: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500/517, 400, 300, 200, 100

- Dig-labeled DNA Molecular Weight Marker VII (DNA-Längenstandard) von ROCHE

Die Fragmentgrößen in bp sind: 8576, 7427, 6106, 4899, 3639, 2799, 1953, 1882, 1515, 1482, 1164, 992, 710/718, 492, 359

- XcmI-Marker (DNA-Längenstandard): wurde durch Doppelverdau genomischer Hefe-DNA mit XcmI und einem entsprechenden Restriktionsenzym selbst hergestellt und als Marker für Southernblots, bei denen die DNA mit XcmI linearisiert wird, eingesetzt. Die Fragmentgrößen in bp sind von der gewählten Sonde abhängig.

· XcmI-Promotor-Sonde: 545 (DdeI), 577 (XmnI), 681 (TatI), 802 (HaeIII), 1443 (NdeI), 1992 (SacII), 3434 (DraIII), 4099 (KpnI), 4902 (XcmI)

· XcmI-5S-Sonde: 535 (HaeIII), 635 (DdeI), 826 (TatI), [1025 (TatI), 1835 (TatI)], 2948 (XmnI), 4236 (XcmI); TatI-Verdau ist unvollständig

D. DNA-Sonden für Southernblot Analysen

Die Sonden (Tab. 2-2) wurden mit folgenden Kits nach Herstellerangaben synthetisiert:

- Dig-markierte Sonden: „PCR Dig Probe Synthesis Kit“ von ROCHE (Cat.No. 11636090910).
- Radioaktive Sonden: „RadPrime DNA Labeling System“ von INVITROGEN; „ $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP Redivue“ von AMERSHAM.

Tab. 2-2: Sonden.

Sonde	Oligos	Start (ATG)	Ende (ATG)	Länge [bp]	T _H Dig/ radio [°C]
Xcml-Promotor	817, 818	-709	-461	250	49 / -
Xcml-5S	1161, 1162	-968	-719	250	49 / 62
UE	593, 596	-206	111	317	49 / 62
EcoRV-Promotor	624, 625	147	396	250	49 / -
EcoRV-ORF	626, 627	433	682	250	49 / -
Psoralen	918, 919	3078	3329	252	49 / -
Gal1	1163, 1164	138	433	295	- / 62
Mdm30 (Rps22b)	1165, 1166	1179	1429	250	- / 62
Nup57 (Rps23a)	1167, 1168	759	1012	253	- / 62

E. Plasmide

Die verwendeten und konstruierten Plasmide sind in Tabelle 2-3 aufgelistet. Alle pKM-Plasmide wurden sequenziert (MWG-BIOTECH). pKM9, das als Grundlage für die Klonierung der Plasmide pKM10-20 diente, ist in Abb. 2-1 dargestellt.

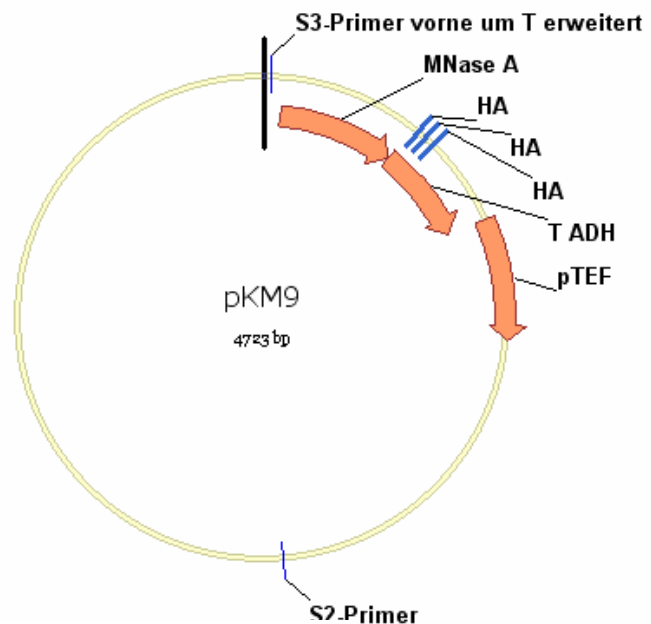


Abb. 2-1: Plasmid pKM9.

Tab. 2-3: Plasmide.

Nr	Name	Gen	Selektion	Origin	Klonierungsstrategie	Funktion	Referenz
1	pBluescript KS(+/-)		Amp	ORI (<i>E. Coli</i>)		LacZ T3 und T7 Promotor M13-20 T7 und SK PrimerCol E 1 - Origin f1ori (+ oder -)	STRATAGENE
36	pYM1		Amp kan MX6	ORI (<i>E. Coli</i>)		3HA-Tag-template	Knop et al., 1999
186	pNOY103	rDNA	Amp ADE3 URA3	ARS1 ORI (<i>E. Coli</i>)		GAL7-35S rDNA	Nogi et al., 1991
189	pNOY353	rDNA	Amp TRP1	ARS1 ORI (<i>E. Coli</i>)		GAL7-35S rDNA, 5S rDNA	Wai et al., 2000
322	YEplac195	lacZ	Amp URA3	ORI (<i>E. Coli</i>) 2 μ		Hefe - <i>E. coli</i> shuttle Vector	Gietz and Sugino, 1988
363	pR2	RecR GR6 adaptor	Amp LEU2	ORI (<i>E. Coli</i>) CEN	GR6 Adapter von pJSS3.1 über BssH I (blunt) in pB3.1 Sma I (reverse Orientierung zu LEU2 und RecR ORFs)	Expressionsvektor für R-Rekombinase und GR6 adapter (reverse Orientierung zu LEU2 und RecR ORFs)	Katharina Gmelch
388	pT24	rDNA	Amp	ORI (<i>E. Coli</i>)	pT2: BamHI (T4 Pol.>blunt) + pNOY373: HpaI/KpnI (T4 Pol.>blunt)	5S/RS/35S/lexA/RS	Thomas Wild
452	pKM6	rDNA	Amp URA3	ORI (<i>E. Coli</i>) 2 μ	35S rDNA (flankiert von RS-lexA und RS) mit BamHI, PstI aus pT24 (K388) ausgeschnitten und in BamHI, PstI von YEplac195 (K322) kloniert	RS-LexA-Promotor-35S rDNA-RS	diese Arbeit
456	pFA6a-MN-Kan MX6	MNase	Amp	ORI (<i>E. Coli</i>)		MNase-Tag-template	Schmid et al., 2004
493	pNOY3166	rrn7 Δ ::LEU2	Amp	ORI (<i>E. Coli</i>)	Derivat von pBluescriptII KS(-) mit rrn7 Δ ::LEU2-Fragment zwischen XhoI und XbaI		Keys et al., 1994
643	pKM9	MNase	Amp	ORI (<i>E. Coli</i>)	PCR mit Primern 839, 840 von pYM1 (V36; 3xHA-Tag) über BbsI, BssHII in BbsI, BssHII von pFA6a-MN-KanMX6 (K456) kloniert	(PCR-) template, zum Klonieren von pKM10 bis pKM20 für genomischen MNase-Tag	diese Arbeit
646	pKM12	MNase Uaf30	Amp	ORI (<i>E. Coli</i>)	PCR mit Primern 843, 844 von pKM9 (K643) über KpnI und SacII in pBluescript KS (V1)	Für genomischen MNase-Tag mittels Rekombination nach Linearisierung mit: KpnI, SacII	diese Arbeit
647	pKM13	MNase Rrn10	Amp	ORI (<i>E. Coli</i>)	PCR mit Primern 799, 845 von pKM9 (K643), in pGEM-TEasy Vektor kloniert. Orientierung: T7	Für genomischen MNase-Tag mittels Rekombination nach Linearisierung mit: SacII	diese Arbeit
648	pKM14	MNase H3	Amp	ORI (<i>E. Coli</i>)	PCR mit Primern 797, 847 von pKM9 (K643) über EcoRV (blunt von iProof DNAP) und SacII in pBluescript KS (V1)	Für genomischen MNase-Tag mittels Rekombination nach Linearisierung mit: KpnI, SacII	diese Arbeit

649	pKM15	MNase Hmo1	Amp	ORI (<i>E. Coli</i>)	PCR mit Primern 935, 936 von pKM9 (K643) über KpnI und SacII in pBluescript KS (V1)	Für genomischen MNase-Tag mittels Rekombination nach Linearisierung mit: KpnI, SacII	diese Arbeit
650	pKM16	MNase Rpa43	Amp	ORI (<i>E. Coli</i>)	PCR mit Primern 937, 938 von pKM9 (K643) über KpnI und SacII in pBluescript KS (V1)	Für genomischen MNase-Tag mittels Rekombination nach Linearisierung mit: KpnI, SacII	diese Arbeit
651	pKM17	MNase Rpa49	Amp	ORI (<i>E. Coli</i>)	PCR mit Primern 939, 940 von pKM9 (K643) über KpnI und SacII in pBluescript KS (V1)	Für genomischen MNase-Tag mittels Rekombination nach Linearisierung mit: KpnI, SacII	diese Arbeit
652	pKM18	MNase Rpa190	Amp	ORI (<i>E. Coli</i>)	PCR mit Primern 941, 942 von pKM9 (K643) über KpnI und SacII in pBluescript KS (V1)	Für genomischen MNase-Tag mittels Rekombination nach Linearisierung mit: KpnI, SacII	diese Arbeit
653	pKM19	MNase HTB1	Amp	ORI (<i>E. Coli</i>)	PCR mit Primern 1018, 846 von pKM9 (K643) über KpnI und SacII in pBluescript KS (V1)	Für genomischen MNase-Tag mittels Rekombination nach Linearisierung mit: KpnI, SacII	diese Arbeit
654	pKM20	MNase HTB2	Amp	ORI (<i>E. Coli</i>)	PCR mit Primern 1016, 1017 von pKM9 (K643) über KpnI und SacII in pBluescript KS (V1)	Für genomischen MNase-Tag mittels Rekombination nach Linearisierung mit: KpnI, SacII	diese Arbeit

2.1.4. Enzyme und Polypeptide

Bei allen Enzymen wurden die mitgelieferten Puffer und Komponenten verwendet.

GoTaq Polymerase	PROMEGA
HotStarTaq-Polymerase	QIAGEN
T4-DNA-Polymerase	NEW ENGLAND BIOLABS
Restriktionsendonukleasen	NEW ENGLAND BIOLABS
Mikrokokken-Nuklease (MNase; N5386)	SIGMA
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	USB
Antarktische Phosphatase	NEW ENGLAND BIOLABS
T4-DNA-Ligase	NEW ENGLAND BIOLABS
Zymolyase 100T	Seikagaku Corporation
Prestained Protein-Marker Broad Range	NEW ENGLAND BIOLABS

2.1.5. Antikörper

anti-DIG alkalische Phosphatase Konjugat, Fab	ROCHE
Alexa Fluor 594 goat anti-mouse, Ig(H+L); 1:500	MOLECULAR PROBES
Alexa Fluor 488 goat anti-rat, Ig(H+L); 1:500	MOLECULAR PROBES
Monoklonal Ratte anti-HA (3F10); 1:100 Immunfluoreszenz, 1:5000 Western Blot	ROCHE
Ziege anti-Ratte (Peroxidase-konjugiert)	JACKSON IMMUNORESEARCH
Monoklonal Maus anti-Nop1 (28F2); 1:500	ABCAM

2.1.6. Organismen

A. Wirtsbakterien

Zur Klonierung wurde der *E. coli* Stamm „XL1BlueMRF“ von STRATAGENE mit folgendem Genotyp verwendet: $\Delta(\text{mcrA})183$, $\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173$, endA1 , supE44 , thi-1 , recA1 , gyrA96 , relA1 , lac , λ^- , $[\text{F}']$, proAB , $\text{lacI}^q\text{ZAM15}$, $\text{tn10}(\text{tet}^r)$. Charakteristische Merkmale dieses Stammes sind sein effizienter lac-Repressor zur Vermeidung ungewollter Expression potenziell toxischer Fusionsproteine von α -komplementierenden Vektoren (lacI^q), seine Tetracyclin-Resistenz [$\text{tn10}(\text{tet}^r)$] auf dem F' -Episom, seine Rekombinationsdefizienz zur Vermeidung der Insertion der eingeschleusten DNA in die chromosomale DNA des Wirtes (recA) und die Inaktivierung einer DNA-spezifischen Endonuklease zur Erhöhung der Ausbeute bei der Plasmidpräparation (endA1).

B. Hefestämme

Die verwendeten und konstruierten *S. cerevisiae* Stämme sind in Tab. 2-4 aufgelistet.

Tabelle 2-4: *S. cerevisiae* Stämme.

Nr.	Name	Genotyp	Plasmide	Konstruktion	Verdopplungszeit	Referenz
	GPY11-6	$\text{MATa ade2-101 ura3-52 lys2-801 trp1-}\Delta 63 \text{ his3}\Delta 200 \text{ leu2}\Delta 1 \text{ rpa43}\Delta::\text{LEU2}$	pGP5-6 (CEN, TRP1, rpa43-6)		~3h	Peyroche et al., 2000
	YCC95	$\text{MATa ade5 his7-2 leu2-3,112 trp1-289}^{\text{amber}} \text{ ura3-52 syc1-8 (rrn3-8)}$		Ursprungsstamm: CG379	~2,5h bei 24°C	Cadwell et al., 1997
206	BY4741	$\text{MATa his31 leu20 met150 ura30}$			~1,7h	EUROSCARF
348	NOY505	$\text{MATa ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3,112 can1-100}$			~1,7h in YPD	Wai et al., 2000
349	NOY886	$\text{MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rpa135}\Delta::\text{LEU2 fob1}\Delta::\text{HIS}$	pNOY117 (CEN, RPA135, TRP1)		~1,8h	French et al., 2003; Kobayashi et al., 1998

356	NOY558	<i>MATα ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rrm7Δ::LEU2</i>	pNOY103 (GAL7-35S rDNA, ADE3, 2 μ , amp)		~6-8h	Keys et al., 1994
357	NOY699	<i>MATα ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rrm5Δ::LEU2</i>	pNOY103 (GAL7-35S rDNA, ADE3, 2 μ , amp)		~6-8h	Keys et al., 1996
358	NOY891	<i>MATα ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rdnΔ::HIS3</i>	pNOY353 (GAL7-35S rDNA, 5S rDNA, TRP1, 2 μ , amp)		~4h	Wai et al., 2000
478	YKM1	<i>MATα ade2-1 ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11 can1-100 rdnΔ::HIS3</i>	pKM6	Ursprungsstamm: NOY891, pNOY353 gegen pKM6 ausgetauscht	~1,9h in YPD ~2,5h in Raffinose	diese Arbeit
480	YKM2	<i>MATα ade2-1 ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11 can1-100 rdnΔ::HIS3</i>	pKM6, pR2	Ursprungsstamm: yKM1	~2,85h in SDC-Leu, ~5h in SRC-Leu	diese Arbeit
543	CG379	<i>MATα ade5-1 his7-2 leu2-3,-112 trp1-289 ura3-52</i>			~2,5h bei 24°C	Cadwell et al., 1997
570	NOY703	<i>MATα ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 can1-100 rrm9Δ::HIS3</i>	pNOY103 (GAL7-35S rDNA, ADE3, 2 μ , amp)		~6-8h	Keys et al., 1996
573	Y06969	<i>MATα his3-1 leu2-0 met15-0 ura3-0 hmo1Δ::kanMX4</i>			~2,5-3h	EUROSCARF
617	YKM01	<i>MATα ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 can1-100 Htb2-MNase-3HA-KanMX6</i>		Ursprungsstamm: NOY505, H2B (Htb2) mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM20	~ 1,78h	diese Arbeit
618	YKM02	<i>MATα ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 can1-100 Uaf30-MNase-3HA-KanMX6</i>		Ursprungsstamm: NOY505, Uaf30 mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM12	~1,57h	diese Arbeit
619	YKM03	<i>MATα ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 can1-100 Rrn10-MNase-3HA-KanMX6</i>		Ursprungsstamm: NOY505, Rrn10 mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM13	~ 1,58h	diese Arbeit
620	YKM04	<i>MATα ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 can1-100 Hht1-MNase-3HA-KanMX6</i>		Ursprungsstamm: NOY505, H3 (Hht1) mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM14	~ 1,85h wächst nicht bei 37°C	diese Arbeit
621	YKM05	<i>MATα ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 can1-100 Hmo1-MNase-3HA-KanMX6</i>		Ursprungsstamm: NOY505, Hmo1 mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM15	~ 1,66h	diese Arbeit

622	YKM06	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 can1-100 Rpa43-MNase-3HA-KanMX6</i>		Ursprungsstamm: NOY505, Rpa43 mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM16	~ 1,78h	diese Arbeit
623	YKM07	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 can1-100 Rpa49-MNase-3HA-KanMX6</i>		Ursprungsstamm: NOY505, Rpa49 mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM17	~ 1,98h	diese Arbeit
624	YKM08	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 can1-100 Rpa190-MNase-3HA-KanMX6</i>		Ursprungsstamm: NOY505, Rpa190 mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM18	~ 1,6h	diese Arbeit
625	YKM09	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 can1-100 rpa135Δ::LEU2 fob1Δ::HIS3 Htb2-MNase-3HA-KanMX6</i>	pNOY117 (CEN, RPA135, TRP1)	Ursprungsstamm: NOY886, H2B (Htb2) mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM20	~ 1,9h	diese Arbeit
626	YKM10	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 can1-100 rpa135Δ::LEU2 fob1Δ::HIS3 Uaf30-MNase-3HA-KanMX6</i>	pNOY117 (CEN, RPA135, TRP1)	Ursprungsstamm: NOY886, Uaf30 mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM12	~ 2,1h	diese Arbeit
627	YKM11	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 can1-100 rpa135Δ::LEU2 fob1Δ::HIS3 Rrn10-MNase-3HA-KanMX6</i>	pNOY117 (CEN, RPA135, TRP1)	Ursprungsstamm: NOY886, Rrn10 mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM13	~ 2,28h	diese Arbeit
628	YKM12	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 can1-100 rpa135Δ::LEU2 fob1Δ::HIS3 Hht1-MNase-3HA-KanMX6</i>	pNOY117 (CEN, RPA135, TRP1)	Ursprungsstamm: NOY886, H3 (Hht1) mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM14	~ 2,56h wächst nicht bei 37°C	diese Arbeit
629	YKM13	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 can1-100 rpa135Δ::LEU2 fob1Δ::HIS3 Hmo1-MNase-3HA-KanMX6</i>	pNOY117 (CEN, RPA135, TRP1)	Ursprungsstamm: NOY886, Hmo1 mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM15	~ 1,97h	diese Arbeit
630	YKM14	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 can1-100 rpa135Δ::LEU2 fob1Δ::HIS3 Rpa43-MNase-3HA-KanMX6</i>	pNOY117 (CEN, RPA135, TRP1)	Ursprungsstamm: NOY886, Rpa43 mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM16	~ 2,03h	diese Arbeit
631	YKM15	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 can1-100 rpa135Δ::LEU2 fob1Δ::HIS3 Rpa49-MNase-3HA-KanMX6</i>	pNOY117 (CEN, RPA135, TRP1)	Ursprungsstamm: NOY886, Rpa49 mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM17	~ 2,39h	diese Arbeit
632	YKM16	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 can1-100 rpa135Δ::LEU2 fob1Δ::HIS3 Rpa190-MNase-3HA-KanMX6</i>	pNOY117 (CEN, RPA135, TRP1)	Ursprungsstamm: NOY886, Rpa190 mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM18	~ 1,92h	diese Arbeit

633	YKM17	<i>MATa ade2-1 ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11 can1-100 rdnΔΔ::HIS3 Htb2-MNase-3HA-KanMX6</i>	pKM6	Ursprungsstamm: YKM1, H2B (Htb2) mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM20	~ 2,05h	diese Arbeit
634	YKM18	<i>MATa ade2-1 ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11 can1-100 rdnΔΔ::HIS3 Uaf30-MNase-3HA-KanMX6</i>	pKM6	Ursprungsstamm: YKM1, Uaf30 mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM12	~ 1,9h	diese Arbeit
635	YKM19	<i>MATa ade2-1 ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11 can1-100 rdnΔΔ::HIS3 Rm10-MNase-3HA-KanMX6</i>	pKM6	Ursprungsstamm: YKM1, Rm10 mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM13	~ 1,85h Western Blot positiv Southern Blot negativ	diese Arbeit
636	YKM20	<i>MATa ade2-1 ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11 can1-100 rdnΔΔ::HIS3 Hht1-MNase-3HA-KanMX6</i>	pKM6	Ursprungsstamm: YKM1, H3 (Hht1) mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM14	~1,9h wächst bei 37°C!	diese Arbeit
637	YKM21	<i>MATa ade2-1 ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11 can1-100 rdnΔΔ::HIS3 Hmo1-MNase-3HA-KanMX6</i>	pKM6	Ursprungsstamm: YKM1, Hmo1 mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM15	~ 1,94h	diese Arbeit
638	YKM22	<i>MATa ade2-1 ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11 can1-100 rdnΔΔ::HIS3 Rpa43-MNase-3HA-KanMX6</i>	pKM6	Ursprungsstamm: YKM1, Rpa43 mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM16	~ 2,04h	diese Arbeit
639	YKM23	<i>MATa ade2-1 ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11 can1-100 rdnΔΔ::HIS3 Rpa49-MNase-3HA-KanMX6</i>	pKM6	Ursprungsstamm: YKM1, Rpa49 mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM17	~ 2,28h	diese Arbeit
640	YKM24	<i>MATa ade2-1 ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11 can1-100 rdnΔΔ::HIS3 Rpa190-MNase-3HA-KanMX6</i>	pKM6	Ursprungsstamm: YKM1, Rpa190 mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM18	~ 1,89h	diese Arbeit
879	YKM25	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 can1-100 Hhf2-MNase-3HA-KanMX6</i>		Ursprungsstamm: NOY505, H4 (Hhf2) mit MNase-3HA über Rekombination mit PCR (1154, 1155)		diese Arbeit
880	YKM26	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 can1-100 Rrn3-MNase-3HA-KanMX6</i>		Ursprungsstamm: NOY505, Rrn3 mit MNase-3HA über Rekombination mit PCR-Produkt (243, 1156)		diese Arbeit
881	YKM27	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 can1-100 Rrn7-MNase-3HA-KanMX6</i>		Ursprungsstamm: NOY505, Rrn7 mit MNase-3HA über Rekombination mit PCR-Produkt (1157, 1158)		diese Arbeit

882	YKM28	<i>MATα ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 can1-100 Rpb4-MNase-3HA-KanMX6</i>		Ursprungsstamm: NOY505, Rpb4 mit MNase-3HA über Rekombination mit PCR-Produkt (1159, 1160)		diese Arbeit
883	YKM29	<i>MATα ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 can1-100 rpa135Δ::LEU2 fob1Δ::HIS3 Hhf2-MNase-3HA-KanMX6</i>	pNOY117 (CEN, RPA135, TRP1)	Ursprungsstamm: NOY886, H4 (Hhf2) mit MNase-3HA über Rekombination mit PCR (1154, 1155)		diese Arbeit
884	YKM30	<i>MATα ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 can1-100 rpa135Δ::LEU2 fob1Δ::HIS3 Rrn3-MNase-3HA-KanMX6</i>	pNOY117 (CEN, RPA135, TRP1)	Ursprungsstamm: NOY886, Rrn3 mit MNase-3HA über Rekombination mit PCR-Produkt (243, 1156)		diese Arbeit
885	YKM31	<i>MATα ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 can1-100 rpa135Δ::LEU2 fob1Δ::HIS3 Rrn7-MNase-3HA-KanMX6</i>	pNOY117 (CEN, RPA135, TRP1)	Ursprungsstamm: NOY886, Rrn7 mit MNase-3HA über Rekombination mit PCR-Produkt (1157, 1158)		diese Arbeit
886	YKM32	<i>MATα ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 can1-100 rpa135Δ::LEU2 fob1Δ::HIS3 Rpb4-MNase-3HA-KanMX6</i>	pNOY117 (CEN, RPA135, TRP1)	Ursprungsstamm: NOY886, Rpb4 mit MNase-3HA über Rekombination mit PCR-Produkt (1159, 1160)		diese Arbeit
887	YKM33	<i>MATα ade2-1 ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11 can1-100 rdnΔΔ::HIS3 Hhf2-MNase-3HA-KanMX6</i>	pKM6	Ursprungsstamm: YKM1, H4 (Hhf2) mit MNase-3HA über Rekombination mit PCR-Produkt (1154, 1155)		diese Arbeit
888	YKM34	<i>MATα ade5 his7-2 leu2-3,112 trp1-289^{amber} ura3-52 syc1-8 (rrn3-8) Rrn7-MNase-3HA-KanMX6</i>		Ursprungsstamm: YCC95, Rrn7 mit MNase-3HA über Rekombination mit PCR-Produkt (1157, 1158)		diese Arbeit
889	YKM35	<i>MATα ade5 his7-2 leu2-3,112 trp1-289^{amber} ura3-52 syc1-8 (rrn3-8) Rpb4-MNase-3HA-KanMX6</i>		Ursprungsstamm: YCC95, Rpb4 mit MNase-3HA über Rekombination mit PCR-Produkt (1159, 1160)		diese Arbeit
890	YKM36	<i>MATα ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rrn7Δ::LEU2 Hmo1-MNase-3HA-KanMX6</i>	pNOY103 (GAL7-35S rDNA, ADE3, 2μ, amp)	Ursprungsstamm: NOY558, Hmo1 mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM15		diese Arbeit
891	YKM37	<i>MATα ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rrn7Δ::LEU2 Rpa190-MNase-3HA-KanMX6</i>	pNOY103 (GAL7-35S rDNA, ADE3, 2μ, amp)	Ursprungsstamm: NOY558, Rpa190 mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM18		diese Arbeit

892	YKM38	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 can1-100 rrn9Δ::HIS3 Uaf30-MNase-3HA-KanMX6</i>	pNOY103 (GAL7-35S rDNA, ADE3, 2μ, amp)	Ursprungsstamm: NOY703, Uaf30 mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM12		diese Arbeit
893	YKM39	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 can1-100 rrn9Δ::HIS3 Hmo1-MNase-3HA-KanMX6</i>	pNOY103 (GAL7-35S rDNA, ADE3, 2μ, amp)	Ursprungsstamm: NOY703, Hmo1 mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM15		diese Arbeit
894	YKM40	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 can1-100 rrn9Δ::HIS3 Rpa190-MNase-3HA-KanMX6</i>	pNOY103 (GAL7-35S rDNA, ADE3, 2μ, amp)	Ursprungsstamm: NOY703, Rpa190 mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM18		diese Arbeit
895	YKM41	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 can1-100 rrn9Δ::HIS3 rrn7Δ::LEU2</i>	pNOY103 (GAL7-35S rDNA, ADE3, 2μ, amp)	Ursprungsstamm: NOY703, XhoI-XbaI-Fragment von pNOY3166 reintransformiert		diese Arbeit
934	YR8	<i>MATα ade5 his7-2 leu2-3,112 trp1-289^{amber} ura3-52 syc1-8 (rrn3-8) Uaf30-MNase-3HA-KanMX6</i>		Ursprungsstamm: YCC95, Uaf30 mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM12		Ulrike Stöckl
935	YR9	<i>MATα ade5 his7-2 leu2-3,112 trp1-289^{amber} ura3-52 syc1-8 (rrn3-8) Hmo1-MNase-3HA-KanMX6</i>		Ursprungsstamm: YCC95, Hmo1 mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM15		Ulrike Stöckl
936	YR10	<i>MATα ade5 his7-2 leu2-3,112 trp1-289^{amber} ura3-52 syc1-8 (rrn3-8) Rpa43-MNase-3HA-KanMX6</i>		Ursprungsstamm: YCC95, Rpa43 mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM16		Ulrike Stöckl
937	YR11	<i>MATα ade5 his7-2 leu2-3,112 trp1-289^{amber} ura3-52 syc1-8 (rrn3-8) Rpa49-MNase-3HA-KanMX6</i>		Ursprungsstamm: YCC95, Rpa49 mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM17		Ulrike Stöckl
938	YR12	<i>MATα ade5 his7-2 leu2-3,112 trp1-289^{amber} ura3-52 syc1-8 (rrn3-8) Rpa190-MNase-3HA-KanMX6</i>		Ursprungsstamm: YCC95, Rpa190 mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM18		Ulrike Stöckl
939	YR13	<i>MATα ade5 his7-2 leu2-3,112 trp1-289^{amber} ura3-52 syc1-8 (rrn3-8) Htb2-MNase-3HA-KanMX6</i>		Ursprungsstamm: YCC95, H2B (Htb2) mit MNase-3HA über Rekombination mit pKM20		Ulrike Stöckl

2.1.7. Geräte

Die Auflistung umfaßt lediglich Geräte, deren Charakterisierung für die Beschreibung der durchgeführten Experimente maßgebend ist oder die nicht handelsüblich sind.

Agarosegel UV imaging system	GELMAX, INTAS
BAS 1000 Raytest	FUJI
BAS Cassette 2040	FUJI
BAS-III Imaging Plate	FUJI
Elektroporator Micropulser™	BIORAD
Fluoreszenz-Image Reader LAS-3000	FUJIFILM
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert 200M	CARL ZEISS
Hybridisierungsröhren	BACHOFER, Rettberg
Mikrozentrifuge Biofuge fresco	HERAEUS
Mikrozentrifuge Biofuge pico	HERAEUS
Rotor Gene RG-3000	CORBETT RESEARCH
Sub-Cell® GT Agarose Gel Electrophoresis System	BIORAD
Tischzentrifuge C412	JOUAN
Tischzentrifuge CT 412	JOUAN
Thermocycler PCR Sprint	HYBAID
UV/Visible-Spektrophotometer	AMERSHAM BIOSCIENCES
Vibrax VXR basic	IKA
Zentrifuge Centrikon T-324	KONTRON INSTRUMENTS

2.2. Methoden

2.2.1. Enzymatische Manipulation von DNA

A. Polymerase-Kettenreaktion: PCR

Für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden in einem 50µl Ansatz die zu amplifizierende DNA, 0,25mM Nukleotide, 20 pmol des forward-Primers und 20 pmol des reverse-Primers, der PCR-Puffer in einfacher Endkonzentration (1x), der MgCl₂ in einer Endkonzentration von 1,5mM enthält und 2,5 U GoTaq-Polymerase eingesetzt.

Zur Eliminierung der primerinternen Sekundärstrukturen wie Haarnadeln (hair pins), sowie zur Verhinderung der Ausbildung von Primerdimeren und von Fehlanlagerung der Primer wird gegebenenfalls das Semihotstart-Verfahren angewandt. Der Reaktionsansatz wird wie oben beschrieben angesetzt, jedoch ohne die Polymerase. Der Amplifikation geht ein 3-minütiger Denaturierungsschritt bei 95°C voraus, erst danach wird die Polymerase zugegeben.

Bei der sich anschließenden Amplifikation durch 30 Zyklen wird nach dem folgenden Schema verfahren. Auf einen 45 Sekunden langen Denaturierungsschritt (94°C), bei dem das Schmelzen des Doppelstranges erfolgt, schließt sich der Kondensationsschritt an (45 Sekunden), bei dem die Primer an die DNA hybridisieren (*annealing*). Die Annealingtemperatur liegt bei 4°C unter der niedrigeren Schmelztemperatur des Primerpaares. An das Annealing schließt sich die Elongation bei 72°C an, deren Dauer sich nach der Länge des Amplifikationsproduktes richtet. Meistens wurde pauschal für 90 Sekunden elongiert. Zum Schluß wird die Temperatur auf 4°C heruntergefahren und gehalten.

B. sequenzspezifische Restriktionsendonukleasen

Zum Schneiden der DNA mit Restriktionsenzymen werden durchschnittlich 5U/µg DNA des jeweiligen Enzyms in dem mitgelieferten Puffer eingesetzt. Die DNA-Konzentration sollte dabei $\leq 100\text{ng}/\mu\text{l}$ gehalten werden. Der Verdau erfolgt binnen 2h bei 37°C, was einem zehnfachen Überverdau entspricht.

C. sequenzunspezifische Restriktionsendonukleasen (MNase)

Die präparierten Kerne (s. Nukleipräparation, 2.2.4.) eines 1,2ml Aliquots werden auf Eis aufgetaut, in 500µl MNase-Puffer resuspendiert, für 10min auf Eis gestellt, abzentrifugiert (4800rpm, 5min, 4°C) und mit MNase-Puffer (15mM Tris-HCl pH 8, 50mM NaCl, 1,4mM CaCl₂, 0,2mM EDTA, 0,2mM EGTA, 5mM β-Mercaptoethanol) auf 1ml aufgefüllt. Die Kerne werden auf fünf Reaktionen à 200µl verteilt, für 2min bei 37°C vorgewärmt und mit 0, ¼, ½, 1 und 2 Units MNase versetzt (50 A₂₆₀u/µl MNase: 500U MNase (SIGMA) in 850µl MNase-Lagerpuffer (20mM Tris-HCl pH 8, 1mM CaCl₂)). Nach 20-minütiger Inkubation bei 37°C wird die Reaktion durch Zugabe des gleichen Volumens IRN-Puffer gestoppt. Der Reaktionsansatz wird mit 1µl RNase A [100mg/ml] versetzt und für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wird 1/40 Volumen 20% SDS und 8µl Proteinase K [10mg/ml] zugegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. Die Formaldehydquervernetzung wird bei 65°C über Nacht oder für mindestens 6h rückgängig gemacht. Die DNA wird Phenol-Chloroform extrahiert, mit Ethanol gefällt und schließlich in TE aufgenommen.

D. Auffüllreaktion: Erzeugung glatter Enden

DNA mit überhängenden 5'-Enden wird durch eine Polymerasereaktion mit der T4-DNA-Polymerase aufgefüllt. Da diese neben ihrer Polymeraseaktivität zusätzlich eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität besitzt, können mit ihr auch 3'-überhängende Enden geglättet werden. Zur DNA werden T4 DNA-Polymerase zu einer Endkonzentration von 3U/µg DNA, Puffer und Desoxyribonukleotide zu einer Endkonzentration von 100µM je Nukleotid gegeben und für 20min bei 12°C inkubiert. Die T4-DNAP wird anschließend durch 10-minütiges Erhitzen auf 75°C inaktiviert.

E. Dephosphorylierung

Die Dephosphorylierung des Vektors vor der Ligation dient zur Vorbeugung einer Religation des deletierten Stückes der multiple cloning site. Dadurch soll gewährleistet werden, daß nur das zu klonierende DNA-Fragment in den Vektor ligiert wird.

In einem 30µl Ansatz wurden die zu dephosphorylierende Vektor-DNA, der mitgelieferte SAP-Puffer in einfacher Endkonzentration und 2U/µg DNA Shrimp Alkaline Phosphatase eingesetzt und bei 37°C für 30min inkubiert. Anschließend erfolgt die Inaktivierung des Enzyms bei 65°C für 15min.

F. Ligation

Für die Ligation überhängender Enden, wurden in einem 20µl Ansatz 6U T4-DNA-Ligase, der mitgelieferte ATP-enhaltende Puffer in einfacher Endkonzentration, sowie die miteinander zu ligierenden DNA-Fragmente in einem Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:3 bis 1:5 eingesetzt, wobei die verwendete DNA-Menge des Vektors 50ng beträgt.

Dabei ist zu beachten, daß beim Verhältnis von Vektor zu Insert nicht die Menge in Nanogramm gemeint ist, sondern die Anzahl an Molekülen. Für ein Verhältnis, Vektor zu Insert von 1:5, errechnet sich die einzusetzende Insertmasse nach folgender Formel:

$$\text{Masse}_{\text{Insert}} [\text{ng}] = 5 \cdot \text{Masse}_{\text{Vektor}} [\text{ng}] \cdot \text{Länge}_{\text{Insert}} [\text{bp}] / \text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]$$

Die Ligation erfolgt bei 4°C über Nacht, eine Inaktivierung der Ligase ist nicht notwendig; sie reduziert in der Regel die Transformationseffizienz.

2.2.2. Reinigung von Nukleinsäuren

A. Plasmidisolierung

a. Alkalische Lyse

Zur Isolierung von Plasmid-DNA im „Midi“-Maßstab (bis 100µg), wird das „QIAGEN Plasmid Midi Kit“ von QIAGEN verwendet. Das Prinzip dieses Kits basiert auf der Methode der alkalischen Lyse. Dabei werden die pelletierten Bakterien in einem NaOH- und SDS-haltigen Puffer lysiert und ihre genomische DNA und Proteine durch Neutralisierung des alkalischen Lysats mit Kaliumacetat ausgefällt. Die im Überstand verbliebene, renaturierte Plasmid-DNA wird durch Säulenchromatografie an einem Anionenaustauscher isoliert, wobei die DNA unter niedriger Salzkonzentration an den Anionenaustauscher gebunden wird. RNA und Proteine werden bei mittlerer Salzkonzentration ausgewaschen. Die Plasmid-DNA wird bei hoher Salzkonzentration eluiert und durch eine anschließende Isopropanolfällung entsalzt und letztlich in TE-Puffer (pH 7,5) aufgenommen. Alle dazu notwendigen Puffer und Säulen sind in dem Kit enthalten.

b. Kochlyse und Fällung mit N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid (CTAB)

Die Bakterienpellets werden in 200µl STET-Puffer (8% Saccharose, 50mM Tris (USB), 50mM EDTA, 0,1% v/v Triton X-100; pH 8,0 mit HCl) resuspendiert, nach Zugabe von 10µl Lysozymlösung [50mg/ml] für 5min bei RT lysiert und anschließend 90s gekocht. Der Bakteriendebris, bestehend aus den denaturierten Proteinen und der genomischen DNA der Bakterien, wird abzentrifugiert (13000rpm, 10min bei RT) und entnommen. Der klare Überstand wird mit 10µl RNase A-Lösung [10mg/ml] versetzt und für 10min bei 68°C inkubiert. Nach Abkühlen auf RT wird die Plasmid-DNA mit 10µl CTAB-Lösung [5% in 0,5M NaCl] 3min bei RT gefällt und anschließend in 300µl 1,2M NaCl aufgelöst. Daraus wird die Plasmid-DNA durch Ethanolfällung isoliert und in TE-Puffer (pH 7,5) aufgenommen. Gelagert wird die Plasmid-DNA bei -20°C.

B. DNA Isolierung aus S. cerevisiae

Eine logarithmisch wachsende Hefekultur (5ml) wird pelletiert (4000rpm, 5min, RT), mit 500µl H₂O gewaschen (5000rpm, 3min) und in 500µl 1M Sorbitol, 0,1M EDTA resuspendiert. Durch Zugabe von 3µl einer 2%igen Zymolyase-Lösung werden die Zellen bei 35°C für 1h spheroplastiert. Die Spheroplasten werden abzentrifugiert (7100rpm, 5min), mit 500µl IR-Puffer und 50µl 10% SDS versetzt, bis zur vollständigen Lyse gevortext und für 30min bei 65°C inkubiert. Proteine und Zellbestandteile werden mit 200µl 5M KAc für 20min auf Eis präzipitiert und abzentrifugiert (13000rpm, 20min, 4°C). Der Überstand, der die genomische Hefe-DNA enthält, wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit 1µl RNase A [100mg/ml] für 30min bei 37°C verdaut. Die DNA wird mit 750µl Isopropanol für 5min bei RT gefällt, abzentrifugiert (13000rpm, 5min) und mit 70%igem Ethanol gewaschen und schließlich in TE aufgenommen.

C. Phenolextraktion

Zur Deproteinierung durch Phenolextraktion wird zweimal mit je einem Volumen eines fertigen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemischs (25:24:1) extrahiert. Zur Entfernung des Phenols wird zweimal mit je einem Volumen Chloroform nachextrahiert.

D. Ethanolfällung

Ethanolfällungen werden bei einer Endkonzentration von 0,3M Natriumacetat, bezogen auf die wäßrige Phase, und mit 2 Volumen eiskaltem absolutem Ethanol durchgeführt. Die Präzipitation erfolgt ≥ 30min bei -20°C. Nach dem Pelletieren (13000rpm, 15min bei 4°C) wird das Präzipitat mit 70%igem eiskaltem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und schließlich in H₂O/ TE aufgenommen.

E. PCR Purification Kit

Die einfachste und vor allem schnellste Methode zur effektiven DNA-Reinigung ist das „QIAquick PCR Purification Kit“ von QIAGEN. Das Kit beruht auf der Bindung der DNA an eine Silikagelsäule in Gegenwart einer hohen Salzkonzentration. Unerwünschte Verunreinigungen wie Primer bis hin zu einer Länge von 40 Nukleotiden, Salze, Enzyme, uneingebaute Nukleotide, Agarose, Detergenzien sowie Ethidiumbromid werden durch einen ethanolhaltigen Puffer quantitativ ausgewaschen. Die DNA wird schließlich bei geringer Salzkonzentration mit H₂O oder Elutionspuffer wieder eluiert. Alle benötigten Puffer werden vom Hersteller mitgeliefert.

F. präparative Gelelektrophorese

Die Elektrophorese wird mit einem 0,8%igen TBE-Gel durchgeführt. Um die Ausbildung von Thymidindimeren möglichst gering zu halten, wird das die gewünschte Bande enthaltende Gelstück unter minimaler UV-Bestrahlungsdauer und -Stärke auf dem UV-Transilluminator ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA erfolgt mit dem „QIAquick Gelextraktionskit“ der Firma QIAGEN (beruht auf den gleichen Prinzip wie das PCR Purification Kit unter E). Alle benötigten Puffer werden vom Hersteller mitgeliefert.

2.2.3. Quantitative und qualitative Analyse von Nukleinsäuren

A. UV-Spektrometrie

Zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration werden mit dem Spektralphotometer die Extinktionen bei 260 und 280nm gemessen. Die Konzentration berechnet sich aus der optischen Dichte bei 260nm (OD₂₆₀), der Verdünnungsfaktor (V) und einem für DNA spezifischen Multiplikationsfaktor (F), für den folgende Beziehungen gelten:

doppelsträngige DNA: 1OD_{260} entspricht 50µg/ml

Daraus ergibt sich die Formel:

$$c [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times 1/V \times F$$

Aus dem Verhältnis der OD₂₆₀ / OD₂₈₀, das für reine Nukleinsäuren zwischen 1,8 und 2 liegt, läßt sich eine Aussage über die Proteinkontamination in der Lösung treffen.

B. Agarose-Gelelektrophorese

Für die Agarose-Gelelektrophorese werden 0,8-1,5%ige Agarosegele in einer horizontalen Gelkammer verwendet. Als Laufpuffer dient sowohl bei analytischen als auch präparativen Gelen TBE. Als Referenz werden je 0,5µg einer 1kb- bzw. einer 100bp-Leiter aufgetragen, wobei die 3000bp-Bande der 1kb Leiter 125ng DNA enthält und somit eine visuelle Quantifizierung möglich wird. Alle Proben werden vor dem Auftrag mit einer geeigneten Menge des 10x Ladepuffers versetzt. Die Elektrophorese wird bei einer Feldstärke von 3-

5V/cm durchgeführt. Um die Nukleinsäuren auf dem Gel sichtbar zu machen, wird es 15min unter Wippen in einem Ethidiumbromidbad ($0,5\mu\text{g/ml H}_2\text{O}$) gefärbt und danach für 15min in H_2O entfärbt. Schließlich wird die DNA bei 254-366nm sichtbar gemacht und das Gel in einem Gel-Dokumentationssystem fotografiert.

C. Southern Blot, Hybridisierung und chemiluminografische Detektion der Hybride

a. Southern Blot

Die Nukleinsäuren werden durch Kapillartransfer aus Agarosegelen auf eine positiv geladene Nylonmembran aufgebracht (PositiveTM Membrane, QBIAGEN). Zur Depurinierung der DNA wird das Gel für 20min in 0,25M HCl und zur Denaturierung zwei Mal für 15min in 0,5M NaOH, 1,5M NaCl inkubiert. Anschließend wird das Gel für zwei Mal 15min in Transferpuffer (1M NH_4Ac) umgepuffert und eine Abwärtstransfer-Pyramide mit einer Nylonmembran als Träger aufgebaut (Abb. 2-2). Der Transfer erfolgt bei 0,8%igen Gelen für mind. 4h, bei 1%igen Gelen für mind. 6h und für höher prozentige Gele über Nacht. Danach werden die Nukleinsäuren durch 20-sekündige UV-Bestrahlung (*crosslinking*) kovalent an die Membran gebunden. Die Bindung erfolgt über die Thymidine der Nukleinsäuren. Die Membran kann ggf. getrocknet und zu einem späteren Zeitpunkt hybridisiert werden.

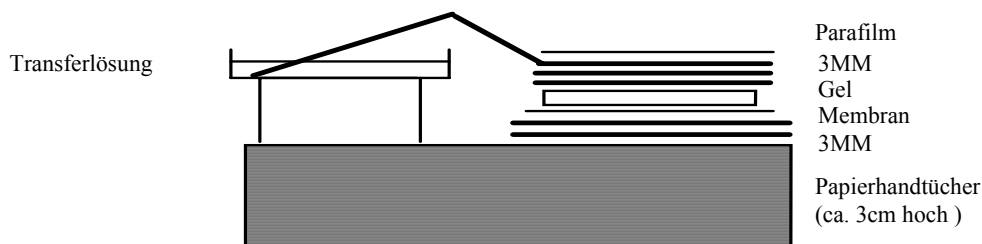


Abb. 2-2: Abwärtstransfer-Pyramide: auf Papierhandtücher wird eine doppelte Lage mit NH_4Ac getränkter 3MM Whatman Papiere gelegt. Darauf kommt die angefeuchtete Nylonmembran, auf die das Gel gelegt wird, gefolgt von zwei weiteren NH_4Ac getränkten 3MM Whatman Papieren. Gegen das Austrocknen wird der Aufbau mit Parafilm abgedeckt. Eine Platte und ein Gewicht sorgen für den gleichmäßigen Transfer der DNA.

b. Hybridisierung

Getrocknete Membranen werden zum Befeuchten kurz mit Benetzungslösung (2x SSC, 0,2% SDS, 10mM EDTA) gespült. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wird die Membran für 1 Stunde bei der Hybridisierungstemperatur im Hybridisierungspuffer (5x SSC, 50% Formamid, 0,5% SDS, 5x Denhardts Reagens) prähybridisiert und anschließend über Nacht mit der Sonde hybridisiert, die zuvor für 3min bei 99°C in 50% Formamid denaturiert und auf Eis abgeschreckt wird. Die Konzentration der Sonde beträgt 50ng/ml.

Für DNA-DNA-Hybride gilt die folgende empirische Formel nach Wahl et al., 1987, die durch Weth, 1993 um einen thermischen Korrekturfaktor für Digoxigeninmarkierung erweitert wurde:

$$T_m^{\text{Dig}} / ^\circ\text{C} = 81,5 + 16,6 \log C_{\text{mc}} + 0,41 \cdot \% \text{GC} - 500 / L - 0,61 \cdot c_{\%} \text{FA} - 12,5$$

C_{mc} Zahlenwert der molaren Konzentration einwertiger Kationen

$\% \text{GC}$ Zahlenwert des GC-Gehalts in %

L Zahlenwert der Hybridlänge in bp

$c_{\%} \text{FA}$ Zahlenwert des Formamidgehalts in %

-12,5 thermischer Korrekturfaktor für Digoxigeninmarkierung.

Für die Wahl der Hybridisierungstemperatur muß berücksichtigt werden, daß bei unvollständiger Komplementarität eine 1%ige Sequenzabweichung eine Schmelztemperaturerniedrigung von ca. $0,75^\circ \text{C}$ bewirkt (Weth, 1993).

Nach der Hybridisierung wird zweimal 15min mit dem Hybridisierungspuffer und zweimal 10min mit 0,1x SSC, 0,1% SDS bei der Hybridisierungstemperatur gewaschen.

Für radioaktive Sonden mit einer Länge von 250-300bp wurde pauschal bei 62°C mit 0,5M Na-Phosphat (pH 7,2), 7% SDS hybridisiert. Nach der Hybridisierung wird bei gleicher Temperatur mit 3x SSC, 0,1% SDS gespült und je zweimal für 15min in folgender Reihenfolge gewaschen:

0,3x SSC, 0,1% SDS

0,1x SSC, 0,1% SDS

0,1x SSC, 1,5% SDS

c. Detektion

Die Detektion der Digoxigenin-markierten Hybride erfolgt durch Inkubation mit einem *anti*-Digoxigenin-Antikörper, der mit der alkalische Phosphatase als Reporterezym konjugiert ist. Dieser *anti*-Digoxigenin(F_{ab})-AP-Antikörper bindet mit seiner Antigenbindungsstelle an das Digoxigenin, das aus der Doppelhelix des Hybrids herausragt, und setzt mit der alkalischen Phosphatase ein geeignetes Substrat (CDP-*Star*; ROCHE) um. Die Nachweisreaktion erfolgt über Chemilumineszenz.

Alle Reaktionen zur chemiluminografischen Entwicklung finden bei RT statt. Zunächst wird in Waschpuffer (0,3% Lauroylsarcosin in MaBS) umgepuffert. Anschließend wird die Membran zur Hintergrundreduktion für 1h in Blockierungspuffer (1% Blockingreagenz in MaBS; ROCHE) blockiert, wodurch unspezifischen Bindungen des Antikörpers vorgebeugt wird, 30min mit einem *anti*-Digoxigenin(F_{ab})-AP-Konjugat (1/7500 in 1% Blockierungspuffer; ROCHE) inkubiert und dreimal für je 10 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Nach 5-minütiger Äquilibration im Reaktionspuffer, wird die Membran für 5min mit einer CDP-*Star*-Lösung (1/100 in Reaktionspuffer (0,1M Tris, 0,1M NaCl, 5mM MgCl_2 ; pH 9,5 mit HCl)) inkubiert. Die chemiluminografische Detektion erfolgt über den Fluoreszent-Image Reader LAS-3000 von FUJIFILM.

Für die radioaktive Detektion wird der Blot zunächst leicht an der Luft getrocknet. In einer FUJI Kassette wird eine FUJI *Imaging* Platte für eine entsprechende Zeit mit dem Blot exponiert. Die Detektion erfolgt über einen BAS 1000 von FUJIFILM.

d. Strippen der Membran

Um die Membran von den hybridisierten Sonden zu befreien, wird die Membran mit H₂O gespült, zwei Mal für 15min mit 0,2M NaOH, 0,1% SDS bei 37°C inkubiert und schließlich für 5min mit 2x SSC bei RT gespült. Die Membran wird in Benetzungslösung gelagert.

e. Profilanalyse der Autoradiogramme

Die Profilanalyse der Autoradiogramme erfolgte mittels Multi Gauge 3.0 (FUJIFILM). Über die einzelnen Spuren wurden Profile gelegt. Die Banden des Autoradiogramms wurden vom Programm detektiert und als Zahlenwerte ausgegeben, welche in eine Excel-Tabelle übertragen wurden. Anhand der Zahlenwerte wurde ein Punktdiagramm erstellt, so daß die Maxima der Kurven ermittelt werden konnten.

D. quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Bei der PCR wird die Ausgangs-DNA exponentiell amplifiziert: $Z_{(n)} = Z_{(0)} * E^n$

$Z_{(0)}$ ist die Ausgangsmenge an DNA zu Reaktionsbeginn. $Z_{(n)}$ ist die amplifizierte DNA-Menge nach n Zyklen. Die Effizienz E ist die Basis der Exponentialfunktion, mit $1 \leq E \leq 2$.

Durch die Interkalation eines Fluoreszenzfarbstoffes, wie SYBR-Green (ROCHE), in doppelsträngige DNA, ist bei der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR) das Aufzeichnen der Reaktionskinetik, sowie die genaue Quantifizierung der Ausgangsmenge an DNA möglich. SYBR-Green fluoresziert erst nach der Interkalation in doppelsträngige DNA mit einem Excitations- bzw. Emissionsspektrum bei 509 bzw. 526nm. Die Reaktionskinetik wird durch das Messen der Veränderung des Fluoreszenzsignals am Ende eines jeden Elongationsschrittes, bestimmt. Das gemessene Fluoreszenzsignal ist der Menge an doppelsträngiger DNA direkt proportional. Die absolute Quantifizierung einer DNA-Konzentration ist nur durch das gleichzeitige Vermessen einer Verdünnungsreihe, bekannter Konzentration, mit dem selben Primerpaar möglich.

Für die qPCR-Reaktion wurden in einem 20µl Ansatz 4µl der zu amplifizierenden DNA, 4pmol des *forward*-Primers und 4pmol des *reverse*-Primers, 0,25µl einer 1:400 000 verdünnten SYBR-Green Stocklösung, 0,4 U HotStarTaq-Polymerase (QIAGEN), sowie 9,67µl eines Mastermixes, der 0,2mM Nukleotide, den PCR-Puffer in einfacher Endkonzentration (1x) und MgCl₂ in einer Endkonzentration von 2,5mM enthält, eingesetzt. Die qPCR wird im Rotor-Gene RG3000 von CORBETT RESEARCH durchgeführt. SYBR-Green wird bei 480nm angeregt und die Fluoreszenz bei 510nm gemessen.

qPCR-Ansatz	μl / Reaktion	Master-Mix	μl / Reaktion
Master Mix	9,67	10x PCR-Puffer (QIAGEN)	2,00
HotStarTaq [5U/ μl] (QIAGEN)	0,08	25mM MgCl_2 (QIAGEN)	0,80
SYBR-Green (1: 400 000) (ROCHE)	0,25	10mM dNTPs	0,40
<i>forward</i> -Primer [10 μM]	0,40	H_2O	6,47
<i>reverse</i> -Primer[10 μM]	0,40	Gesamt	9,67
H_2O	5,20		
Gesamt	16,0		

2.2.4. Nukleipräparation

Ein Liter Hefekultur wird bis zur frühen logarithmischen Phase kultiviert und anschließend für 20min mit 1% Formaldehyd bei 30°C im Schüttelinkubator (180rpm) fixiert. Die Reaktion wird für 5min mit 125mM Glycin gestoppt. Im Anschluß werden die Zellen geerntet (3000g, 10min, 4°C), mit eiskaltem H_2O gewaschen, in ein 50ml Falcon überführt und ihr Naßgewicht bestimmt. Die Hefen werden mit 2 Volumen Vorinkubationslösung (0,7M β -Mercaptoethanol, 2,8mM EDTA (pH 8)) für 30min bei 30°C unter Schütteln vorinkubiert, pelletiert (3000g, 5min, 4°C) und mit 50ml 1M Sorbitol gewaschen. Zum Spheroplastieren werden die Hefezellen in 5ml Lysepuffer (1M Sorbitol, 5mM β -Mercaptoethanol) pro Gramm Zellpellet (Naßgewicht) resuspendiert, mit 1/50 Volumen Zymolyase-Lösung [20mg/ml] versetzt und für 15min unter leichtem Schütteln bei 30°C inkubiert. Vor der Zugabe der Zymolyase und nach 15-minütiger Reaktion werden 10 μl der Zellsuspension 100-fach in H_2O verdünnt und die OD_{600} bestimmt. Diese sollte um 5-20% bezüglich des Anfangswertes gesunken sein.

Die Spheroplasten werden mit 1/100 Volumen Proteaseinhibitoren versetzt, abzentrifugiert (2000g, 5min, 4°C) und zwei Mal mit 50ml kaltem 1M Sorbitol + PI gewaschen (+ PI). Die Spheroplasten werden in 7ml Ficoll-Lösung + PI (18% Ficoll 400 (w/v), 20mM KH_2PO_4 (pH 6,8 mit KOH), 1mM MgCl_2 , 0,25mM EGTA (pH 8,3), 0,25mM EDTA (pH 8)) pro Gramm Zellpellet (Naßgewicht) zum Platzen gebracht und zu Portionen à 1,2ml in 1,5ml Reaktionsgefäßen aliquotiert. Schließlich werden die Kerne abzentrifugiert (13000rpm, >15min, 4°C) und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.5. *In vitro* ChEC (*chromatin endogenous cleavage*)

Eine 50ml Hefekultur wird bis zu einer OD_{600} von 0,6 kultiviert und anschließend für 20min mit 1% Formaldehyd bei 30°C im Schüttelinkubator (180rpm) fixiert. Die Reaktion wird für 5min mit 125mM Glycin gestoppt. Im Anschluß werden die Zellen geerntet (4000rpm, 5min, RT) und danach mit H_2O gewaschen. Die Zellen werden erneut zentrifugiert und der

Überstand abgenommen. Das Zellpellet kann gegebenenfalls in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert werden.

Die Zellen werden drei Mal mit je 1ml Puffer A + PI gewaschen und abzentrifugiert (13000rpm, 2min, 4°C). Der Überstand wird jeweils verworfen. Zur Kernpräparation werden die Zellen in 350µl Puffer A + PI resuspendiert, mit -20°C kalten Glaskugeln (0,75-1mm) bis zum Flüssigkeitsstand aufgefüllt und anschließend für 10min bei 4°C auf einem Vibrax bei maximaler Leistung lysiert. Längere Lysezeiten (45min) zerstören die genomische DNA.

Mit einer heißen Nadel wird ein Loch in den Boden des 1,5ml-Reaktionsgefäßes gestochen, dieses auf ein 15ml Falcon gesetzt und die Kernsuspension abzentrifugiert (2000rpm, 2min, 4°C), resuspendiert und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Die Kerne werden abzentrifugiert (13000rpm, 2min, 4°C), mit 1ml Puffer A + PI gewaschen und ein weiteres Mal abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Die Kerne können gegebenenfalls in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert werden.

Die Kerne werden in 400µl Puffer Ag + PI resuspendiert, wovon eine Nullkontrolle abgenommen wird, bei der kein ChEC induziert wird. Die Nullkontrolle und die restliche Kernsuspension werden für 3min bei 30°C vorgewärmt. Die Aktivierung der MNase erfolgt durch Zugabe von 2mM CaCl₂ zur Kernsuspension. Die Nullkontrolle und die ChEC-Reaktion werden bei 30°C inkubiert und durch Zugabe des gleichen Volumens an IRN-Puffer zu den gewünschten Zeitpunkten gestoppt. Die Nullkontrolle wird zum letzten Zeitpunkt mit dem gleichen Volumen IRN-Puffer versetzt. Für Stämme, in denen die MNase mit Nukleosomenkomponenten wie H2B, H3 oder H4 fusioniert ist, eignen sich folgende Zeitpunkte: 5, 15 und 180 Sekunden. Für alle anderen Fusionsproteine eignen sich Verdauzeiten von 5, 10 und 30 Minuten.

Die gestoppte Reaktion wird entweder zunächst mit Psoralen vernetzt (s. 2.2.6.) oder direkt mit 1µl RNase A [100mg/ml] versetzt und für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wird 1/40 Volumen 20% SDS und 2µl Proteinase K [10mg/ml] zugegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. Die Formaldehydquervernetzung wird bei 65°C über Nacht oder für mindestens 6h rückgängig gemacht. Die DNA wird Phenol-Chloroform extrahiert, mit Ethanol gefällt und schließlich in TE aufgenommen. Die DNA wird mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten (in dieser Arbeit immer XcmI), in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert (2.2.3.C).

2.2.6. Psoralenvernetzung

Zur Psoralenvernetzung werden entweder ganze Hefezellen, resuspendiert in 200µl Puffer Ag/ IRN (1:1), oder 200µl Nuklei eines ChECs eingesetzt. Die Zellen/ Nuklei werden in eine 24-Lochplatte überführt, mit 10µl Trimethylpsoralen (TMP; 0,2mg/ml in abs. EtOH) versetzt und für 5min in der Dunkelheit inkubiert. Anschließend wird die 24-Lochplatte auf Eis gestellt und für 15min mit UV-Licht (288nm) bestrahlt, wobei der Abstand zwischen den Röhren der Lampe und der Platte ca. 1-2cm beträgt. Nach der Hälfte der Inkubationszeit wird

die Platte zur Minimierung des Absetzens der Zellen/ Nuklei am Boden der Platte geschwenkt. Die TMP-Zugabe (10µl) und die UV-Exposition (15min) werden zwei Mal wiederholt.

Anschließend werden die Zellen/ Nuklei in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Für die DNA Präparation der Nuklei verfährt man, wie unter 2.2.5. beschrieben.

Die Zellen werden abzentrifugiert (2000rpm, 2min, 4°C), in 500µl 1M Sorbitol, 0,1M EDTA resuspendiert und mit 6µl Zymolyase [20mg/ml] versetzt für 1h bei 35°C im Thermomixer unter Schütteln (750rpm) spheroplastiert. Die Spheroplasten werden abzentrifugiert (7100rpm, 5min, RT) und in 400µl IRN, Puffer A (1:1) resuspendiert. Nach der Zugabe von 1/40 Volumen 20% SDS werden die Spheroplasten gevortext und für 30min bei 65°C inkubiert. Zur DNA Präparation wird zunächst 1µl RNase A [100mg/ml] zugegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wird mit 2µl Proteinase K [10mg/ml] für 1h bei 37°C inkubiert. Die Formaldehydquervernetzung wird bei 65°C über Nacht oder für mindestens 6h rückgängig gemacht. Die DNA wird Phenol-Chloroform extrahiert, mit Ethanol gefällt und schließlich in TE aufgenommen.

Die DNA wird mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und im Agarosegel aufgetrennt. Die Psoralenvernetzung wird durch die Bestrahlung des Gels mit UV-Licht (254nm, Geldokumentationssystem) für jeweils 2min von beiden Seiten rückgängig gemacht. Die DNA wird mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert (2.2.3.C)

2.2.7. Transformation und Kultur von *E. coli* zur Amplifikation rekombinanter DNA

A. Präparation elektrokompetenter Bakterien

Ein Liter LB/Tet-Medium wird mit einer 10ml Übernachtskultur von *E.coli* des Stammes XL1BlueMRF' (gewachsen in LB/Tet) angeimpft und unter Schütteln inkubiert, bis die Kultur eine OD₆₀₀ ≈ 0,5 erreicht (ca. 4-5h). Die Bakterien werden auf Eis abgekühlt und durch Zentrifugation in der Kühlzentrifuge bei 0°C (5000rpm, 5min) geerntet. Das Bakterienpellet wird zweimal mit eiskaltem sterilem H₂O gewaschen (1l und 0,5l), danach in 20ml eiskaltem sterilem, 10%igem Glycerin resuspendiert und erneut zentrifugiert. Schließlich wird das Bakterienpellet in 2ml eiskaltem sterilem, 10%igem Glycerin aufgenommen und auf Eis zu Portionen à 50µl aliquotiert, die entweder direkt zur Elektroporation eingesetzt werden können oder auf Trockeneis eingefroren werden und bei -80°C gelagert werden. Frisch präparierte Bakterien weisen nach der Transformation mit pBluescript KS, mit ca. 4·10⁹ Kolonien pro µg DNA, eine 3-4 mal höhere Kompetenz als eingefrorene auf.

B. Elektroporation

Zur Elektrotransformation wird 1ng DNA des Ligationsansatzes zu 50µl, auf Eis aufgetauten oder frisch präparierten, elektrokompetenten Bakterien gegeben. Die Mischung wird in eine auf Eis vorgekühlte Einwegelektroporationsküvette, mit einem Plattenabstand von 0,2cm (EQUIBIO) überführt und bei folgenden Parametern elektroporiert: Impulsdauer $t \approx 5\text{ms}$, Spannung $U = 2,5\text{kV}$. Nach der Pulsapplikation wird sofort 37°C warmes Soc-Medium zugegeben und die Suspension für 30min bei 37°C inkubiert. Schließlich werden die mit den Plasmiden transformierten Bakterien (*E. coli* XLBlue MRF', endogen tetracyclinresistent, ampicillinresistent nach Transformation mit dem Vektor pBluescript KS) in geeigneten Verdünnungen unter sterilen Bedingungen mit einem Drigalskyspatel mittels einer rotierenden Plattform auf LB/Amp-Platten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

C. Flüssigkultur

Zur Plasmidpräparation werden mit einer sterilen Pipettenspitze gut vereinzelte Kolonien einer Agarplatte gepickt oder ein Eisstück von der Oberfläche einer eingefrorenen Glycerinkultur gekratzt und in 5ml LB/Amp-Medium (50µg/ml Ampicillin) angeimpft. Verwendet werden dazu sterile Plastikröhrchen mit Deckel. Unter Schütteln wird bei 37°C über Nacht inkubiert.

D. Dauerkultur in Glycerin

Zur Herstellung von Dauerkulturen werden 850µl einer eben stationären Flüssigkultur mit 150µl 100%igem sterilem Glycerin gemischt, auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Reaktivierung der Dauerkulturen wird wie unter C beschrieben, verfahren.

2.2.8. Transformation und Kultur von *S. cerevisiae*

A. Präparation kompetenter Hefen

Eine logarithmisch wachsende Hefekultur (50ml) wird pelletiert (4000rpm, 5min, RT) und zunächst mit 0,5 Volumen sterilem H₂O und dann mit 0,1 Volumen LiTSorb (1M Sorbitol in TELit (steril filtriert); TELit: 100mM LiAc, 10mM Tris-HCl (pH 8,0), 1mM EDTA (pH 8,0); pH 8 mit verdünnter Essigsäure) gewaschen. Schließlich werden die Hefezellen in 360µl LiTSorb, sowie 40µl denaturierter Lachssperma DNA [10mg/ml; 10min, 99°C, in Eiswasser kühlen und bei -20°C lagern] resuspendiert und zu Portionen à 50µl aliquotiert, die entweder direkt zur Transformation eingesetzt werden können oder langsam eingefroren und bei -80°C gelagert werden. Beim Einfrieren in flüssigem Stickstoff verlieren die Zellen ihre Kompetenz.

B. Transformation

Zur Transformation werden maximal 10µl DNA zu 50µl, auf Eis aufgetauten oder frisch präparierten, kompetenten Hefen gegeben. Die Mischung wird mit 6 Volumen LitPEG (40% PEG3350 in TELit (steril filtriert, Lagerung bei 4°C)) versetzt und für 30min bei RT inkubiert. Danach wird 1/9 Volumen DMSO zu den Zellen gegeben. Nicht temperatursensitive Stämme werden für 15min einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, temperatursensitive Stämme werden für 15min bei RT inkubiert. Schließlich wird der Transformationsansatz abzentrifugiert, die Hefezellen in YNB resuspendiert und auf geeignete Selektionsplatten ausgestrichen. Bei Geneticinplatten (Kanamycinresistenz) werden die Zellen vor dem Ausstreichen für zwei Verdopplungszeiten in 3ml YPD bzw. YPG kultiviert.

C. Flüssigkultur

Zur Hefeploidiepräparation werden mit einer sterilen Pipettenspitze gut vereinzelte Kolonien einer Agarplatte gepickt oder zur Reaktivierung der Hefen ein Eisstück von der Oberfläche einer eingefrorenen Glycerinkultur gekratzt und in 5ml YP-Medium (mit dem entsprechenden Zucker) angeimpft. Verwendet werden dazu sterile Plastikröhrchen mit Deckel. Unter Schütteln wird bei 30°C über Nacht inkubiert.

D. Dauerkultur in Glycerin

Zur Herstellung von Dauerkulturen werden 850µl einer eben stationären Flüssigkultur mit 150µl 100%igem sterilem Glycerin gemischt, auf Trockeneis eingefroren und bei –80°C gelagert.

Zur Reaktivierung der Dauerkulturen wird wie unter C beschrieben, verfahren.

E. Tüpfeltest

Eine gut vereinzelte Kolonie wird mit einer sterilen Pipettenspitze von einer Agarplatte gepickt und in 1ml sterilem H₂O resuspendiert. Von einer 1:10-Verdünnungsreihe (5 Verdünnungen) werden jeweils 10µl auf eine Agarplatte pipettiert. Die Agarplatten werden bei 16, 24, 30 oder 37°C durchschnittlich für 2-5 Tage kultiviert.

F. Etablierung der MNase-Fusionsstämme

Für jedes Zielgen wurde zunächst eine PCR mit Überhangprimern durchgeführt. Die verwendeten Primer bestehen aus einem 5' Ende mit 45bp vor bzw. 45bp rervers komplementärer Sequenz nach dem Stopcodon des Zielgenes, sowie pKM9 Sequenzen am 3'Ende, die vor und hinter der MNase-KanMX6 Kassette hybridisieren (S3/S2-Adapter). Zur Gewährleistung der Aktivität der MNase, wurde für die PCR eine Polymerase mit Korrekturlesefunktion (*proofreading*) eingesetzt und das PCR-Produkt vor der

Transformation zunächst in pBluescript kloniert und sequenziert (s. Tab. 2-3). Für jeden Hefetransformationsansatz wurden ca. 5-10µg DNA benötigt. Die Menge an rekombinanter DNA konnte durch die Amplifikation in *E. coli* im Gegensatz zur PCR, die nur kleine Mengen lieferte (<1µg/ PCR-Reaktion), erheblich gesteigert werden (bis zu 75µg DNA/ 5ml LB Kultur). Für die Transformation wurde das Insert mit Restriktionsenzymen ausgeschnitten, da einfaches Linearisieren des Plasmids für die homologe Rekombination in diesem Fall nicht auszureichen schien. Transformiert wurden ein Wildtypstamm (NOY505), ein konstitutiv aktiver Stamm mit 40 rDNA Kopien pro Zelle (NOY886), zwei UAF-Deletionsmutanten (NOY699, NOY703), ein CF-Deletionsstamm (NOY558), eine UAF/CF-Doppeldeletionsmutante (Uaf/Cf), eine temperatursensitive Rrn3p-Mutante (YCC95) und ein Stamm, bei dem die rDNA chromosomal deletiert ist und sich eine rDNA Kopie auf einem Multikopienplasmid befindet (YKM1). Die transformierten Zellen wurden auf Geneticinplatten selektioniert, ihre Proteine mittels denaturierender Proteinextraktion isoliert und im Westernblot analysiert. Wiesen sie dort die richtigen Größen auf, wurde die genomische DNA dieser Stämme isoliert, das Gen des Fusionsproteins mit Restriktionsenzymen geschnitten und die Größen der Fragmente im Southernblot analysiert.

2.2.9. Proteinbiochemische Methoden

A. Denaturierende Proteinextraktion aus Hefezellen

Eine Streichholzkopf große Menge an Zellen wird in 1ml eiskaltem H₂O resuspendiert und durch Zugabe von 150µl Vorbehandlungslösung (1,85M NaOH, 1M β-Mercaptoethanol) lysiert. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis, werden die Proteine durch Zugabe von 55% TCA gefällt. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis werden die Proteine für 10min bei 13000 rpm und 4°C abzentrifugiert.

Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Das Pellet wird im entsprechenden Volumen HU-Puffer (5% SDS, 200mM Tris (pH 6,8), 1mM EDTA, 2,13mM β-Mercaptoethanol, 8M Harnstoff, Bromphenolblau; Lagerung bei -20°C) resuspendiert und bei Farbumschlag des Indikators Bromphenolblau zu gelb (sauer), mit Ammoniakdampf neutralisiert (blau). Die Proteine werden für 10min bei 95°C unter Schütteln im Thermomixer denaturiert und die Zelltrümmer bei 13000rpm für 1min bei RT abzentrifugiert. Der Überstand wird im Western Blot analysiert.

B. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die vertikale, diskontinuierliche SDS-PAGE nach Lämmli (1970), zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe, werden 10-15%ige SDS-Gele verwendet.

Trenn- und Sammelgel werden wie folgt angesetzt:

Trenngel:				Sammelgel:	
	10%	12%	15%		5%
Acrylamid / Bis [ml]	1,67	2,0	2,5	Acrylamid / Bis [ml]	0,325
Lower Tris [ml]	1,25	1,25	1,25	Upper Tris [ml]	0,625
Wasser [ml]	2,08	1,75	1,25	Wasser [ml]	1,775
TEMED [ml]	5	5	5	TEMED [ml]	3
10 % APS [ml]	20	20	20	10 % APS [ml]	15

Die Proben aus der denaturierenden Proteinextraktion werden auf das Sammelgel geladen. Bei einem anschließendem *Semi-Dry*-Transfer auf eine PVDF-Membran dient der Prestained Protein-Marker Broad Range von NEW ENGLAND BIOLABS als Größenreferenz. Die Elektrophorese wird in SDS-Laufpuffer bei einer Spannung von 150-180V durchgeführt.

C. Western Blot

Mit Hilfe des *Semi-Dry*-Transfers werden die durch das SDS negativ geladenen Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die Membran übertragen. Dazu wird eine zunächst mit Methanol, dann mit Transferpuffer (25mM Tris, 190mM Glycin, 20% (v/v) Methanol; pH 8,3 mit HCl) befeuchtete ImmobilonTM PSQ 0,2 µm Membran von MILLIPORE auf drei Lagen ebenfalls in Transferpuffer getränktes 3MM Filterpapier gelegt. Nach der Elektrophorese wird das SDS - Polyacrylamidgel luftblasenfrei auf die Membran gelegt und mit drei weiteren Lagen feuchtem 3MM Filterpapier bedeckt. Dieser Aufbau wird so zwischen den Elektroden einer *Semi-Dry* Apparatur (BIORAD) eingespannt, so daß die negativ geladenen Proteine in Richtung der Anode auf die Membran übertragen werden. Der Transfer erfolgt für eine Stunde bei 24 V.

D. Ponceaufärbung von membrangebundenen Proteinen

Zur Kontrolle des Transfers im Western Blot werden die membrangebundenen Proteine durch Ponceau S (0,5% Ponceau in 1% Essigsäure) für 3min reversibel angefärbt. Die Membran wird anschließend mit H₂O gewaschen und entfärbt.

E. Detektion von Proteinen im Westernblot

Nach dem Proteintransfer wird die PVDF-Membran für mindestens eine Stunde mit Blockierungspuffer (5% Milchpulver in PBST (0,05% Tween20 in PBS)) blockiert, wodurch unspezifischen Bindungen des Antikörpers vorgebeugt werden. Danach erfolgt die Inkubation in der jeweils angegebenen Verdünnung mit dem Primärantikörper (in 2% Milchpulver in PBST) für 1h bei RT. Die Membran wird drei Mal für jeweils fünf bis zehn Minuten mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper (meist Meerrettich-

Peroxidase gekoppelt) bei RT für 30-40 Minuten inkubiert. Nicht gebundene Antikörper werden durch erneutes dreimaliges Waschen für jeweils fünf Minuten entfernt.

Das BM Chemilumineszenz-Blotting-Substrates (POD) von ROCHE ermöglicht die Detektion der Immunmarkierung durch die extrem effiziente Produktion von sichtbarem Licht. Die chemiluminografische Detektion erfolgt über den Fluoreszent-Image Reader LAS-3000 von FUJIFILM.

3. Ergebnisse

3.1. Lokalisierung chromatinassoziierter Faktoren an der rDNA mittels *in vitro* ChEC (*chromatin endogenous cleavage*)

Die präzise Lokalisierung einzelner chromatinassoziierter Faktoren an der rDNA erfolgte mittels *in vitro* ChEC (Schmid et al., 2004). Dafür wurde eine Kollektion Hefestämme etabliert, die ein C-terminales Fusionsprotein exprimieren, das aus dem Protein, dem das Interesse gilt, und einer MNase besteht. Zur Aktivierung benötigt die MNase Ca^{2+} , dessen cytoplasmatische und nukleäre Konzentrationen zur Aktivierung der MNase zu gering sind. Nach der Formaldehydvernetzung der Zellen und der Nukleiisolierung wird die MNase durch Ca^{2+} -Zugabe aktiviert, so daß die DNA an den Stellen geschnitten wird, an denen sie mit dem Fusionsprotein assoziiert ist. Nach dem Stoppen der Reaktion durch die Komplexbildung der Ca^{2+} -Ionen wird die DNA isoliert, mit einem Restriktionsenzym linearisiert und in einem Agarosegel der Größe nach aufgetrennt. Die genaue Lokalisierung der Assoziationsstellen erfolgt mittels Southernblot und indirekter Endmarkierung (Abb. 3-1).

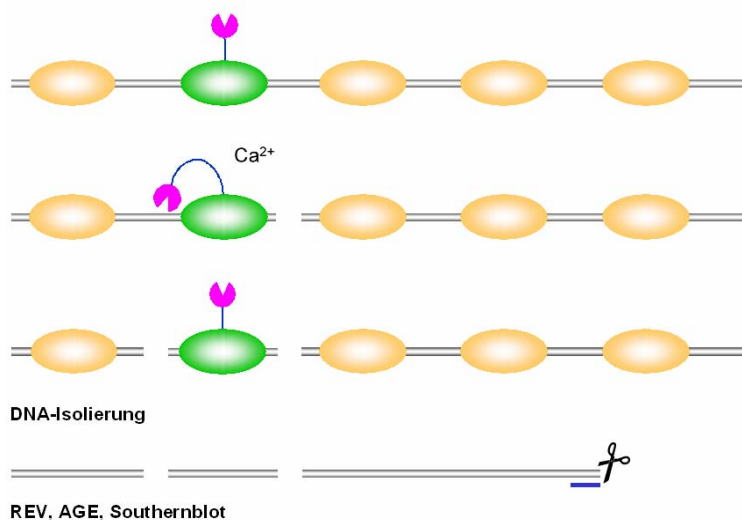


Abb. 3-1: *In vitro* ChEC. Die Nuklei formaldehydvernetzter Zellen werden isoliert. Das C-terminale MNase-Fusionsprotein wird durch Ca^{2+} -Zugabe aktiviert und schneidet die DNA dort, wo es mit ihr assoziiert ist. Nach der DNA-Isolierung wird diese mit einem Restriktionsenzym verdaut (REV) und in einem Agarosegel der Größe nach aufgetrennt (AGE). Die Lokalisierung der Assoziationsstellen erfolgt mittels Southernblot und indirekter Endmarkierung.

3.1.1. Etablierung der MNase-Fusionsstämme

Zunächst wurde hinter die für die MNase kodierende DNA-Sequenz des Plasmids pFA6a-MN-KanMX6 (Schmid et al., 2004) ein DNA-Element, welches für einen dreifachen HA-Tag kodiert, kloniert (pKM9). Dadurch war es einerseits möglich, die Expression des richtigen Fusionsproteins im Westernblot zu überprüfen und andererseits die Proteine mittels Immunfluoreszenz in der Zelle zu lokalisieren. Es wurden MNase-Fusionsstämme folgender Hintergrundstämme etabliert: NOY505 (Wildtypstamm), NOY886 (konstitutiv aktiver Stamm mit 40 rDNA Kopien pro Zelle), NOY699, NOY703 (UAF-Deletionsmutanten), NOY558 (CF-Deletionsstamm), YKM41 (UAF/CF-Doppeldeletionsmutante), YCC95 (temperatur-

sensitive Rrn3p-Mutante) und YKM1 (mit chromosomal deletierter rDNA und einer rDNA Kopie auf einem Multikopienplasmid). Die etablierten Stämme sind in Tab. 2-4 aufgelistet. Die Konstruktion von MNase-Fusionsstämmen war sowohl für NOY703 und NOY558 als auch für NOY699 und YKM41 mit großen Schwierigkeiten verbunden. Vermutlich war aufgrund der hohen Verdopplungszeiten ($> 6h$) keine effiziente Herstellung kompetenter Zellen möglich. Insgesamt konnten nur fünf Stämme etabliert werden, wobei für NOY699 und YKM41 trotz mehrmaliger Versuche keine Transformanten erhalten wurden.

Die Stämme wurden in Tüpfeltests auf Temperatursensitivität untersucht, wobei nur für die Histon H3-MNase-Fusionsstämmen YKM04 und YKM12 Temperatursensitivität bei 37°C festgestellt werden konnte, nicht jedoch für YKM20. Das Wachstumsverhalten wurde anhand von Wachstumskurven untersucht, wobei sich herausstellte, daß die Verdopplungszeit meist gleich lang oder um fünf bis zehn Minuten länger war als die des korrespondierenden Wildtypstammes. Die rDNA Kopienzahl wurde mittels qPCR bestimmt und entsprach ebenfalls in etwa der des korrespondierenden Wildtypstammes.

3.1.2. Lokalisierung chromatinassoziierter Faktoren im Wildtypstamm NOY505

Die MNase-Fusionsstämmen von NOY505 besitzen eine offene und eine geschlossene Chromatinform

Psoralenvernetzungsanalysen zeigten, daß in exponentiell wachsenden Hefezellen etwa die Hälfte der rRNA Gene in offener Form vorliegt (Dammann et al., 1993). Die Zellen einiger der konstruierten Hefestämme wurden wie unter 2.2.6. beschrieben mit Psoralen vernetzt (s. Abb. 1-6, Kapitel 1.4.1.). Alle untersuchten Stämme wiesen dabei zwei Banden auf, die der offenen und der geschlossenen Chromatinform entsprechen (Abb. 3-2). Als Kontrolle diente zum einen DNA, die nicht mit Psoralen vernetzt wurde und als einfache Bande im Agarosegel migriert und die DNA aus psoralenvernetzten Nuklei des korrespondierenden Wildtypstammes NOY505, die wie die DNA aus Zellen der Transformanten zwei Banden ergibt. In Abb. 3-2 ist deutlich zu erkennen, daß die beiden Banden der DNA aus psoralenbehandelten Nuklei ein langsames Laufverhalten im Gel aufweisen als die der DNA psoralenbehandelter Zellen. Die beiden Banden der DNA aus psoralenbehandelten Nuklei sind außerdem stärker aufgetrennt. Beides spricht dafür, daß die DNA-Psoralenvernetzungseffizienz in Nuklei deutlich höher ist als die in intakten Zellen.

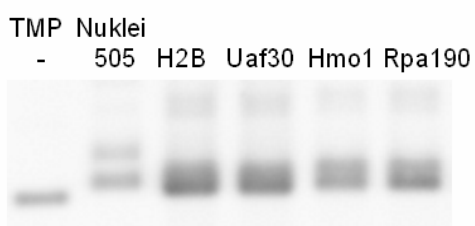


Abb. 3-2: Die MNase-Fusionsstämmen von NOY505 besitzen eine offene und geschlossene Chromatinform. Ganze Zellen bzw. Nuklei wurden mit Psoralen behandelt. Die DNA wurde isoliert, mit EcoRI linearisiert und im Southernblot mit der ORF-Sonde (Abb. 3-3) analysiert. Die obere Bande entspricht der offenen und die untere der geschlossenen Chromatinform.

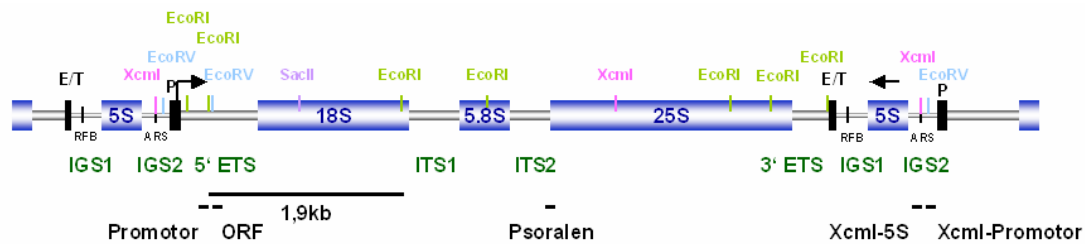


Abb. 3-3: rDNA Lokus mit den Schnittstellen XcmI, EcoRI, EcoRV und SacII. Die schwarzen Balken repräsentieren die Lage der verwendeten Sonden in der rDNA.

Lokalisation der Assoziationsstellen rDNA-bindender Proteine mittels ChEC

Zur Lokalisierung der Assoziationsstellen rDNA-bindender Proteine wurden die MNase-Fusionsstämme des Wildtypstammes NOY505 einer ChEC-Analyse unterzogen. Abb. 3-4 zeigt die Assoziationsstellen der MNase-Fusionsproteine der Histone H2B, H3 und H4, sowie verschiedener Transkriptionsfaktoren an der rDNA. Die Histongene liegen im Genom in zwei nahezu identischen Genkopien vor, welche auf unterschiedlichen Chromosomen liegen. Bei Histon H3 wurde HHT1, bei H4 HHF2 und bei H2B die nichtessentielle Genkopie HTB2 mit der MNase fusioniert. Die Fusion von HTB1, des essentiellen H2B-Gens, mit der MNase war bisher erfolglos. Würden die Histone genomweit statistisch verteilt in die Nukleosomen eingebaut werden und die beiden Histonkopien jeweils ähnlich stark exprimiert werden (ca. 15-20% Varianz; www.yeastgenome.org), sollte jeweils ein Histon eines Nukleosoms mit einer MNase versehen sein. Die Schnittmuster der Histon-MNase-Fusionsproteine sind mit einer Ausnahme (s.u.) über den gesamten rDNA Lokus identisch, wobei deutliche Schnittergebnisse im Bereich stromaufwärts des Promotors beobachtet werden. Das kleinste beobachtete Fragment (Abb. 3-4A) entsteht wahrscheinlich durch ein Histon-Fusionsprotein des ersten von fünf beschriebenen Nukleosomen (①) des intergenen *Spacers* 2 (Vogelauer et al., 1998). Der Abstand zum nächst größeren Fragment ist deutlich kleiner als die Größe eines Nukleosoms (~150bp). Histon H3, das neben H4 ein Bestandteil des UAFs ist, weist als einziges Histon einen zusätzlichen Schnitt auf, der sich mitten im *upstream* Element befindet (*; Abb. 3-4A, 3-5B). Im Bereich der transkribierten rDNA schneiden die Histone schwächer und weisen kein Muster positionierter Nukleosomen auf (Abb. 3-4, 3-5). Im Bereich des intergenen *Spacers* 2 können zwei weitere Nukleosomen detektiert werden, die zuvor beschrieben wurden (④,⑤; Abb. 3-4B). Auch im Bereich des intergenen *Spacers* 1 kann wie im transkribierten Bereich kein positioniertes nukleosomales Muster festgestellt werden. Mit der Nukleosomenpositionierung an der rDNA befaßt sich Kapitel 3.7.

Uaf30p und Rrn10p, weitere Bestandteile des UAFs, weisen im *upstream* Element des rDNA Promotors jeweils einen Doppelschnitt auf, wobei die Schnitte von Uaf30p weiter auseinander liegen als die von Rrn10p und diese flankieren. Rrn3p und die CF-Komponente Rrn7p schneiden die rDNA im Promotorbereich ebenfalls doppelt, jedoch nicht im *core* Element

(Abb. 3-4A). Rrn3p schneidet im *upstream* Element und weist die schwächste Bandenintensität aller Transkriptionsfaktoren auf, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, daß es nicht direkt an die rDNA bindet oder nur transient mit dieser assoziiert. Rrn7p schneidet außerhalb des *upstream* Elements, zum einen zwischen UE und CE und zum anderen direkt stromaufwärts vom UE. Bei einem Abstand von ~188bp zwischen den beiden Schnitten ist dies ein erster Hinweis darauf, daß die Promotor-DNA möglicherweise nicht linear ist. Alle vier Transkriptionsfaktoren weisen zusätzlich identische Schnittmuster am Enhancer auf (Abb. 3-4B). Hmo1p und Rpa43p zeigen über den gesamten transkribierten Bereich das gleiche Schnittmuster, mit einer hypersensitiven Stelle im Bereich des Terminators (<) und einer nukleaseunempfindlichen Stelle im Bereich des *core* Elements und Transkriptionsstartpunktes (•; Abb. 3-4). Die Schnittmuster von Rpa49p und Rpa190p sind mit dem von Rpa43p identisch (Daten nicht gezeigt).

Alle genannten Faktoren weisen im Bereich eines bidirektionalen RNA Polymerase II Promotors im intergenen *Spacer* 1 (Ganley et al., 2005; Kobayashi and Ganley, 2005) einen Doppelschnitt auf (–), der bei den Kontrollen fehlt. Als Kontrollen dienten der Wildtypstamm NOY505 (ohne MNase) und Rpb4p, eine Pol II Untereinheit. Weder NOY505 noch Rpb4p weisen an der rDNA ein Schnittmuster auf. Der „Schmier“ von NOY505 ist vermutlich auf intrazelluläre endogene Nukleasen zurückzuführen.

Die beobachteten Schnittereignisse am rDNA Promotor deuten darauf hin, daß die Promotor-DNA möglicherweise nicht linear ist und sich um UAF windet. Die Schnittereignisse von UAF und CF am Enhancer legen nahe, daß die Promotor- und Enhancerelemente miteinander interagieren, was eventuell durch die Ausbildung von Überstrukturen der rDNA hervorgerufen wird. Dies wird in Kapitel 4.1. ausführlich diskutiert.

Anhand des ChECs ist zwar die präzise Lokalisierung DNA-bindender Faktoren an der rDNA mit einer hohen Auflösung möglich, dabei kann jedoch nicht unterschieden werden, an welche der beiden Chromatinformen (offen/ geschlossen) der jeweilige Faktor bindet. Zur Differenzierung zwischen den beiden Chromatinformen wurde an die ChEC- eine DNA-Vernetzungsanalyse mit Psoralen angeschlossen.

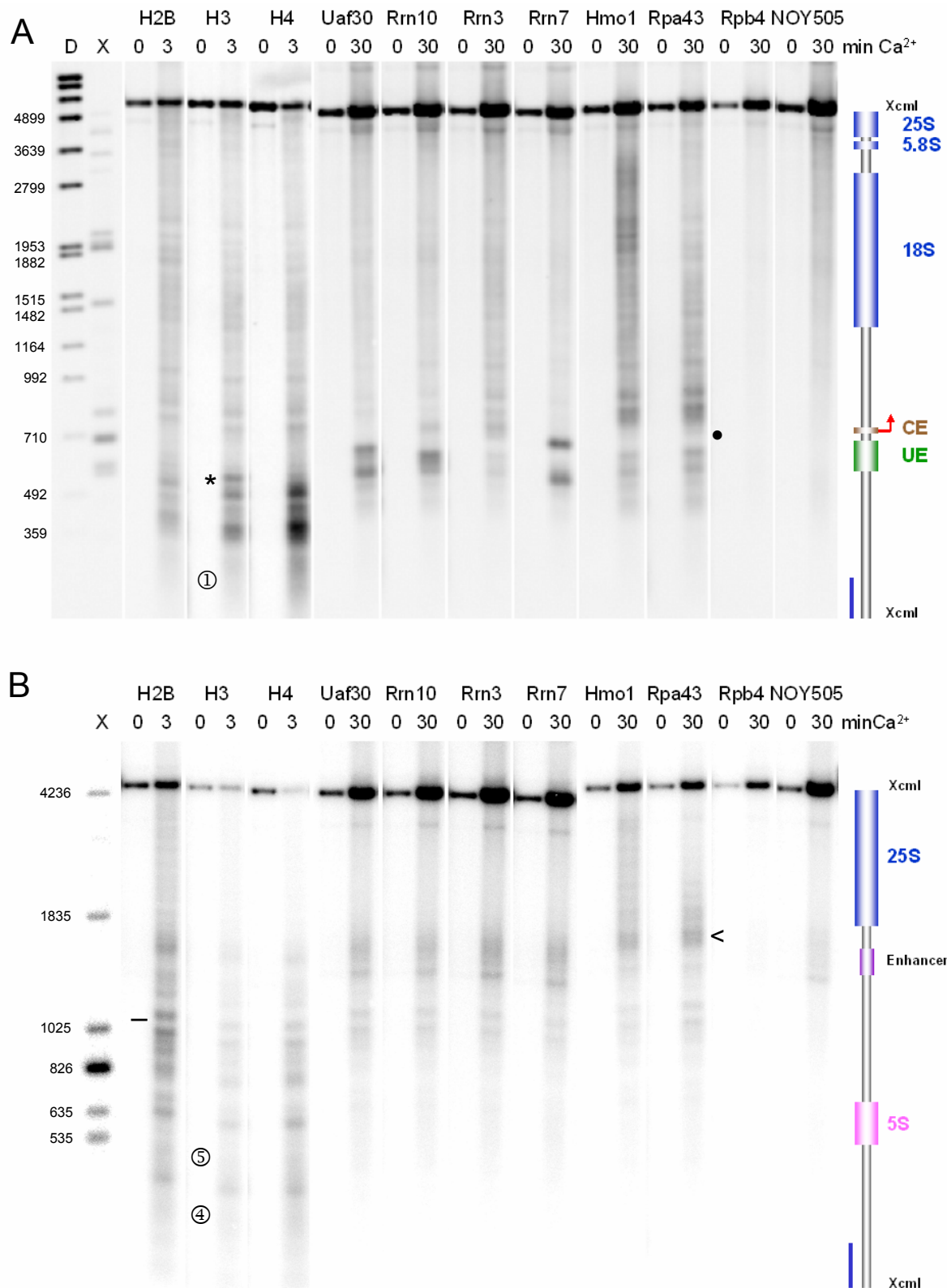


Abb. 3-4: Lokalisation der Assoziationsstellen rDNA-bindender Proteine mittels *in vitro* ChEC von Hefestämmen, die MNase-Fusionsproteine von Histonen und Transkriptionsfaktoren exprimieren. Nuklei formaldehydvernetzter Zellen wurden in Abwesenheit (0min) und Anwesenheit von Ca²⁺ für 3min (Histone) bzw. 30min bei 30°C inkubiert. Die DNA wurde isoliert und mit XcmI linearisiert. Von den 0min Ansätzen wurde 1/10, von den restlichen Proben der Gesamtansatz in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und im Southernblot mittels indirekter Endmarkierung analysiert. Autoradiogramme der Analysen (**A**) des Promotorbereichs und der 18S rDNA mit der XcmI-Promotor-Sonde und (**B**) der 25S rDNA und des intergenen *Spacers* mit der XcmI-5S-Sonde. Als Kontrollen dienten der Rpb4p-Fusionsstamm und der Wildtypstamm

NOY505 (ohne MNase). ①④⑤ Nukleosomen des intergenen *Spacers* 2; * Schnitt des Histon H3-Fusionsproteins im UE; • nukleaseunempfindliche Stelle im Bereich des Transkriptionsstarts und < hypersensitive Stelle im Terminationsbereich der Hmo1p- und Rpa43p-Fusionsstämme; – Doppelbande im Bereich eines bidirektionalen RNA Polymerase II Promotors im intergenen *Spacer* 1. D: Digoxigeninmarkierter DNA-Längenstandard; X: XcmI DNA-Längenstandard; die Fragmentgrößen sind in allen Abbildungen in Basenpaaren angegeben.

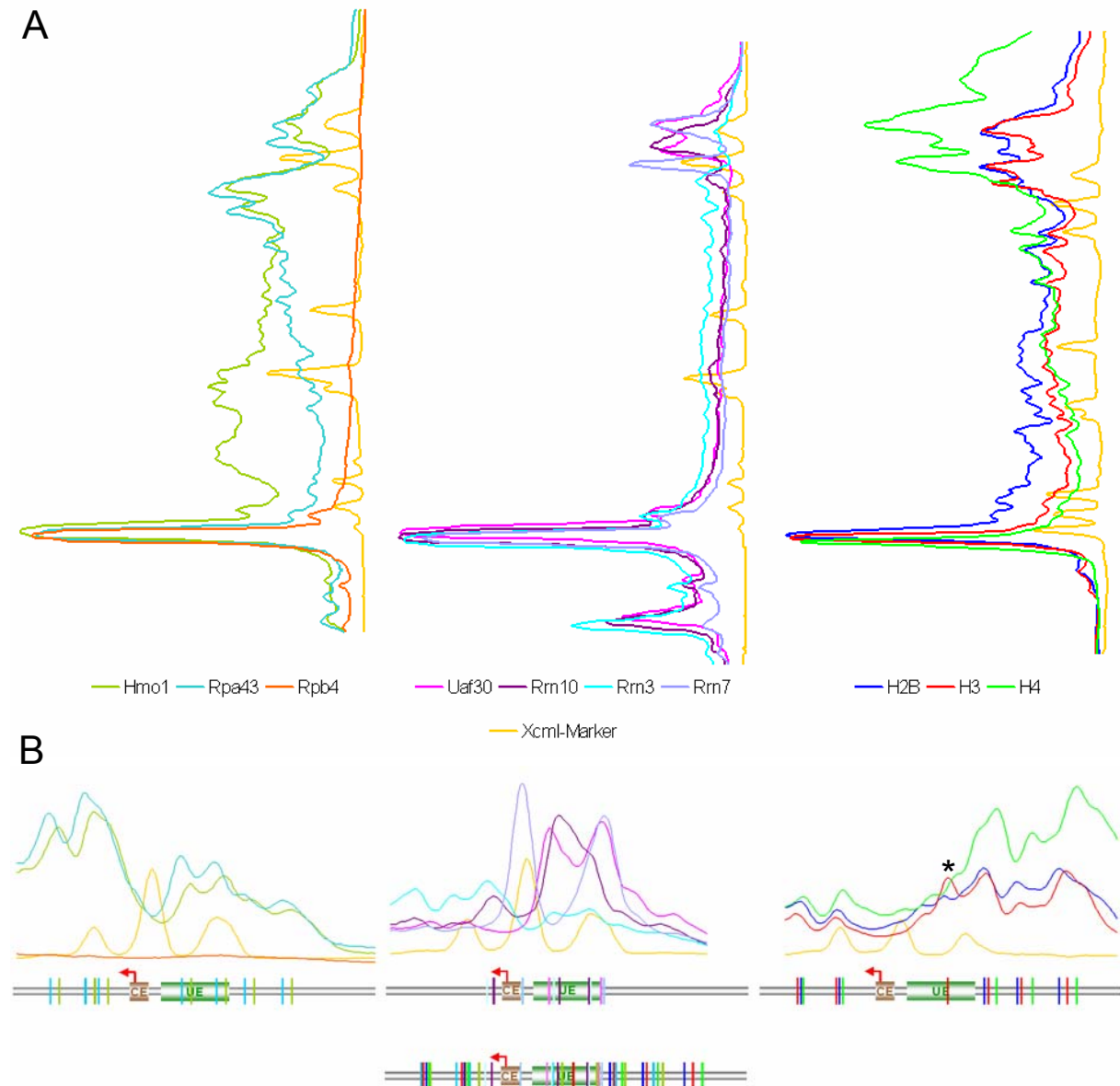


Abb. 3-5: Profilanalyse des Autoradiogramms der Abb. 3-4A. (A) Verteilung der Schnittereignisse über den Promotor- und den 18S rDNA-Bereich. Die Histone H2B, H3 und H4 weisen ein identisches Schnittmuster mit den meisten Schnitten stromaufwärts des Promotors auf. (B) Ausschnitt des Promotorbereichs. Das Histon H3-Fusionsprotein schneidet als einziges Histon im UE (*). Die Farbkodierung ist wie in Abb. 3-5A beschrieben. Unter den Profildiagrammen sind die verschiedenen cis-Elemente innerhalb der Promotorregion, sowie die Hauptschnittereignisse (= Peakregionen in der Profilanalyse) schematisch dargestellt.

3.1.3. Die Kombination von ChEC- und Psoralenvernetzungsanalyse ermöglicht die Bestimmung der Chromatinform, mit der rDNA-Bindeproteine assoziiert sind

Durch die Kombination der ChEC- und der DNA-Vernetzungsanalyse mit Psoralen kann die Chromatinform bestimmt werden, mit der rDNA-Bindeproteine assoziiert sind, was bisher nicht möglich war. Nach der Formaldehydvernetzung der Hefezellen und der Nukleiisolierung wird die MNase durch Ca^{2+} -Zugabe induziert. Nach dem Stoppen der Reaktion werden die Nuklei mit Psoralen vernetzt und ihre DNA isoliert. Anschließend wird die DNA mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut, in einem Agarosegel aufgetrennt und in einer Southernanalyse untersucht. Falls ein Faktor mit der gesamten Population der offenen Chromatinform assoziiert ist, wird diese von der MNase geschnitten und die obere Psoralenbande fehlt somit auf dem Southernblot. Ist nur ein Teil der Population mit dem Faktor assoziiert, nimmt die Intensität der oberen Bande ab (Abb. 3-6A). Für den Fall, daß ein Faktor mit der geschlossenen Form assoziiert ist, nimmt die untere Bande entsprechend ab oder verschwindet (Abb. 3-6B).

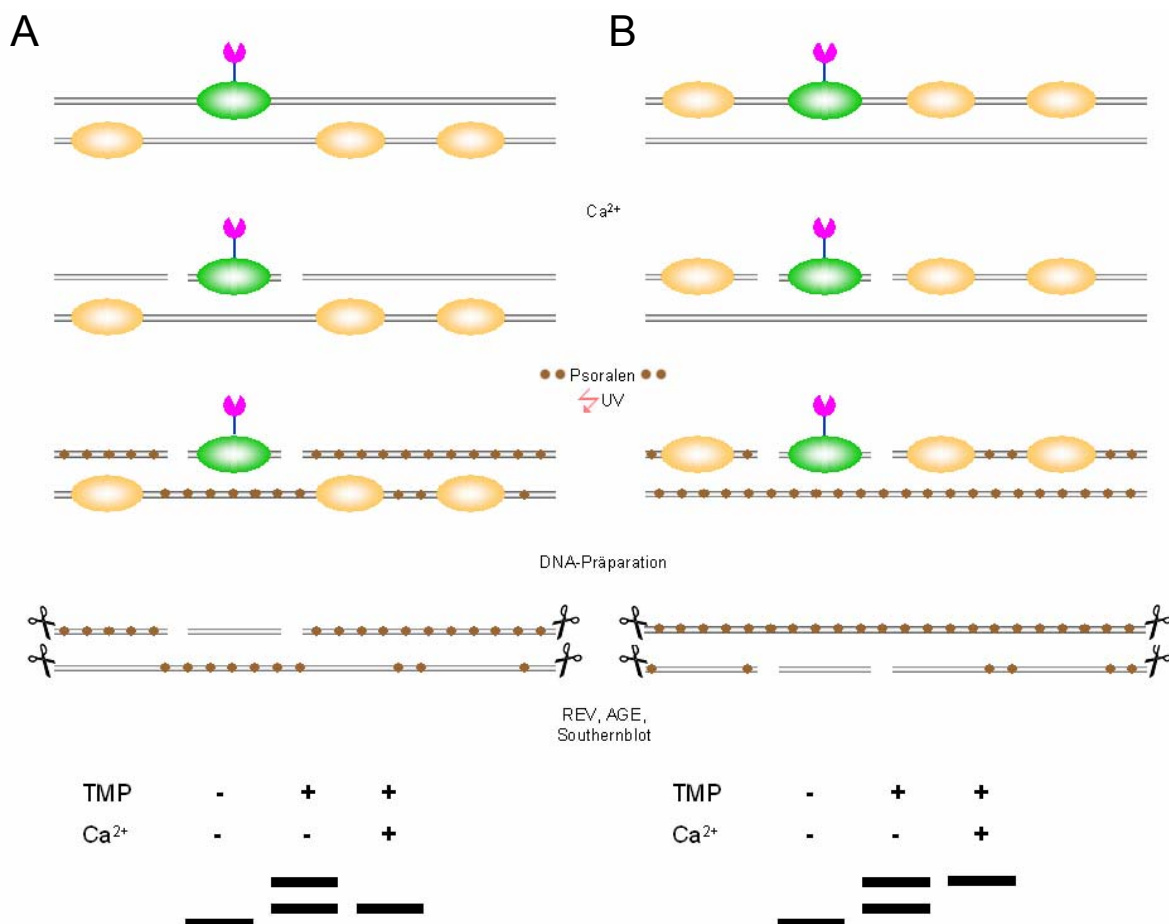


Abb. 3-6: Kombination der *in vitro* ChEC- und Psoralenvernetzungsanalyse. Die Nuklei formaldehydvernetzter Zellen werden isoliert. Das C-terminale MNase-Fusionsprotein wird durch Ca^{2+} -Zugabe aktiviert und schneidet die Population der rDNA, mit der es assoziiert ist. Anschließend werden die Nuklei mit Psoralen vernetzt. Nach der DNA-Isolierung wird diese mit einem Restriktionsenzym verdaut (REV), in einem Agarosegel aufgetrennt (AGE) und im Southernblot analysiert. (A) Ist das MNase-Fusionsprotein mit der offenen Chromatinform

assoziiert, wird diese von der MNase verdaut und die obere Psoralenbande verschwindet. **(B)** Ist es mit der geschlossenen Form assoziiert, verschwindet die untere Psoralenbande.

Rpa43p und Hmo1p sind mit der offenen und Histone mit der geschlossenen Chromatinform des transkribierten Bereichs assoziiert

Zur Untersuchung, mit welcher Chromatinform die Faktoren im transkribierten Bereich assoziiert sind, wurden die Nuklei aus Abb. 3-4 nach dem ChEC mit Psoralen vernetzt und die DNA mit EcoRI linearisiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3-7 dargestellt. Die Histone sind hauptsächlich mit der geschlossenen Form assoziiert, da die untere Psoralenbande präferentiell verschwindet. Für die Untereinheiten von UAF und CF, die an den Promotor der rDNA binden und keine Schnitte im transkribierten Bereich zeigten (Abb. 3-4), bleiben erwartungsgemäß beide Banden erhalten. Hmo1p und Rpa43p, die über den gesamten transkribierten Bereich schnitten, sind mit der offenen Chromatinform assoziiert, da bei ihnen die obere Bande verschwindet. Die Profilanalyse der Southernblots zeigt zusätzlich, keine Veränderung der Intensität der unteren Bande. Als Kontrolle diente der Wildtypstamm NOY505 ohne MNase, der sowohl vor als auch nach der Induktion der MNase zwei Banden zeigt, deren Intensität unverändert bleibt.

Im transkribierten Bereich sind Hmo1p und Rpa43p präferentiell mit der offenen und die Histone mit der geschlossenen Chromatinform assoziiert, während die anderen Transkriptionsfaktoren nicht gebunden sind.

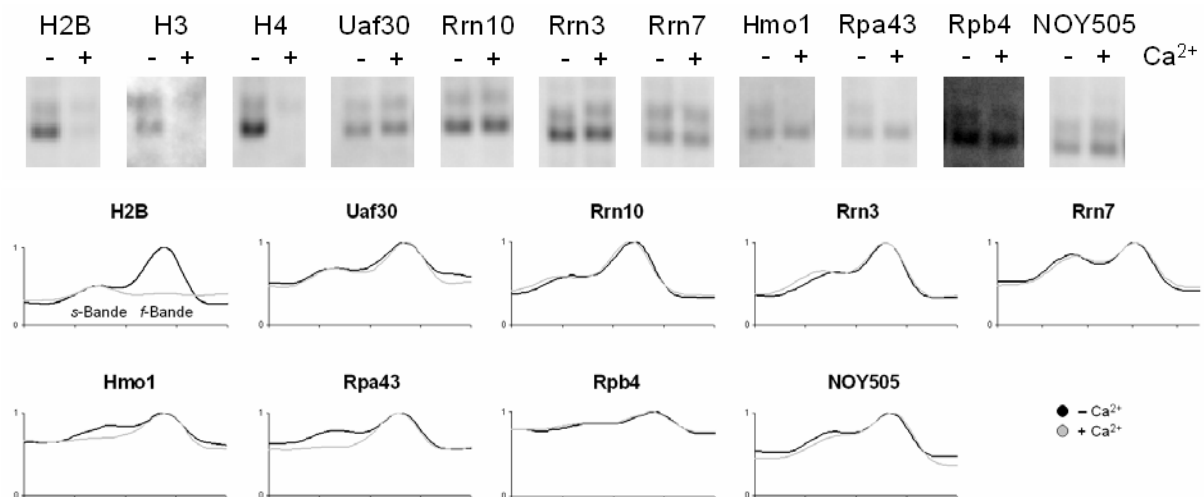


Abb. 3-7: Kombinierte *in vitro* ChEC- und Psoralenvernetzungsanalyse des transkribierten Bereichs. Formaldehydvernetzte Nuklei ohne (-) und mit (+) Induktion der MNase durch Ca^{2+} wurden im Anschluß an das ChEC Experiment mit Psoralen inkubiert und die DNA isoliert. Die DNA wurde mit EcoRI linearisiert, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und im Southernblot mit der Psoralen-Sonde analysiert (Abb. 3-3), die ein 2,85kb großes Fragment detektiert. Die Profile der Southernblots zeigen links die stark psoralenvernetzte Bande der offenen Chromatinform (s-Bande) und rechts die schwächer vernetzte Bande der geschlossenen Form (f-Bande). Die Y-Achse repräsentiert dabei die Intensität. Als Kontrolle diente der Wildtypstamm NOY505 (ohne MNase).

Histone sind im Promotorbereich mit beiden Chromatinformen assoziiert und Transkriptionsfaktoren mit der offenen Form

Zur Analyse, welche Faktoren im Promotorbereich an welche Chromatinform binden, wurde die DNA aus den oben beschriebenen Experimenten mit XcmI und SacII linearisiert. Für die Histone zeigte sich, daß beide Banden verschwinden. In der Profilanalyse der Southernblots ist deutlich zu sehen, daß die Intensität beider Banden abnimmt. Für die Histone H3 und H4 als Komponenten des UAFs war dies auch zu erwarten. Daß auch für H2B beide Banden verschwinden deutet darauf hin, daß die IGS2 Region unabhängig vom transkriptionellen Zustand der nachfolgenden Transkriptionseinheit nukleosomal sein könnte. Die Transkriptionsfaktoren des UAFs, Uaf30p und Rrn10p sind mit dem Großteil der aktiven Form assoziiert, da die obere Bande hauptsächlich an Intensität verliert. Die Untereinheiten des CFs, Rrn7p und Rrn3p sind ebenfalls mit der aktiven Form assoziiert, wobei die Abnahme der oberen Bande im Vergleich zu den UAF-Komponenten deutlich geringer ist. Hmo1p und Rpa43p sind ausschließlich mit der offenen, aktiven Form assoziiert.

Neben UAF, CF und Rrn3p binden Hmo1p und Pol I am rDNA Promotor präferentiell an die offene Chromatinform, die Histone sind in diesem Bereich hingegen mit beiden Chromatinformen assoziiert.

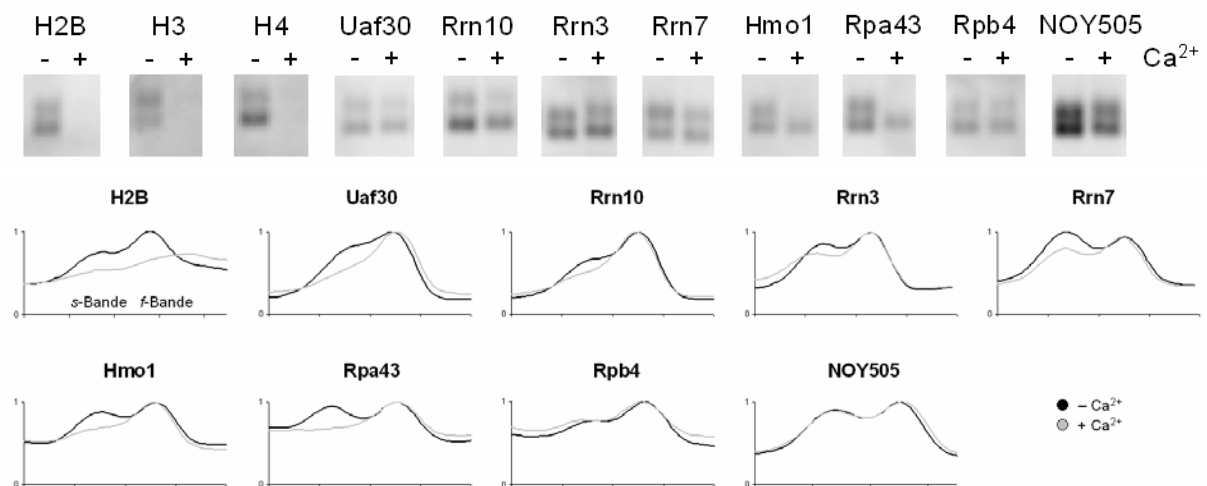


Abb. 3-8: Kombinierte *in vitro* ChEC- und Psoralenvernetzungsanalyse des Promotors. Formaldehydvernetzte Nuklei ohne (-) und mit (+) Induktion der MNase durch Ca^{2+} wurden im Anschluß an das ChEC Experiment mit Psoralen inkubiert und die DNA isoliert. Die DNA wurde mit XcmI/ SacII linearisiert, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und im Southernblot mit der XcmI-Promotor-Sonde analysiert (Abb. 3-3), die ein 2kb großes Fragment detektiert. Die Profile der Southernblots zeigen links die stark psoralenvernetzte Bande der offenen Chromatinform (s-Bande) und rechts die schwächer vernetzte Bande der geschlossenen Form (f-Bande). Die Y-Achse repräsentiert dabei die Intensität. NOY505 zeigt ohne (-) und mit (+) Induktion der MNase zwei Banden. Als Kontrolle diente der Wildtypstamm NOY505 (ohne MNase).

3.2. Chromatinstruktur in Stämmen mit Deletionen funktioneller Pol I Transkriptionsfaktoren

In logarithmisch wachsenden Hefezellen liegt etwa die Hälfte der rRNA Gene in offener Form vor und wird von Pol I transkribiert. Zur Klärung der Frage, ob und inwiefern sich die Chromatinstruktur am rDNA Locus nach dem Abschalten der Pol I Transkription ändert, wurden Hefestämme mit Deletionen von Transkriptionsfaktoren untersucht. Es wurden Mutanten analysiert, bei denen jeweils eine Untereinheit der Multiproteinkomplexe UAF oder CF deletiert war, sowie eine Hmo1p-Deletionsmutante. Im Stamm NOY699 ist die UAF-Untereinheit Rrn5p und in NOY558 Rrn7p des *core* Faktors deletiert. In beiden Stämmen ist die Pol I Transkription der chromosomalen rDNA abgeschaltet. Sie sind nur mit einem Helferplasmid lebensfähig, welches die 35S rDNA (+1 bis +6922) unter einem GAL-Promotor trägt und von Pol II transkribiert wird (Nogi et al., 1991). Beide Stämme wachsen im Galaktose-Medium und haben eine Verdopplungszeit von ca. sechs Stunden. Deletionen in UAF führen zum PSW von Pol I zu Pol II, so daß die Chromatinstruktur der rDNA auch in Abhängigkeit von der Pol II Transkription untersucht werden konnte. PSW-Stämme, wie NOY699, können in glucosehaltigem Medium in Unabhängigkeit vom Helferplasmid wachsen (Vu et al., 1999). Für den PSW wurde beschrieben, daß neben Rpd3p und einer Deletion in UAF die Expansion der chromosomalen rDNA Kopien erforderlich sei (Nogi et al., 1991; Oakes et al., 1999; Oakes et al., 2006a; Siddiqi et al., 2001b; Siddiqi et al., 2001a; Vu et al., 1999). Die durchschnittliche rDNA Kopienzahl wurde mittels qPCR bestimmt. Für den Wildtypstamm NOY505 waren es ~165 rDNA Kopien, für NOY558 ~131 und für NOY699 ~575.

Zur Analyse der Chromatinstruktur wurden zuerst exogene MNase Verdaue durchgeführt. Die DNA-Analyse erfolgte im Southernblot mittels indirekter Endmarkierung. Dazu wurden die XcmI-Sonden eingesetzt (250bp vor und hinter +8421; Abb. 3-3), die nur die chromosomale rDNA detektieren können und nicht die 35S rDNA (+1 bis +6922) des Helferplasids.

3.2.1. MNase Verdaumuster des Wildtypstammes NOY505

Abb. 3-9 zeigt das Verdaumuster eines exogenen MNase Verdaus der nackten genomischen DNA im Vergleich zu dem der Nuklei des Wildtypstammes NOY505. NOY505 repräsentiert das überlagerte Muster aus offener und geschlossener Chromatinform. Es ist deutlich zu erkennen, daß sich die Muster im transkribierten Bereich sehr ähneln und sich hauptsächlich in der Hypersensitivität (stärkere Bandenintensitäten) der Nuklei an einzelnen Stellen der rDNA unterscheiden. NOY505 weist im Gegensatz zur nackten DNA zusätzlich schwache Zwischenbanden auf (–), die jedoch kaum wahrzunehmen sind. Im Bereich direkt stromaufwärts des Promotors unterscheiden sich die Muster. Die nackte DNA weist lediglich eine Bande auf, die Nuklei von NOY505 zeigen an dieser Stelle eine Doppelbande (*). Ein

weiterer Unterschied ist am Ende der Transkriptionseinheit zu erkennen. Das Verdauemuster der Nuklei zeigt dort eine weitere Bande, die der nackten DNA fehlt (•).

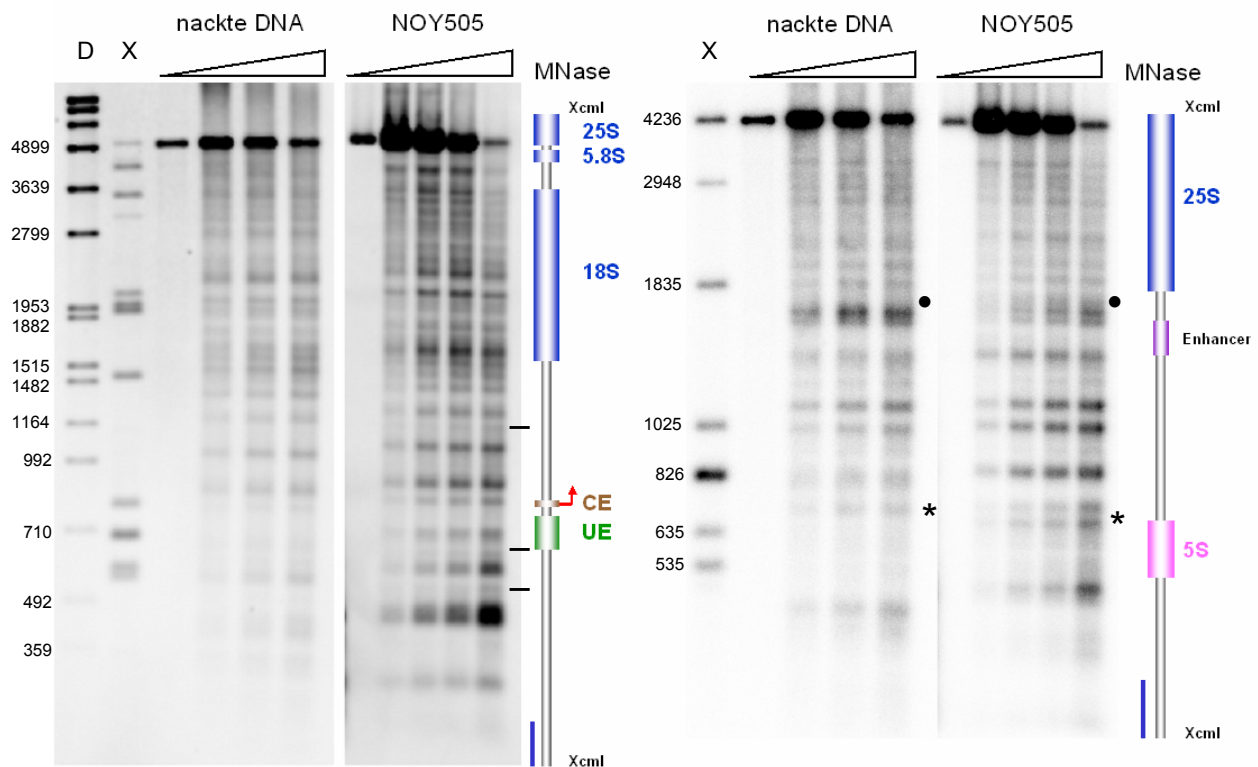


Abb. 3-9: MNase Verdauemuster von nackter genomischer DNA und von Nuklei des Wildtypstamms NOY505. Die nackte DNA und die Nuklei wurden für 20min bei 37°C mit exogener MNase verdaut, wobei die MNase Konzentration der nackten DNA 1/1000 der der Nuklei betrug. Die DNA wurde isoliert und mit XcmI linearisiert. Von den 0min Ansätzen wurde 1/10, von den restlichen Proben der Gesamtansatz in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit der XcmI-Promotor- (links) bzw. XcmI-5S-Sonde (rechts) im Southernblot analysiert (Abb. 3-3). – Zwischenbanden der Nuklei, die der nackten DNA fehlen; * Doppelbande bei Nuklei; • Bande fehlt bei nackter DNA. D: Digoxigeninmarkierter DNA-Längenstandard; X: XcmI DNA-Längenstandard.

3.2.2. Die Deletion von UAF oder CF Komponenten ändert die Chromatinstruktur der rDNA

Von den aus NOY558, NOY699 und NOY505 isolierten Nuklei wurden die gleichen Gesamtchromatinmengen mit steigenden MNase-Konzentrationen wie oben beschrieben verdaut und analysiert. Für NOY699 wurde also etwa die vierfache Menge an ribosomaler DNA im Vergleich zu NOY505 und NOY558 aufgetragen. Die Verdauemuster des intergenen Bereichs und der 5S rDNA ist in allen drei Stämmen sehr ähnlich und ohne auffällige Besonderheiten (Abb. 3-10). Im transkribierten Bereich unterscheiden sich die Verdaue der beiden Mutanten deutlich von dem des Wildtyps (Abb. 3-10A). NOY558, die CF-Mutante zeigt im transkribierten Bereich der 18S und 5,8S rDNA ein für inaktive Pol II transkribierte Gene typisches nukleosomales Muster. Dieses ist im Bereich der 25S rDNA aufgrund der Auflösungsgrenzen im verwendeten Gelsystem nicht mehr zu erkennen. Nahezu alle Banden

des NOY558-Verdaus sind auch in dem von NOY505 wiederzufinden. Einige Banden unterscheiden sich dabei jedoch in ihrer Intensität (*, **). Im Bereich des Transkriptionsstartpunktes weist NOY558 im Gegensatz zu den beiden anderen Stämmen eine Bandenverschiebung in Richtung der 18S rDNA auf (▲). Ansonsten sind sich alle drei Stämme im Promotorbereich sehr ähnlich. NOY699, die UAF-Mutante, die zum PSW von Pol I zu Pol II befähigt ist, unterscheidet sich in ihrem Verdaumuster am stärksten von dem der beiden anderen Stämme. Am auffälligsten ist die Bandenverschiebung im extern transkribierten *Spacer* des 5'-Bereichs in Richtung des Promotors (Δ, Abb. 3-10A). Des weiteren fehlen einige der Banden, die sowohl beim Wildtyp als auch der CF-Mutante zu finden sind (~). In der 18S rDNA gibt es einen Bereich, in dem ebenfalls eine Bandenverschiebung auftritt (‡). Der Wildtypstamm, der ein überlagertes Muster aus offener und geschlossener Chromatinform repräsentiert, weist zusätzliche Banden auf, die der CF-Mutante, bei der die Pol I Transkription abgeschaltet ist und die rDNA nicht von Pol II transkribiert wird, fehlen (●). In der 25S rDNA sind die Verdaumuster von NOY699 und NOY505 identisch (Abb. 3-10B). Im Bereich des Terminationspunktes unterscheiden sie sich jedoch voneinander. Beide Mutanten weisen dort zwei klare Banden auf. NOY505 zeigt an dieser Stelle eher einen diffusen „Schmier“ (j).

Im intergenen *Spacer* 2 (IGS2) konnten vier der fünf beschriebenen positionierten Nukleosomen detektiert werden (Vogelauer et al., 1998). Dabei handelt es sich um die Nukleosomen eins, zwei, vier und fünf (①②④⑤). Nukleosom drei (③) kann mit den verwendeten Sonden nicht detektiert werden.

Die Deletion von UAF- oder CF-Komponenten führt zur Ausbildung alternativer Chromatinstrukturen am rDNA Locus. Die Verdaumuster der UAF-Mutante zeichnen sich durch Bandenverschiebungen aus, wohingegen die Deletion von CF zu einem für inaktive Pol II transkribierte Gene typischen nukleosomalen Muster führt. Daraus resultieren folgende Fragen: Erstens, wird die alternative Chromatinstruktur der UAF-Mutante durch das Nichtbinden von UAF (und CF) oder möglicherweise durch die Pol II-abhängige Transkription der chromosomalen rDNA dieser Mutante hervorgerufen? Zweitens, ist die Struktur der CF-Mutante von UAF oder CF abhängig? Welche Änderungen treten auf, wenn neben einer CF- auch eine UAF-Untereinheit deletiert ist? Diese Fragen sollten im folgenden anhand einer nicht zum PSW-befähigten UAF-Mutante und einer UAF/CF-Doppeldeletionsmutante beantwortet werden.

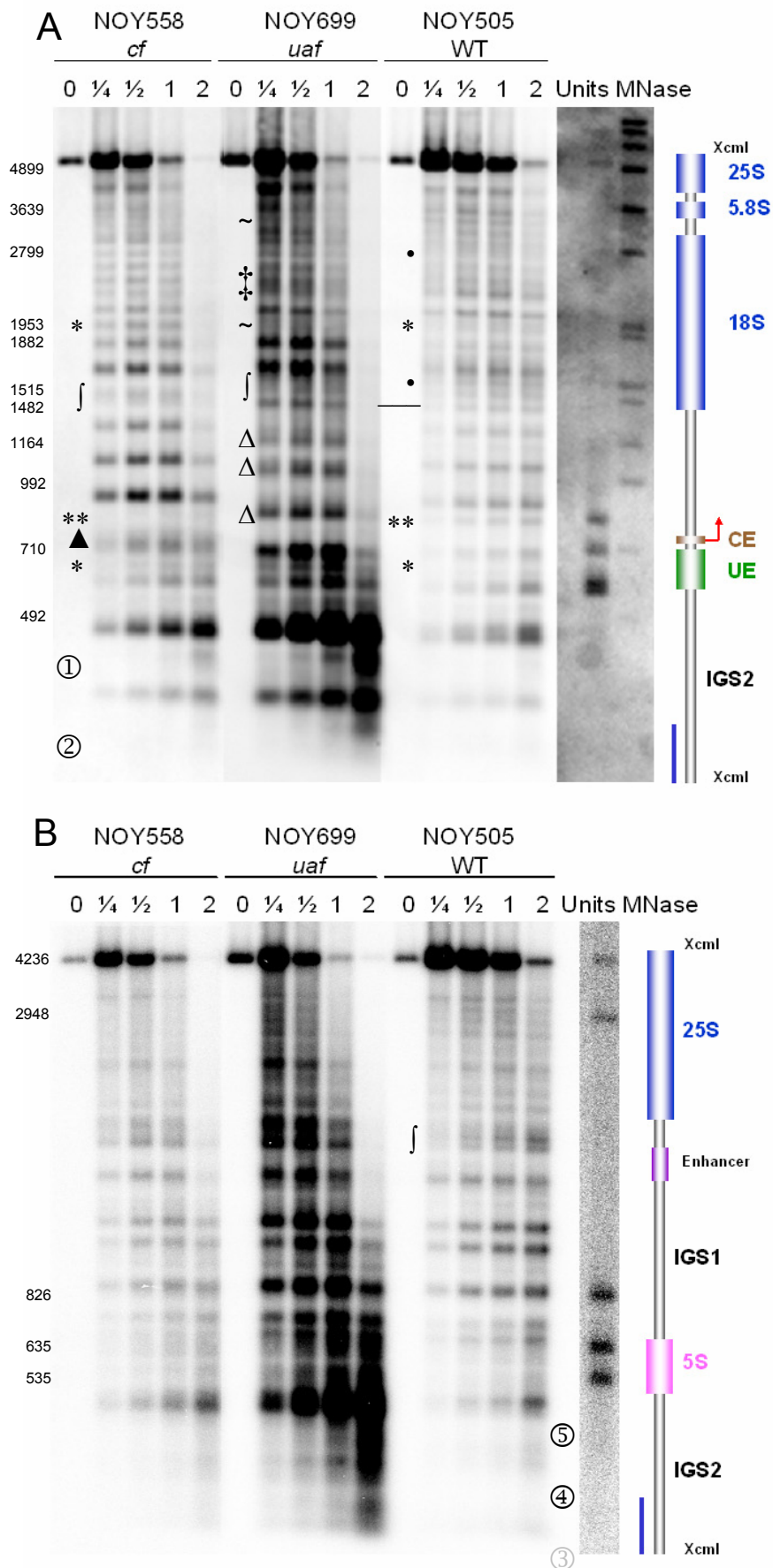


Abb. 3-10: Deletionen von UAF oder CF führen zu Änderungen in den MNase Verdauemustern. Die Nuklei des WT-Stammes NOY505, der UAF-Mutante NOY699 (*rrn5Δ*) und der CF-Mutante NOY558 (*rrn7Δ*) wurden für 20min bei 37°C mit der angegebenen MNase-Konzentration verdaut. Es wurden die gleichen Chromatinmengen verdaut. Die DNA wurde isoliert und mit *XcmI* linearisiert. Von den 0min Ansätzen wurde 1/10, von den restlichen Proben der Gesamtansatz in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit der (A) *XcmI*-Promotor- bzw. (B) *XcmI*-5S-Sonde im Southernblot analysiert.

- * Bande von 558 ist stärker als die von 505
- ** Bande von 558 ist schwächer als die von 505
- ▲ Bandenverschiebung nach oben im Vgl. zu 699 und 505
- Bande von 699 und 505 fehlt bei 558
- Δ Bandenverschiebung nach unten
- ~ Bande von 558 und 505 fehlt bei 699
- ‡ Bereich unterscheidet sich von 558 und 505
- Bande von 505 fehlt bei 558
- ∫ diffuser Bereich
- ①②④⑤ Nukleosomen
- ③ Nukleosom 3 ist nicht detektierbar.

3.2.3. Die Ausbildung alternativer Chromatinstrukturen ist von UAF abhängig

Um Herauszufinden, ob die Ausbildung der alternativen Chromatinstruktur der UAF-Mutante NOY699 durch das Nichtbinden von UAF oder durch die Pol II-abhängige Transkription der chromosomalen rDNA dieser Mutante hervorgerufen wird, wurde eine weitere UAF-Mutante untersucht. Bei NOY703 ist die UAF Untereinheit Rrn9p deletiert und die 35S rDNA wird wie bei NOY699 und NOY558 (CF-Mutante) von einem Helferplasmid transkribiert (s. oben 3.2.). Im Gegensatz zu NOY699 ist diese Mutante nicht zum PSW befähigt (wächst nicht in Glucose-Medium; Vu et al., 1999) und weist keine Expansion des rDNA Lokuses auf. Mit durchschnittlich 114 rRNA Genen besitzt sie sogar weniger Kopien als NOY558. Der MNase Verdau von Abb. 3-11 zeigt, daß beide UAF-Mutanten die gleichen Protektionsmuster am rDNA Locus aufweisen. Somit ist die Ausbildung der alternativen Chromatinstruktur der UAF-Mutante NOY699 (Abb. 3-10) von der Pol II-Transkription unabhängig und nur auf das Nichtbinden von UAF zurückzuführen.

Um weiterhin Herauszufinden, ob UAF oder CF für die Ausbildung alternativer Chromatinstrukturen am rDNA Locus verantwortlich ist, wurde die UAF/CF-Doppeldeletionsmutante YKM41 konstruiert, bei der jeweils eine Untereinheit von UAF und CF deletiert ist. Aus strategischen Gründen wurde dafür anstelle von NOY699 NOY703 herangezogen. Es wurde die gleiche CF-Untereinheit deletiert, die NOY558 fehlt (Rrn7p). Der rDNA Locus dieser Doppeldeletionsmutante weist mit durchschnittlich 1138 rDNA Kopien die höchste Expansionsrate auf und ist im Gegensatz zu seinem Ursprungsstamm NOY703 zum PSW befähigt, da er wie NOY699 in glucosehaltigem Medium, vom Helferplasmid unabhängig, wächst. Die Verdauemuster des rDNA Chromatins der UAF/CF-Doppelmutante und der beiden UAF-Mutanten sind identisch. Die Ausbildung alternativer Chromatinstrukturen am rDNA Locus ist somit von UAF abhängig.

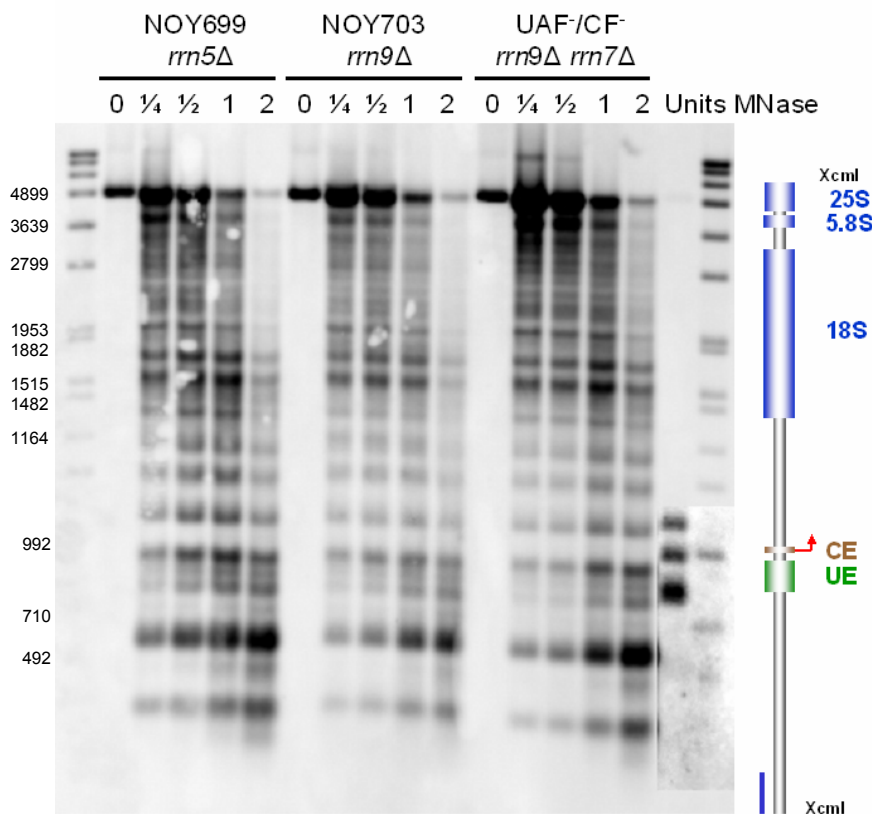


Abb. 3-11: UAF- und UAF/CF-Doppelmutanten weisen an der rDNA das gleiche MNase Verdauemuster auf. Die Nuklei der UAF-Mutanten NOY699 und NOY703 und der UAF/CF-Doppelmutante wurden für 20min bei 37°C mit der angegebenen MNase-Konzentration verdaut. Es wurden die gleichen Chromatinmengen verdaut. Die DNA wurde isoliert und mit XcmI linearisiert. Von den 0min Ansätzen wurde 1/10, von den restlichen Proben der Gesamtansatz in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit der XcmI-Promotor-Sonde im Southernblot analysiert.

3.2.4. Die Deletion von HMO1 führt zu keiner detektierbaren Veränderung des MNase Verdauemusters der chromosomalen rDNA

Zuletzt wurde die Chromatinstruktur der rDNA nach Deletion des Transkriptionsfaktors Hmo1p untersucht, der möglicherweise ein funktionales Homolog von UBF ist (Hall et al., 2006), das die rDNA höherer Eukaryoten für elongierende Polymerasen passierbar macht (Stefanovsky et al., 2006a; Stefanovsky et al., 2006b). Dazu wurde der Stamm Y06969 analysiert, in welchem der HMO1 Lokus deletiert ist. Die Verdopplungszeit dieses Stammes, der im Glukose-Medium wächst, wies mit ca. drei Stunden fast den doppelten Wert des korrespondierenden Wildtypstammes BY4741 auf (~1,7h). Die Bestimmung der rDNA Kopienzahl ergab, daß Y06969 durchschnittlich 171 Kopien und BY4741 durchschnittlich 131 rDNA Kopien besitzt. Das MNase Verdauemuster beider Stämme war mit dem des Wildtypstammes NOY505 identisch (Daten nicht gezeigt).

Da die Deletion von Hmo1p zu keiner deketkierbaren Veränderung im MNase Verdauemuster der chromosomalen rDNA führte, wurden die Nuklei formaldehydvernetzter Zellen aller fünf Transkriptionsfaktormutanten mit Psoralen vernetzt. Die Analyse erfolgte mit der XcmI-Promotor-Sonde, die nur die chromosomale rDNA der UAF- und CF-Mutanten detektiert (Abb. 3-12). Der Wildtypstamm NOY505 zeigte zwei Banden, die der offenen und der geschlossenen Chromatinform entsprechen. Die Hmo1p-Deletionsmutante unterschied sich nicht vom Wildtyp. Bei den UAF- und CF-Mutanten hingegen konnte nur die untere Bande

der geschlossenen Form detektiert werden. Die untere Bande des Wildtyps migriert ebenso wie die von NOY558 etwas langsamer im Agarosegel als die der UAF-Mutanten, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, daß die UAF-Mutanten eine alternative Chromatinstruktur am rDNA Locus besitzen. Offensichtlich ist die rDNA der UAF- bzw. UAF/CF-Mutanten durch das Nichtbinden des UAF-Komplexes für Psoralen weniger zugänglich als die UAF-assoziierte rDNA des Wildtypstammes NOY505 und die rDNA der CF-Mutante NOY558.

Die rDNA der UAF- und CF-Mutanten liegt vollständig in der geschlossenen Chromatinform vor, die HMO1-Deletionsmutante weist hingegen wie der Wildtypstamm NOY505 beide Formen auf.

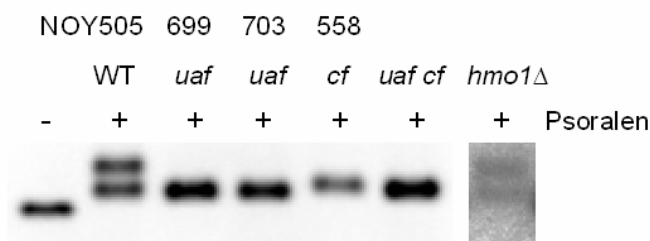


Abb. 3-12: Die UAF- und CF-Mutanten weisen nur die Bande der geschlossenen Chromatinform auf. Die Nuklei formaldehydvernetzter Zellen aller Transkriptionsfaktordeletionsmutanten wurden mit Psoralen vernetzt. Die DNA wurde isoliert, mit XcmI/ SacII linearisiert und mit der XcmI-Promotor-Sonde im Southernblot analysiert (Abb. 3-3). *Hmo1Δ* wurde in einem gesonderten Versuch analysiert, bei dem weniger DNA analysiert wurde als bei den anderen Stämmen (schwächeres Signal).

3.2.5. Transkriptionsfaktoren sind nicht mehr mit der rDNA von UAF- und CF-Mutanten assoziiert

Um zu überprüfen, ob Hmo1p, Rpa190p und Uaf30p trotz abgeschalteter Pol I Transkription der UAF- (NOY703) und CF-Mutanten (NOY558) noch immer an die rDNA binden, wurde eine *in vitro* ChEC-Analyse durchgeführt (Abb. 3-13). In der UAF-Mutante war Uaf30p nicht mit dem rDNA Promotor assoziiert. Weder in der UAF- noch der CF-Mutante banden Rpa190p, die große Pol I Untereinheit, und Hmo1p, die beim Wildtyp NOY505 ein identisches Verdauemuster zeigten, an die rDNA (Abb. 3-13A, B). Sowohl der transkribierte als auch der nichttranskribierte Bereich weisen keine spezifischen Schnitte auf. Die Funktionalität der MNase wurde mit der Nup57-Sonde überprüft, die den Promotor von RPS23A, einem Protein der kleinen ribosomalen Untereinheit, detektiert, der stark mit Hmo1p assoziiert ist (Abb. 3-13C; Hall et al., 2006). In beiden Mutanten konnte Hmo1p am Promotor detektiert werden, was für die Funktionalität der MNase spricht.

Die rDNA der UAF- und CF-Mutanten, bei denen die Pol I Transkription vollständig abgeschaltet ist, ist weder mit der RNA Polymerase I noch mit den Transkriptionsfaktoren Hmo1p und Uaf30p (nur UAF-Mutante untersucht) assoziiert.

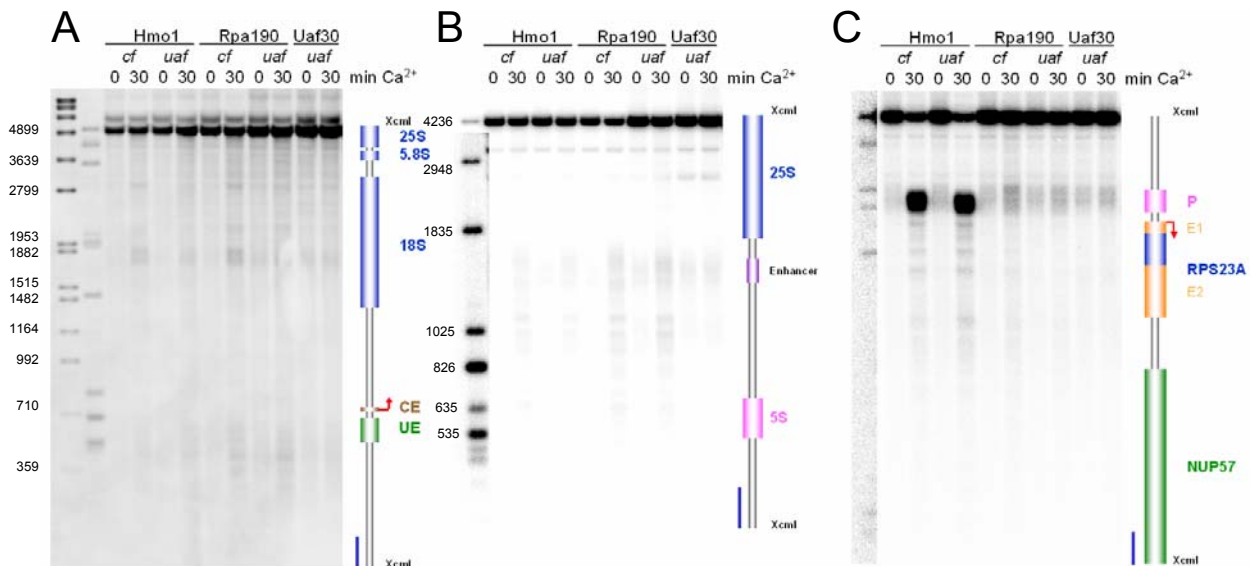


Abb. 3-13: *In vitro* ChEC Analyse am rDNA- und RPS23A-Lokus in UAF- (NOY703) und CF- (NOY558) Deletionsstämmen, die MNase-Fusionsproteine exprimieren. Nuklei formaldehydvernetzter Zellen wurden in Abwesenheit (0min) und Anwesenheit von Ca^{2+} für 30min bei 30°C inkubiert. Die DNA wurde isoliert und mit XcmI linearisiert. Der Gesamtansatz wurde in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und im Southernblot mittels indirekter Endmarkierung analysiert. Autoradiogramme der Analysen (A) des Promotorbereichs und der 18S rDNA mit der XcmI-Promotor-Sonde, (B) der 25S rDNA und des intergenen *Spacers* mit der XcmI-5S-Sonde und (C) des RPS23A-Lokuses mit der Nup57-Sonde. P: RPS23A-Promotor, E1, E2: Exons 1 und 2 von RPS23A.

3.3. Chromatinstruktur temperatursensitiver Initiationsmutanten

Um Herauszufinden, wie sich die Chromatinstruktur der rDNA in Abhängigkeit von der transkriptionellen Aktivität der Pol I verändert, wurden zwei temperatursensitive Stämme untersucht, die bei 24°C ein normales Pol I abhängiges Wachstumsverhalten zeigen und bei 37°C ihre Pol I Transkription nahezu abschalten. Zum einen wurde der Stamm Gpy11-6 untersucht (Peyroche et al., 2000), dessen A43-Untereinheit der Pol I chromosomal deletiert ist und von einem Plasmid unter dem Wildtyppromotor transkribiert wird. Das Plasmid trägt zusätzlich eine Mutation in Rpa43p, durch diese die Interaktion mit Rrn3p bei 37°C stark beeinträchtigt wird. Zum anderen wurde YCC95, mit einer Mutation in Rrn3p, welches zur Initiation der Pol I Transkription benötigt wird, untersucht (Cadwell et al., 1997).

3.3.1. Gpy11-6: Eine temperatursensitive Pol I-Mutante

Die offene Chromatinform der Pol I-ts-Mutante bleibt nach dem Abschalten der Pol I Transkription erhalten

Logarithmisch wachsende Hefen der temperatursensitiven Pol I-Mutante Gpy11-6 wurden bei 24°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert und die Hälfte der Zellen für fünf Stunden bei 37°C weiterkultiviert. Abb. 3-14 zeigt die Psoralenvernetzungsanalyse der Nuklei. Gpy11-6 unterscheidet sich bei 24°C nicht von einem Wildtypstamm und weist beide Chromatinformen auf. Nach 2,5-stündiger Temperaturerhöhung geht ein Teil der offenen Chromatinform in die geschlossene Form über, da die Intensität der oberen Bande abnimmt und die der unteren zunimmt. Die Änderungen sind jedoch nicht sehr groß. Nach 5-stündiger Temperaturerhöhung zeigt die obere Bande ein schnelleres Migrationsverhalten im Gel und nähert sich der unteren Bande an, geht jedoch nicht in sie über. Es sind noch immer zwei voneinander unterscheidbare Banden vorhanden.

In der Pol I-ts-Mutante bleibt die offene Chromatinform nach dem Abschalten der Pol I Transkription größtenteils erhalten.

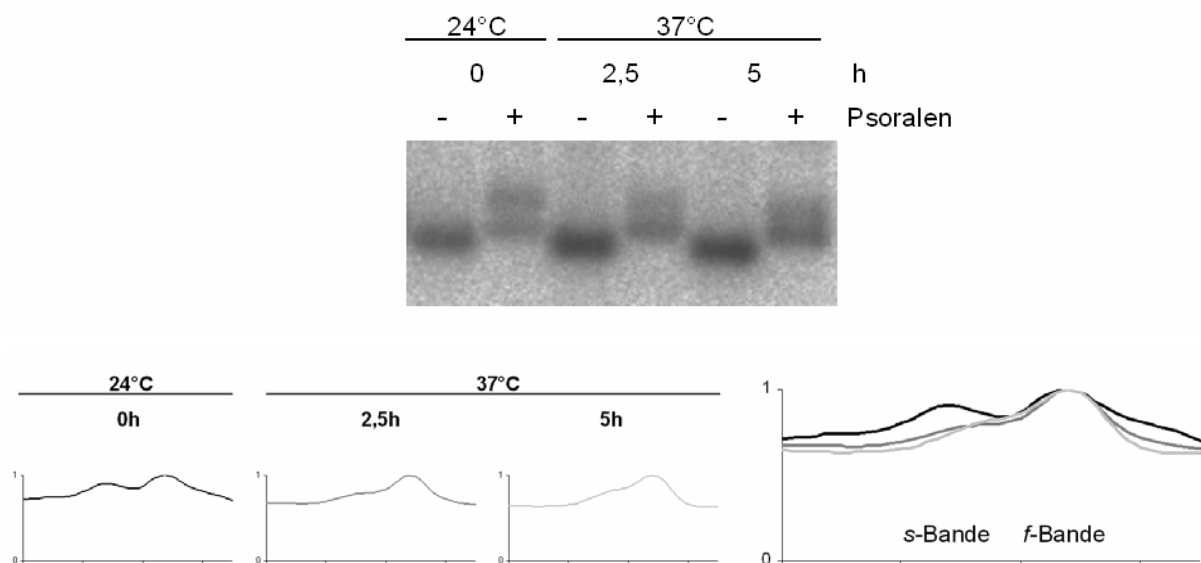


Abb. 3-14: Die offene Chromatinform der Pol I-ts-Mutante bleibt nach dem Abschalten der Pol I Transkription erhalten. Psoralenvernetzungsanalyse von Nuklei der Pol I-ts-Mutante bei 24°C und nach 2,5- bzw. 5-stündiger Temperaturerhöhung auf 37°C. Die Nuklei formaldehydvernetzter Zellen wurden mit Psoralen (+) behandelt. Die DNA wurde isoliert, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit EcoRI linearisiert und im Southernblot mit der 1,9kb-Sonde analysiert (Abb. 3-3). Das Profil der psoralenbehandelten DNA (+) des Southernblots zeigt links die stark psoralenvernetzte Bande der offenen Chromatinform (s-Bande) und rechts die schwächer vernetzte Bande der geschlossenen Form (f-Bande). Die Y-Achse repräsentiert dabei die Intensität.

Das MNase Verdaumuster bleibt nach dem Abschalten der Pol I Transkription erhalten

Im Gegensatz zu den UAF- und CF-Mutanten blieb die offene Chromatinform der Pol I-ts-Mutante bei abgeschalteter Pol I Transkription erhalten. Um Herauszufinden, ob und inwiefern sich das MNase Verdaumuster dieser Mutante verändert, wurden die Nuklei einem exogenen MNase Verdau unterzogen. Nach der Temperaturerhöhung auf 37°C konnten an der rDNA keinerlei Änderungen in den Verdaumustern detektiert werden. Die Verdaumuster sind mit denen des Wildtypstammes NOY505 identisch (Abb. 3-15, vgl. auch Abb. 3-9).

Das MNase Verdaumuster der Pol I-ts-Mutante bleibt nach dem Abschalten der Pol I Transkription erhalten. Die Etablierung eines nukleosomalen Musters konnte nicht beobachtet werden, was mit den Ergebnissen der Psoralenvernetzungsanalyse korreliert.

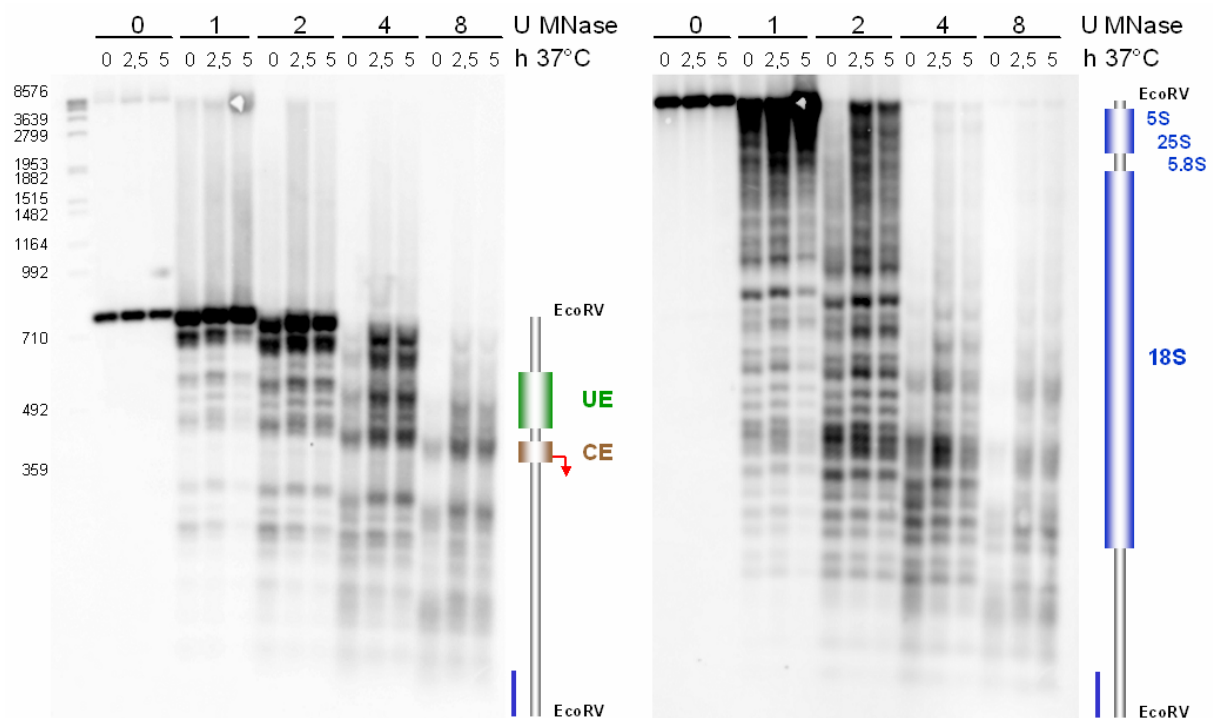


Abb. 3-15: Exogener MNase Verdau von Nuklei der Pol I-ts-Mutante bei 24°C und nach 2,5- bzw. 5-stündiger Temperaturerhöhung auf 37°C. Die Nuklei wurden für 20min bei 37°C mit der angegebenen MNase-Konzentration verdaut. Die DNA wurde isoliert und mit EcoRV linearisiert. Von den 0min Ansätzen wurde 1/10, von den restlichen Proben der Gesamtansatz in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit der Promotor- (links) bzw. ORF-Sonde (rechts) im Southernblot analysiert (Abb. 3-3).

3.3.2. YCC95: Eine temperatursensitive Rrn3p-Mutante

In der Rrn3p-ts-Mutante geht die offene nach dem Abschalten der Pol I Transkription in die geschlossene Chromatinform über

Als nächstes wurden die Nuklei der Rrn3p-ts-Mutante vor und nach dem Abschalten der Pol I Transkription mit Psoralen vernetzt. Eine bei 24°C logarithmisch wachsende Kultur wurde geteilt. Die eine Hälfte wurde bei 24°C und die andere Hälfte bei 37°C für 2,5 und fünf Stunden weiterkultiviert. Zu Beginn (0h, 24°C) wurden zwei Banden detektiert, die auch nach 2,5- und 5-stündiger Kultivierung bei 24°C erhalten blieben (Abb. 3-16). Nach dem Abschalten der Pol I Transkriptionsinitiation durch Temperaturerhöhung ging die offene in die geschlossene Chromatinform über. Dabei sank die Intensität der oberen Bande nach 2,5 Stunden bei 37°C auf ein Minimum, nach fünf Stunden war die Bande fast völlig verschwunden.

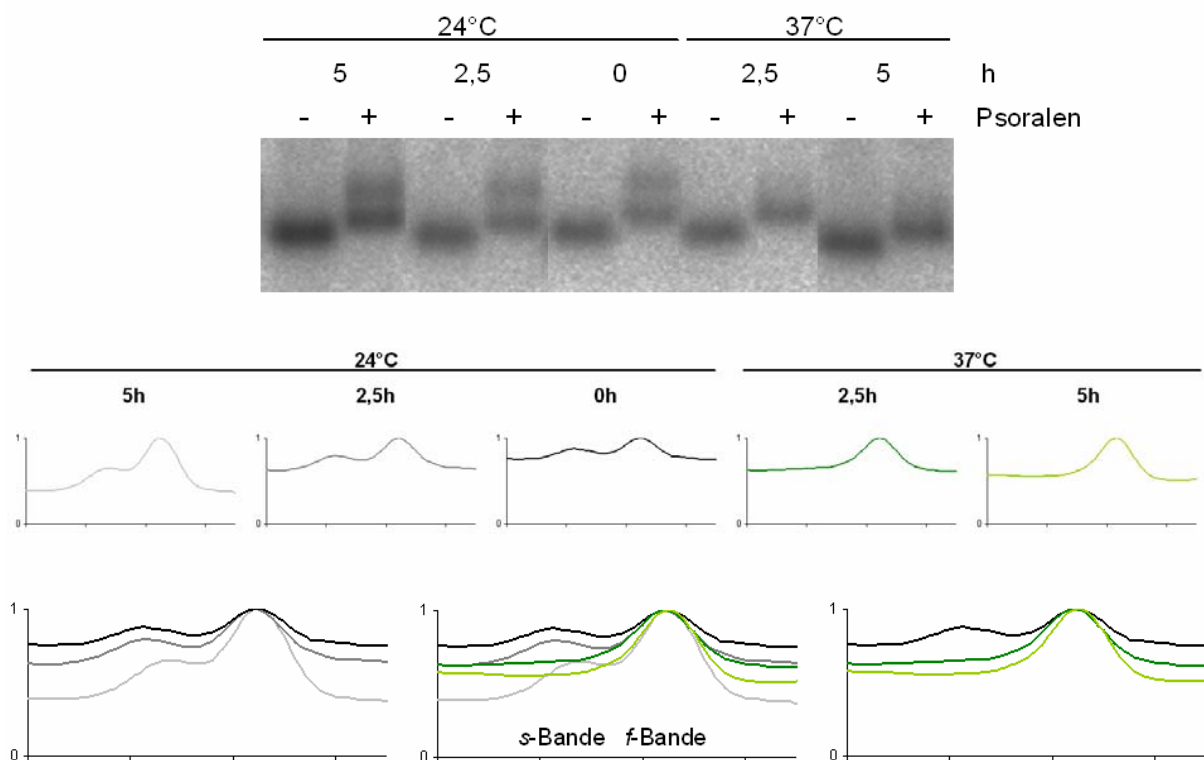


Abb. 3-16: Die offene Chromatinform der Rrn3p-ts-Mutante geht nach dem Abschalten der Pol I Transkription in die geschlossene Form über. Psoralenvernetzungsanalysen der Nuklei der Rrn3p-ts-Mutante nach 2,5- bzw. 5-stündiger Kultivierung bei 24°C und 37°C. Die Nuklei formaldehydvernetzter Zellen wurden mit Psoralen vernetzt. Die DNA wurde isoliert, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, mit EcoRI linearisiert und im Southernblot mit der 1,9kb-Sonde analysiert (Abb. 3-3). Das Profil der psoralenbehandelten DNA des Southernblots zeigt links die stark psoralenvernetzte Bande der offenen Chromatinform (s-Bande) und rechts die schwächer vernetzte Bande der geschlossenen Form (f-Bande). Die Y-Achse repräsentiert dabei die Intensität.

Das MNase Verdaumuster bleibt nach dem Abschalten der Pol I Transkription erhalten

Aufgrund der Beobachtung, daß die offene nach Temperaturerhöhung in die geschlossene Chromatinform übergeht, wurde die Chromatinstruktur der rDNA mittels exogenem MNase Verdau untersucht. Die Nuklei der YCC95-Zellen und des korrespondierenden Wildtypstammes CG379 (alle formaldehydvernetzt) wurden für 20min bei 37°C mit verschiedenen Konzentrationen exogener MNase verdaut. Beide Stämme zeigten keinerlei Unterschiede in den Verdaumustern der bei 24°C und 37°C kultivierten Zellen (Abb. 3-17). CG379 und YCC95 unterscheiden sich weder im Promotor- noch im nicht transkribierten Bereich der rDNA. Die einzigen Unterschiede sind am 3'-Ende der 18S und der 25S rDNA zu verzeichnen. CG379 weist am Ende der 18S rDNA zusätzliche Banden auf, die der Rrn3p-ts-Mutante fehlen (j). Der 25S Bereich von CG379 ist an einigen Stellen hypersensitiver als der von YCC95 (*). CG379 weist stromaufwärts des 3'Endes der 25S rDNA zwei zusätzliche Banden auf (•) und unterscheidet sich im Bereich des Terminationspunktes von YCC95 (‡).

Obwohl die offene Chromatinform nach dem Abschalten der Pol I Transkription nahezu in die geschlossene übergeht, bleibt das MNase Verdaumuster unverändert. Änderungen in der Chromatinkomposition korrelieren nicht unbedingt mit Änderungen in der Nukleasezugänglichkeit der DNA. Im Gegensatz zum exogenen MNase Verdau können anhand einer ChEC-Analyse Änderungen in der Chromatinkomposition detektiert werden.

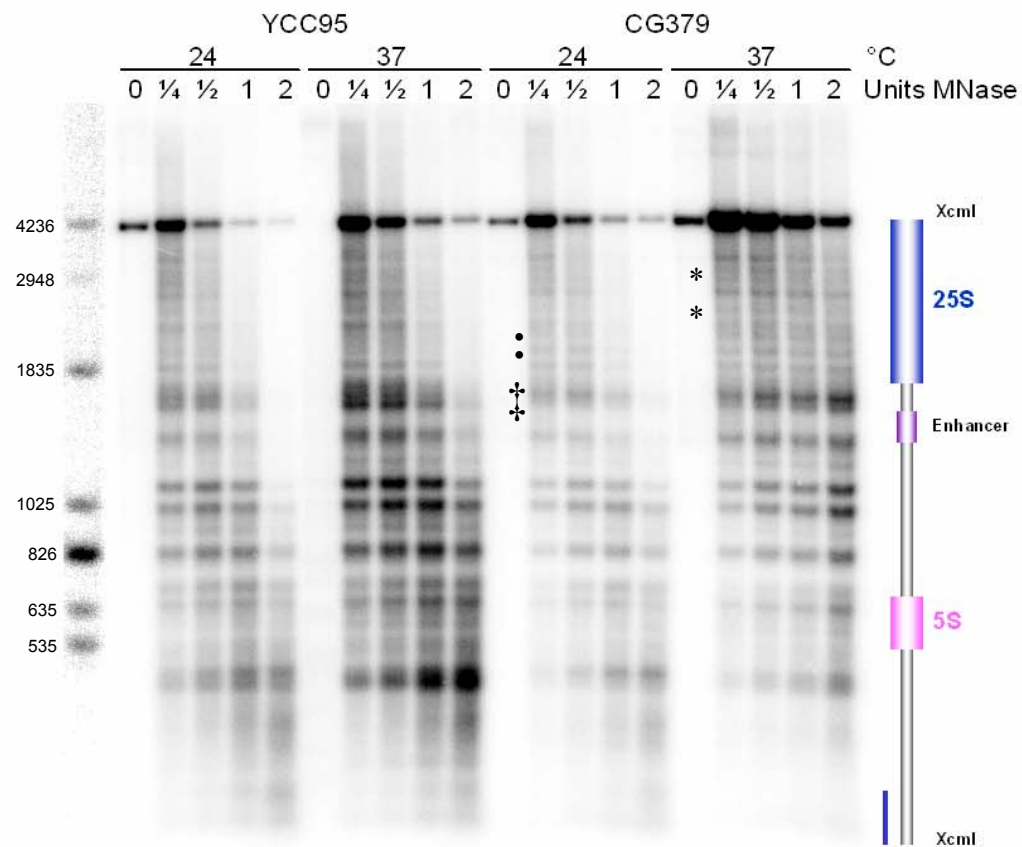
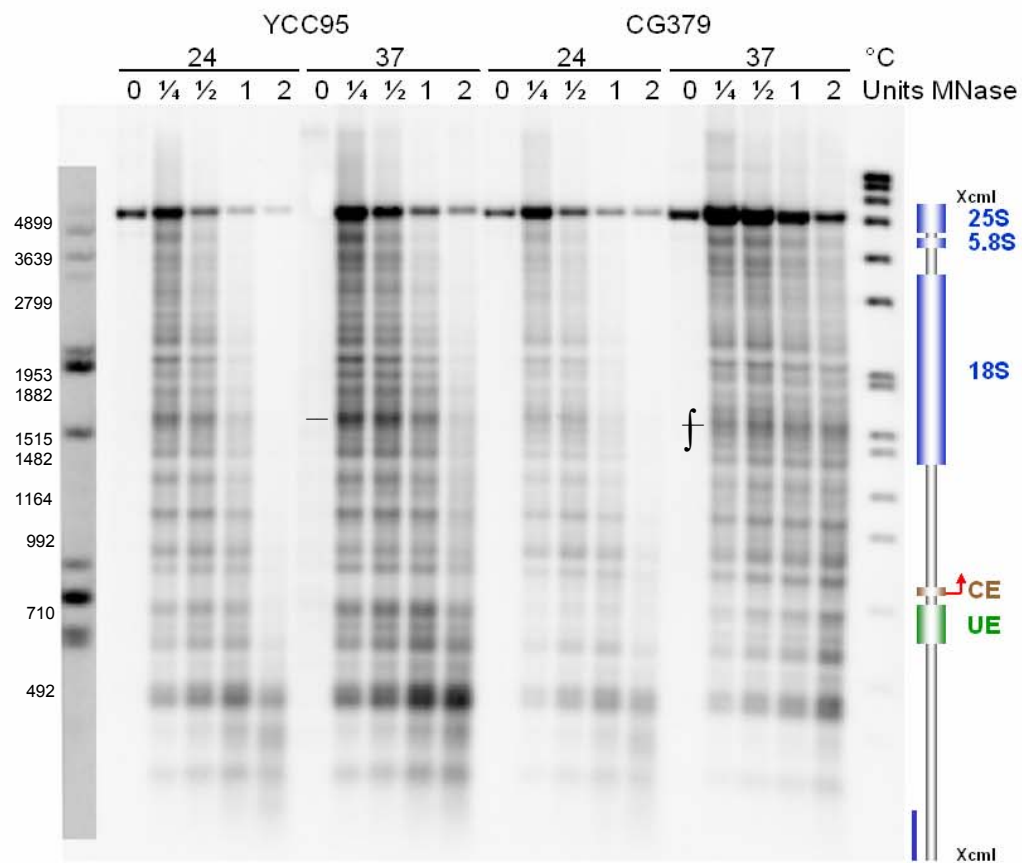


Abb. 3-17: Exogener MNase Verdau von Nuklei der Rrn3p-ts-Mutante YCC95 und des korrespondierenden Wildtypstammes NOY505. Die Nuklei wurden für 20min bei 37°C mit der angegebenen MNase-Konzentration verdaut. Die DNA wurde isoliert und mit XcmI linearisiert. Von den 0min Ansätzen wurde 1/10, von den restlichen Proben der Gesamtansatz in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit der XcmI-Promotor- (oben) bzw. XcmI-5S-Sonde (unten) im Southernblot analysiert. † Banden fehlen in YCC95; — gleiche Banden; * hypersensitivere Stellen bei CG379 • Banden sind nur in CG379 vorhanden; ‡ unterschiedlicher Bereich.

Die Assoziation von Pol I mit der rDNA ist in YCC95 Zellen bei 37°C stark vermindert

Um Herauszufinden, inwiefern sich die Chromatinkomposition der rDNA nach dem Abschalten der Pol I Transkription in der Rrn3p-ts-Mutante verändert, wurden verschiedene MNase-Fusionsproteinstämme von YCC95 mittels ChEC analysiert. Eine bei 24°C logarithmisch wachsende Kultur wurde geteilt und die Hälfte der Zellen für fünf Stunden bei 37°C weiterkultiviert. Die ChEC-Verdaue sind in Abb. 3-18 dargestellt. Die Verdaumuster von Hmo1p- und Rpa43p-MNase-Fusionsproteinen sind identisch und liefern bei 24°C das gleiche Verdaumuster wie die korrespondierenden Fusionsproteine im Wildtyp Hintergrund (vgl. Abb. 3-4). Nach der Temperaturerhöhung auf 37°C gehen die Schnittereignisse von Hmo1p an der gesamten rDNA leicht und die von Rpa43p stark zurück. Die Pol I ist nach der Temperaturerhöhung nicht mehr mit der rDNA assoziiert, wobei Hmo1p im Gegensatz zu den UAF- und CF-Mutanten mit der rDNA assoziiert bleibt (vgl. Abb. 3-13). Die Transkriptionsfaktoren Uaf30p und Rrn7p (Abb. 3-18), sowie Histon H2B (Daten nicht gezeigt) bleiben ebenfalls nach der Temperaturerhöhung mit der rDNA assoziiert. Dabei nimmt die Intensität der unteren Bande von Rrn7p deutlich ab und das Uaf30p-MNase-Fusionsprotein schneidet die rDNA kaum noch. Der Stamm YCC95 weist erwartungsgemäß keine Schnittmuster auf, da er keine MNase besitzt. Banden, die hauptsächlich nach der Temperaturerhöhung auftreten, sind auf endogene Nukleasen zurückzuführen.

Bei 37°C sind die Transkriptionsfaktoren Rrn7p und Hmo1p, sowie das Histon H2B noch immer mit der rDNA assoziiert. Die Assoziation von Pol I und Uaf30p mit der rDNA ist hingegen stark vermindert.

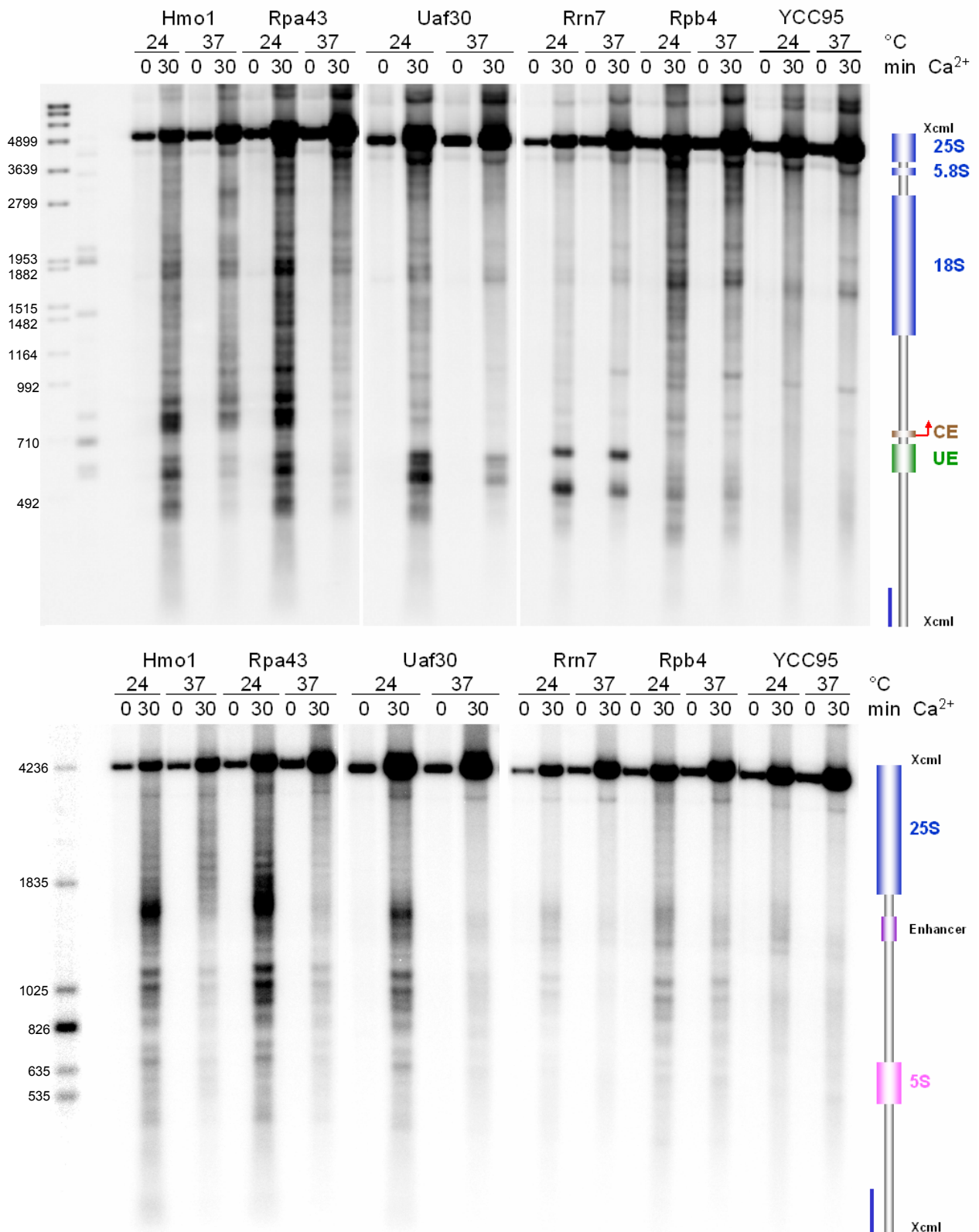


Abb. 3-18: *In vitro* ChEC-Analyse der Rn3p-ts-Mutante YCC95. Nuklei formaldehydvernetzter Zellen wurden in Abwesenheit (0min) und Anwesenheit von Ca^{2+} für 30min bei 30°C inkubiert. Die DNA wurde isoliert und mit XcmI linearisiert. Von den 0min Ansätzen wurde 1/10, von den restlichen Proben der Gesamtansatz in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit der XcmI-Promotor- (oben) bzw. XcmI-5S-Sonde (unten) im Southernblot analysiert. Als Kontrolle diente YCC95 (ohne MNase).

RNA Pol II assoziiert in Ycc95 Zellen mit der rDNA

Überraschenderweise wurden an der rDNA der Rrn3p-ts-Mutante bei 24°C auch Pol II vermittelte Schnittereignisse detektiert. Bei 37°C ging die Pol II Assoziation stark zurück (Abb. 3-18).

Daraufhin wurde eine weitere ChEC-Analyse mit den beiden Rpb4p-MNase-Fusionsstämmen der Stammhintergründe NOY505 und YCC95 durchgeführt. Die Zellen wurden bei 24°C bis zu einer OD₆₀₀ von ~0,5 kultiviert und wie zuvor beschrieben analysiert. Die Rrn3p-ts-Mutante weist über den gesamten rDNA Lokus ein Schnittmuster auf, das im Wildtypstamm NOY505 nur als schwacher Hintergrund wahrzunehmen ist (Abb. 3-19). Zur Kontrolle, ob die MNase beider Stämme die gleiche Effizienz aufweist, wurde der Blot mit einer Sonde nachhybridisiert, die das Pol II transkribierte Gen RPA23A detektiert. An diesem Lokus weisen beide Stämme ähnliche Schnittintensitäten auf, so daß von einer vergleichbaren Schneideeffizienz der MNase ausgegangen werden kann. Somit ist die rDNA der Rrn3p-ts-Mutante YCC95 im Gegensatz zum Wildtypstamm NOY505 tatsächlich mit Rpb4p assoziiert.

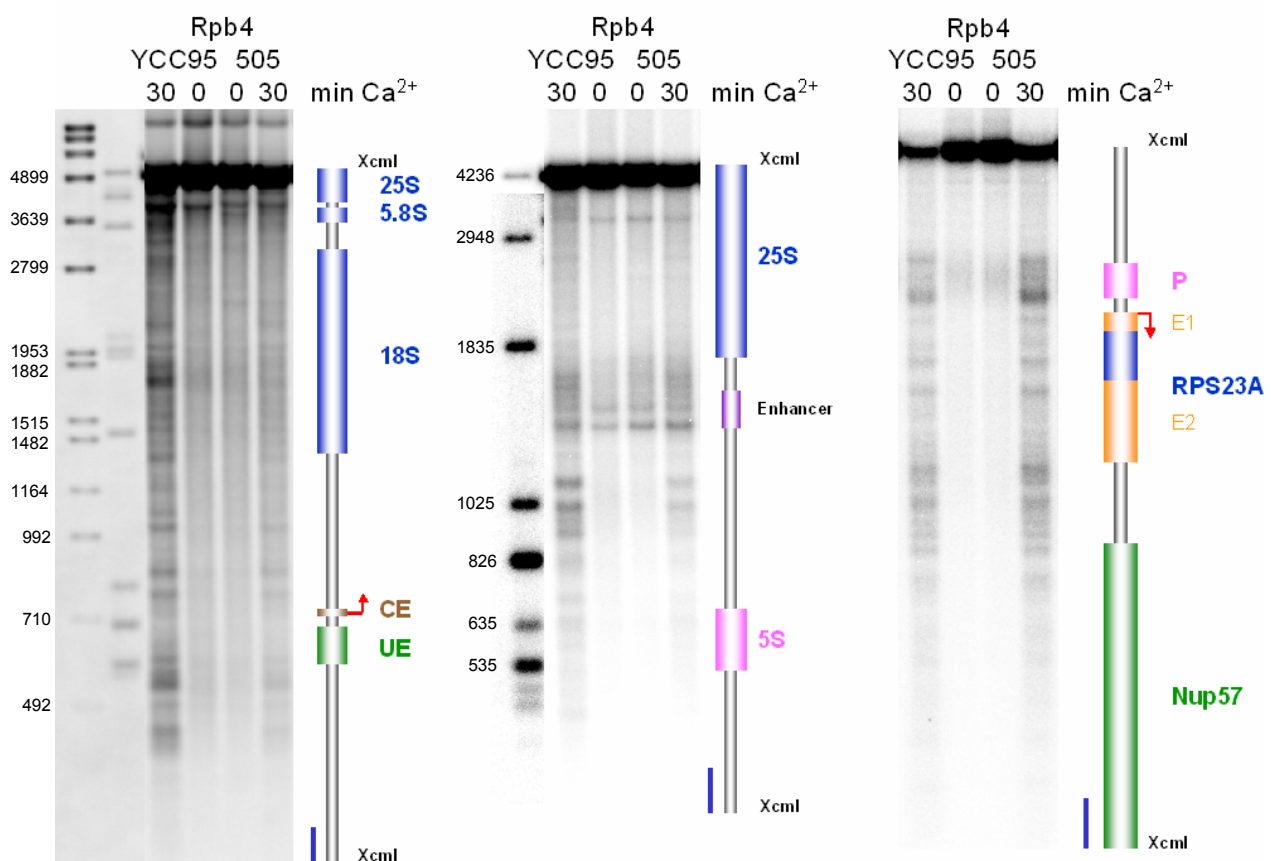


Abb. 3-19: *In vitro* ChEC Analyse der Rpb4p-MNase-Fusionsstämme der Stammhintergründe YCC95 und NOY505. Nuklei formaldehydvernetzter Zellen wurden in Abwesenheit (0min) und Anwesenheit von Ca²⁺ für 30min bei 30°C inkubiert. Die DNA wurde isoliert und mit XcmI linearisiert. Von den 0min Ansätzen wurde 1/10, von den restlichen Proben der Gesamtansatz in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit der XcmI-Promotor- (links) bzw. XcmI-5S- (mitte) bzw. Nup57-Sonde (rechts) im Southernblot analysiert. P: RPS23A-Promotor, E1, E2: Exons 1 und 2 von RPS23A.

Hmo1p bleibt nach dem Abschalten der Pol I Transkription mit der rDNA assoziiert

Zur Untersuchung, mit welcher Chromatinform einzelne Faktoren nach dem Abschalten der Pol I Transkription der Rrn3p-ts-Mutante im transkribierten Bereich assoziiert sind, wurde die Hälfte der Nuklei aus Abb. 3-18 nach der ChEC-Reaktion mit Psoralen vernetzt und die DNA mit EcoRI linearisiert. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abb. 3-20 dargestellt. Alle Stämme weisen bei 24°C zwei klare Banden auf, wobei die Bande der geschlossenen Chromatinform der aus YCC95 Zellen isolierten DNA deutlich stärker ist. Nach der Temperaturerhöhung auf 37°C verschwindet die obere Bande der offenen Chromatinform erneut bei allen Stämmen (vgl. Abb. 3-16). Hmo1p und die beiden RNA Polymerasen I und II sind im transkribierten Bereich bei 24°C mit der offenen Chromatinform assoziiert. In der Profilanalyse der Southernblots ist deutlich zu erkennen, daß die Kurve für Hmo1p bei 37°C vor der Induktion der MNase flacher und danach steiler ansteigt. Hmo1p ist somit noch mit dem übrig gebliebenen Teil der offenen Chromatinform assoziiert, welcher lediglich als leichte Schulter der *f*-Bande zu erkennen ist. Für Rpa43p und Rpb4p ist nach der Temperaturerhöhung keinerlei Assoziation mehr mit der offenen Form zu erkennen. Ein Teil der Kontroll-DNA (ohne MNase Induktion) von Rpb4p ist vermutlich während der DNA-Isolation oder beim Beladen des Gels verloren gegangen. Die Transkriptionsfaktoren Uaf30p und Rrn7p sind wie beim Wildtypstamm NOY505 nicht mit der 18S rDNA assoziiert und Histon H2B ist wie bei NOY505 mit der geschlossenen Chromatinform assoziiert (Daten nicht gezeigt).

Nach dem Abschalten der Pol I Transkription der Rrn3p-ts-Mutante bleibt Hmo1p im Gegensatz zu Pol I mit der offenen Chromatinform des transkribierten Bereichs assoziiert.

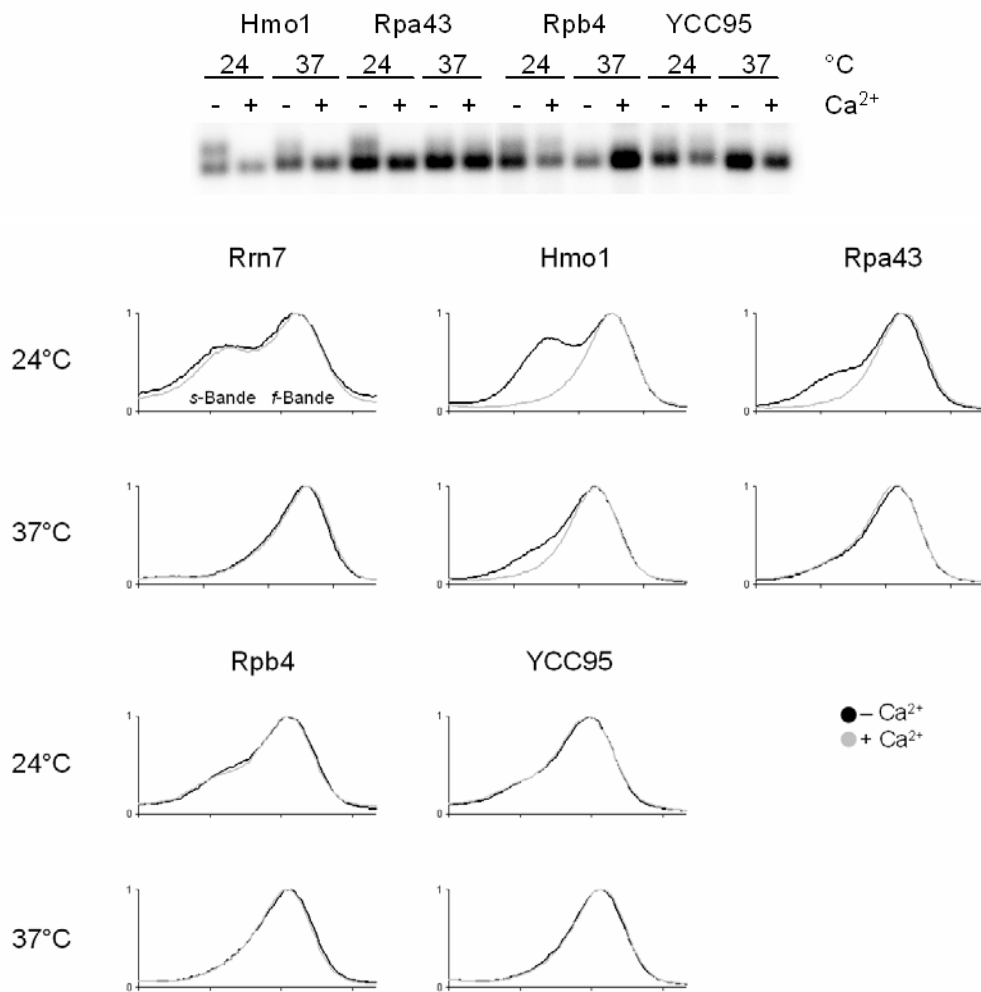


Abb. 3-20: Kombinierte *in vitro* ChEC- und Psoralenvernetzungsanalyse des transkribierten Bereichs der MNase-Fusionsstämme des Stammhintergrundes YCC95. Formaldehydvernetzte Nuklei ohne (-) und mit (+) Induktion der MNase durch Ca^{2+} wurden im Anschluß an das ChEC Experiment mit Psoralen inkubiert und die DNA isoliert. 1/10 der DNA wurde mit EcoRI linearisiert, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und im Southernblot mit der Psoralen-Sonde analysiert, die ein 2,85kb großes Fragment detektiert (Abb. 3-3). Die Profile der Southernblots zeigen links die stark psoralenvernetzte Bande der offenen Chromatinform (s-Bande) und rechts die schwächer vernetzte Bande der geschlossenen Form (f-Bande). Die Y-Achse repräsentiert dabei die Intensität. Als Kontrolle diente der Stamm YCC95 (ohne MNase).

Um Herauszufinden, welche Faktoren nach dem Abschalten der Pol I Transkription der Rrn3p-ts-Mutante im Promotorbereich an welche Chromatinform binden, wurde die DNA mit XcmI und SacII linearisiert. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abb. 3-21 dargestellt. Wie zuvor weisen auch hier alle Stämme bei 24°C zwei Banden auf, deren obere Bande nach der Temperaturerhöhung verschwindet. Für Hmo1p und Rpa43p ist im Promotorbereich das gleiche wie im transkribierten Bereich der 18S rDNA zu beobachten. Beide Faktoren sind bei 24°C mit der offenen Chromatinform assoziiert. Während Hmo1p nach der Temperaturerhöhung noch mit der offenen Form assoziiert bleibt, ist für Rpa43p keine Assoziation mehr zu erkennen (vgl. auch Abb. 3-18). Rpb4p ist im Promotorbereich weder bei 24°C noch bei 37°C mit einer bestimmten Chromatinform präferentiell assoziiert. Histon H2B bindet wie beim Wildtypstamm NOY505 an beide Chromatinformen (Daten nicht gezeigt). Die Transkriptionsfaktoren Uaf30p und Rrn7p sind bei 24°C präferentiell mit der

aktiven Population assoziiert. Nach der Temperaturerhöhung auf 37°C sind Uaf30p und Rrn7p offensichtlich mit beiden Chromatinformen gleichermaßen assoziiert.

Nach dem Abschalten der Pol I Transkription der Rrn3p-ts-Mutante bleibt Hmo1p im Gegensatz zu Pol I am Promotor mit der offenen Chromatinform assoziiert. Eine präferentielle Assoziation der Transkriptionsfaktoren Uaf30p und Rrn7p mit der offenen Chromatinform ist hingegen in diesen Analysen nicht mehr zu detektieren.

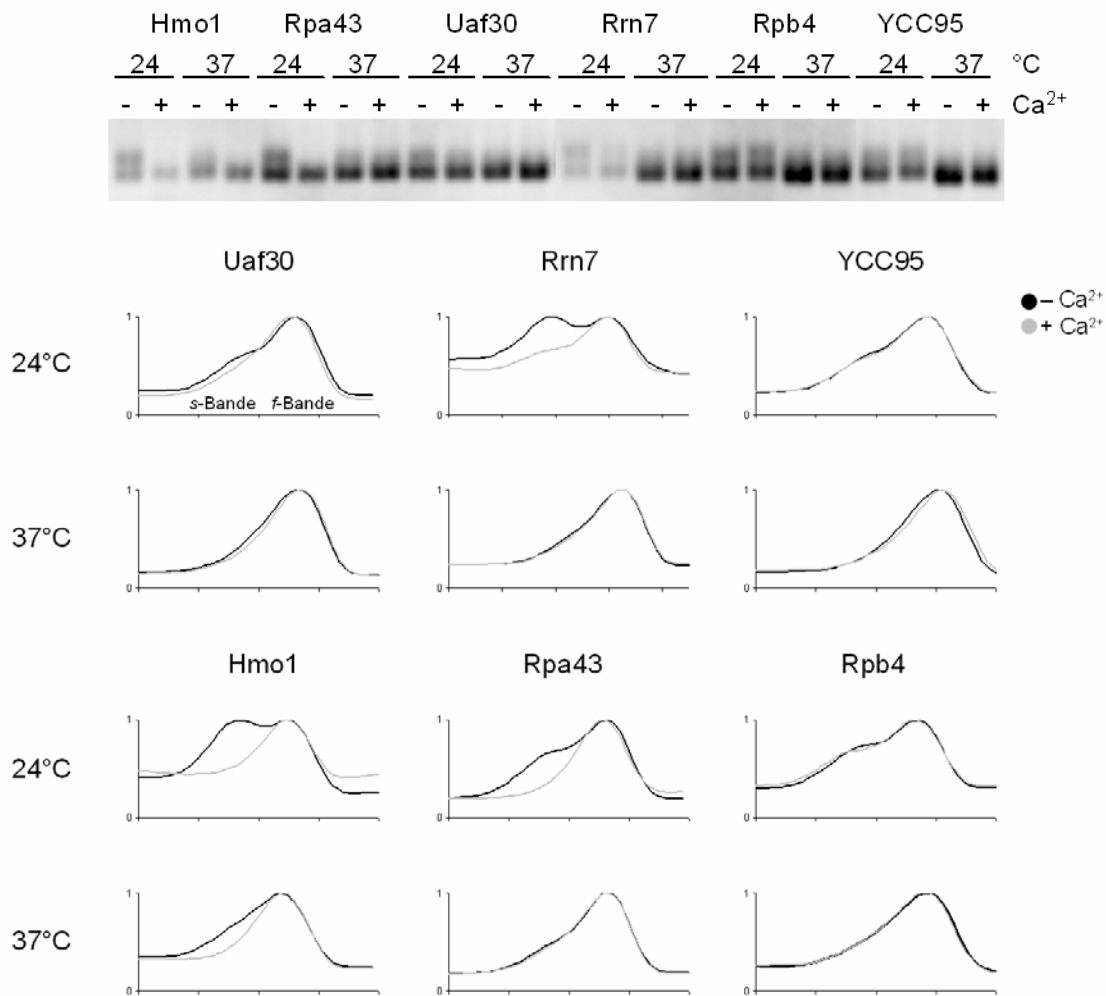


Abb. 3-21: Kombinierte *in vitro* ChEC- und Psoralenvernetzungsanalyse des Promotorbereichs der MNase-Fusionsstämme des Stammhintergrundes YCC95. Formaldehydvernetzte Nuklei ohne (-) und mit (+) Induktion der MNase durch Ca²⁺ wurden im Anschluß an das ChEC Experiment mit Psoralen inkubiert und die DNA isoliert. 1/10 der DNA wurde mit XcmI/ SacII linearisiert, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und im Southernblot mit der XcmI-Promotor-Sonde analysiert, die ein 2kb großes Fragment detektiert (Abb. 3-3). Die Profile der Southernblots zeigen links die stark psoralenvernetzte Bande der offenen Chromatinform (s-Bande) und rechts die schwächer vernetzte Bande der geschlossenen Form (f-Bande). Die Y-Achse repräsentiert dabei die Intensität. Als Kontrolle diente der Stamm YCC95 (ohne MNase).

3.4. Bei Nährstoffentzug ist Rrn3p nicht mehr mit dem Promotor assoziiert

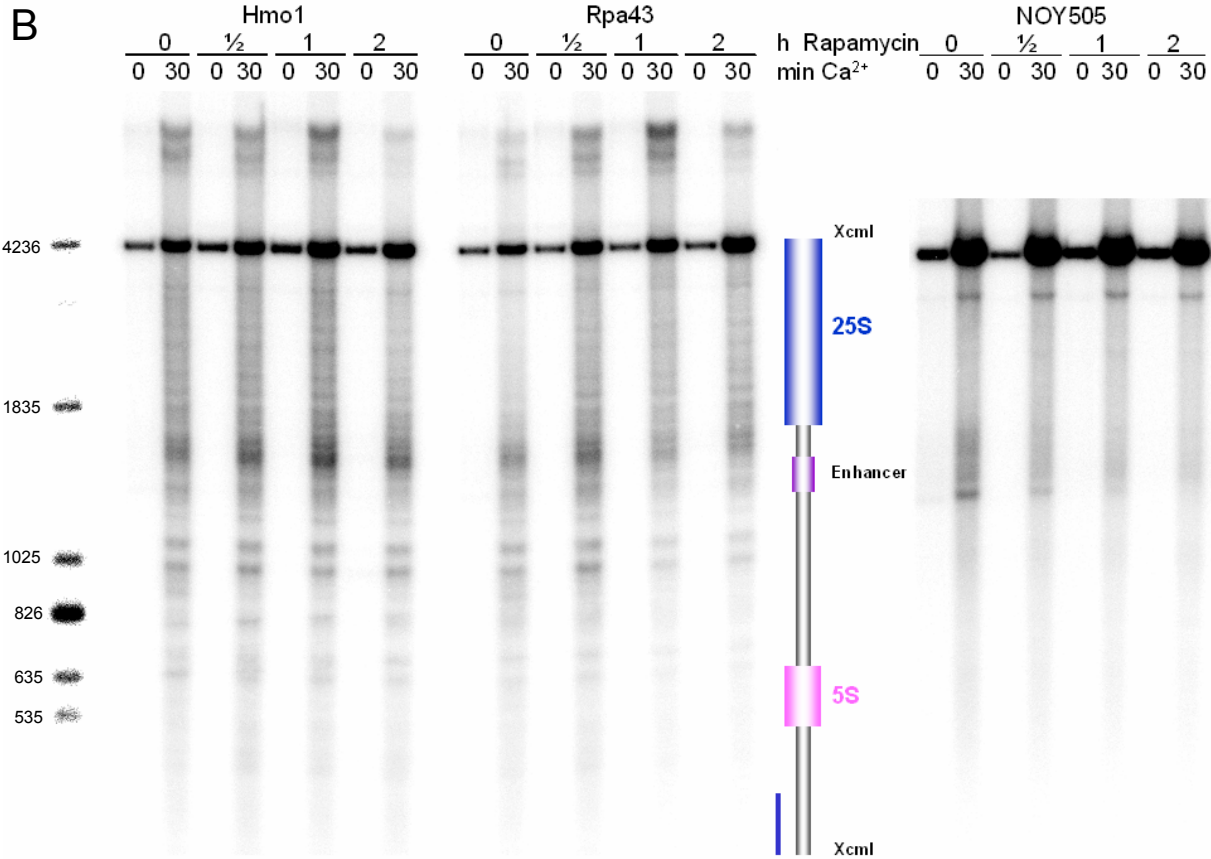
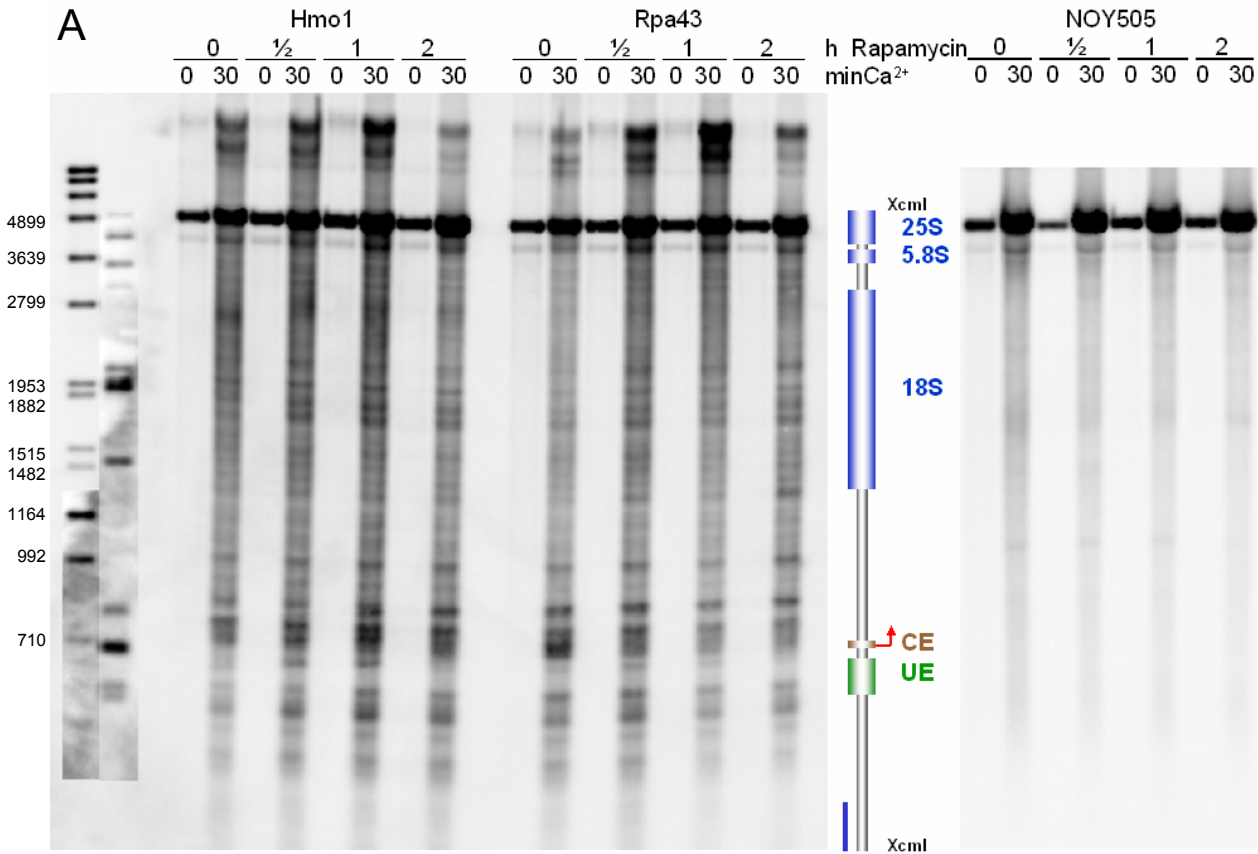
Zur Klärung der Frage, ob und inwiefern sich die Chromatinstruktur am rDNA Lokus nach dem Abschalten der Pol I Transkription ändert, wurden den MNase-Fusionsstämmen des Wildtypstammes NOY505 die Nährstoffe entzogen. Einerseits wurde ein Nährstoffmangel durch die Behandlung der Zellen mit Rapamycin imitiert, andererseits fehlten dem Medium essentielle Aminosäuren (Crespo and Hall, 2002; Powers and Walter, 1999; Zaragoza et al., 1998).

Von den logarithmisch wachsenden Kulturen (OD₆₀₀ von 0,2-0,7) aller Stämme wurde ein Viertel der Kultur entnommen (Nullwert; 0h). Die restliche Kultur wurde mit 200pg/ml Rapamycin versetzt und bei 30°C weiterkultiviert. Nach einer halben, einer und zwei Stunden wurde ein weiteres Aliquot entnommen. Die Nuklei wurden einer ChEC-Analyse unterzogen, deren eine Hälfte anschließend mit Psoralen vernetzt wurde.

3.4.1. Bei Nährstoffentzug bleiben alle Histone und Transkriptionsfaktoren bis auf Rrn3p mit der rDNA assoziiert

Die ChEC-Analysen von Hmo1p und Rpa43p sind in Abb. 3-22 dargestellt. Nach der Rapamycinbehandlung traten am gesamten rDNA Lokus keinerlei Änderungen in den Verdaumustern beider Stämme auf (Abb. 3-22A, B). Für die anderen MNase-Fusionsstämmen, bis auf Rrn3p (s. unten), wurde das gleiche beobachtet (Histone H2B, H3, H4, Uaf30p, Rrn10p, Rrn7p und Rpb4p; Daten nicht gezeigt). Hmo1p bleibt auch nach dem Abschalten der Transkription durch imitierten Nährstoffentzug (Rapamycinbehandlung) mit dem Promotor des Pol II transkribierten Gens der kleinen ribosomalen Untereinheit, RPS23A, stark assoziiert (Abb. 3-22C). Es wurde beschrieben, daß Hmo1p mit dem Promotor von RPS22B hingegen nur schwach assoziiert sei (Hall et al., 2006). Dies konnte ebenfalls beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). NOY505 (ohne MNase) zeigt sowohl vor als auch nach Rapamycinbehandlung nur die Schnitte intrazellulärer endogener Nukleasen.

Nach dem Abschalten der Pol I Transkription durch Rapamycinbehandlung bleiben die RNA Polymerase I, sowie alle Histone und Transkriptionsfaktoren bis auf Rrn3p mit der rDNA assoziiert.



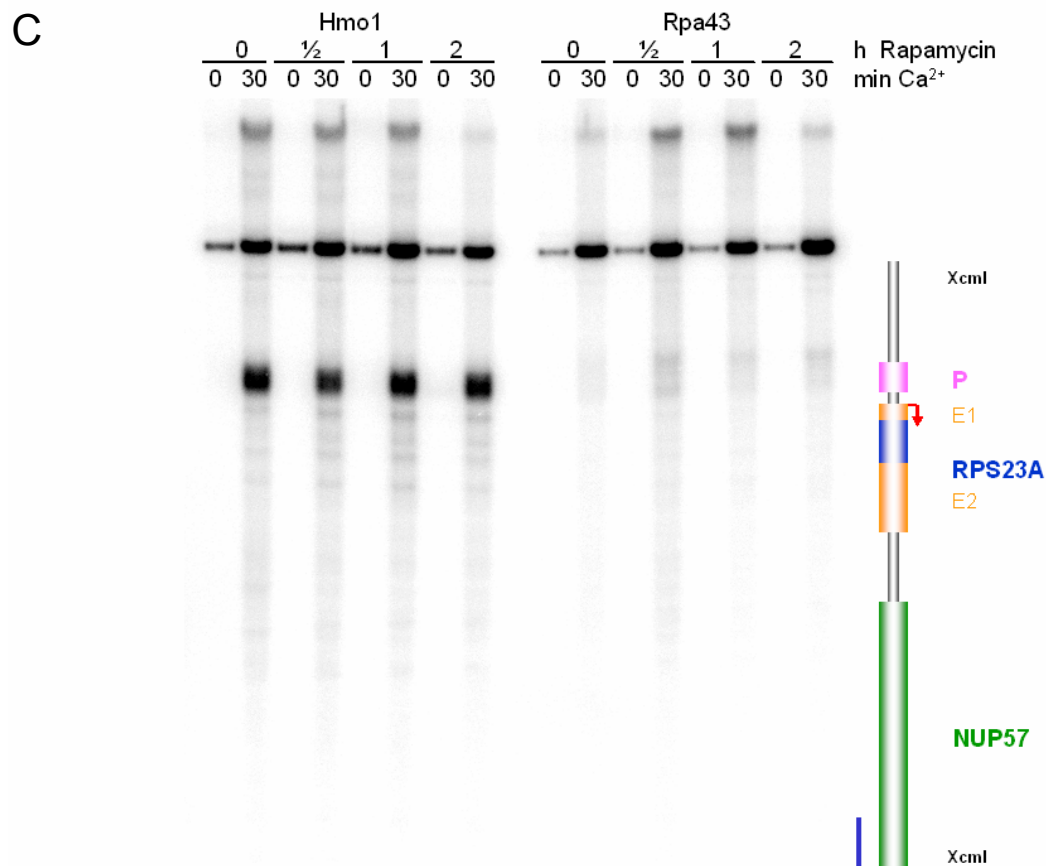


Abb. 3-22: *In vitro* ChEC Analyse der Hmo1p- und Rpa43p-MNase-Fusionsstämme des Stammhintergrundes NOY505 nach Rapamycinbehandlung. Die Nuklei formaldehydvernetzter Zellen wurden in Abwesenheit (0min) und Anwesenheit von Ca²⁺ für 30min bei 30°C inkubiert. Die DNA wurde isoliert und mit XcmI linearisiert. Von den 0min Ansätzen wurde 1/10, von den restlichen Proben der Gesamtansatz in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und im Southernblot mittels indirekter Endmarkierung analysiert. Autoradiogramme der Analysen (A) des Promotorbereichs und der 18S rDNA mit der XcmI-Promotor-Sonde, (B) der 25S rDNA und des intergenen *Spacers* mit der XcmI-5S-Sonde und (C) des RPS23A-Lokuses mit der Nup57-Sonde. Als Kontrolle diente NOY505 (ohne MNase). P: RPS23A-Promotor, E1, E2: Exons 1 und 2 von RPS23A.

Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Faktoren traten nach der Rapamycinbehandlung Änderungen in der Assoziation von Rrn3p mit der rDNA auf. Die ChEC-Analyse von Rrn3p ist in Abb. 3-23 dargestellt. Rrn3p weist vor der Rapamycinbehandlung zwei Schnitte im Bereich des *upstream* Elements auf (*), die mit zunehmender Zeit schwächer werden und nach 2-stündiger Behandlung nahezu verschwunden sind. Auch die Intensität des charakteristischen Schnittmusters im Bereich des Enhancers (vgl. auch Abb. 3-4) nimmt ab. Die beiden Banden des IGS1 verloren ebenfalls an Intensität. Dies war im Falle der anderen drei Faktoren Uaf30p, Rrn10p und Rrn7p nicht zu beobachten (Daten nicht gezeigt), was dafür spricht, daß alle vier Faktoren tatsächlich mit dem Enhancer und dem nicht transkribierten Bereich assoziiert sind.

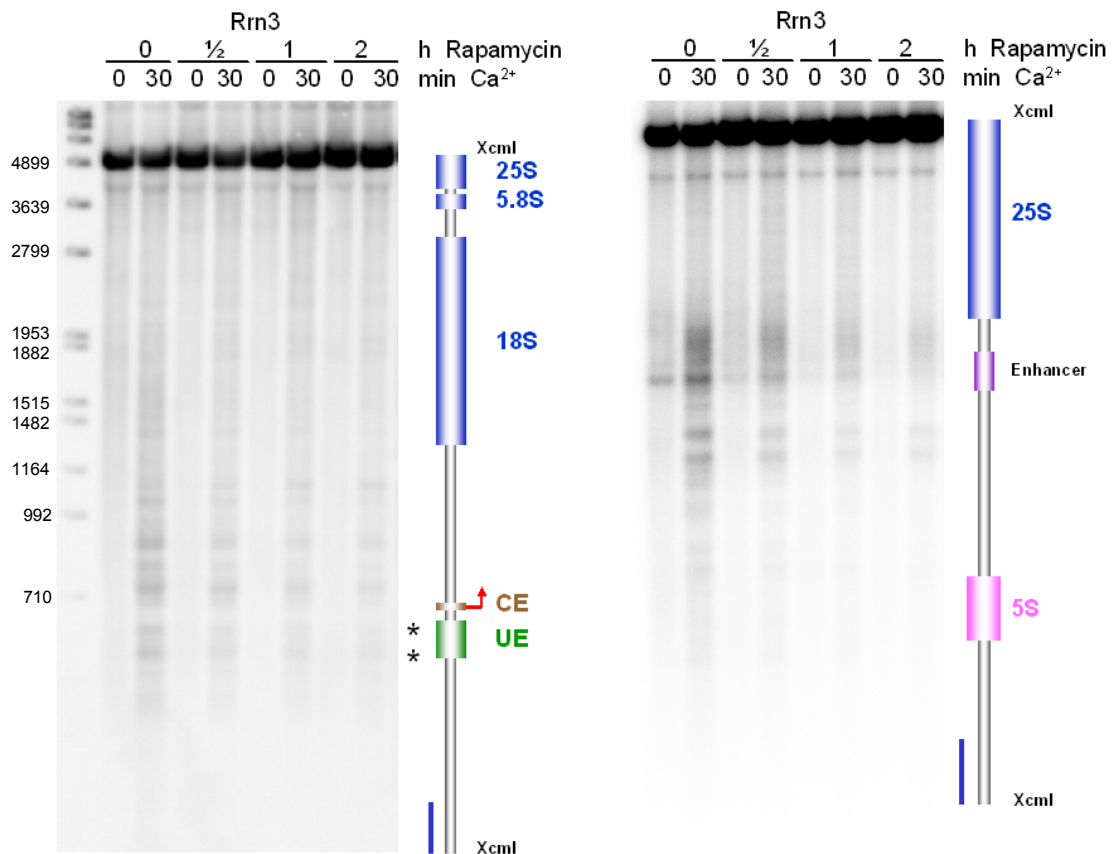


Abb. 3-23: *In vitro* ChEC Analyse der Hmo1p- und Rpa43p-MNase-Fusionsstämme des Stammhintergrundes NOY505 nach Rapamycinbehandlung. Die Nuklei formaldehydvernetzter Zellen wurden in Abwesenheit (0min) und Anwesenheit von Ca^{2+} für 30min bei 30°C inkubiert. Die DNA wurde isoliert und mit XcmI linearisiert. Der Gesamtansatz wurde in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit der XcmI-Promotor- (links) bzw. XcmI-5S-Sonde (rechts) im Southernblot analysiert. Die Rn3p-Assoziation mit dem Promotor (*) und Enhancer geht nach der Rapamycinbehandlung nahezu verloren.

Da der Rn3p-MNase-Fusionsstamm als einziger Änderungen aufwies, wurde er zusammen mit dem von Rpa43p und dem Wildtypstamm NOY505 infolge eines echten Nährstoffentzugs untersucht. Eine in Vollmedium logarithmisch wachsende Kultur wurde halbiert und eine Hälfte der Zellen in synthetischem Mangelmedium (SCD-Ade-His-Leu-Trp) für zwei Stunden weiterkultiviert. Die Nuklei wurden einer ChEC- und Psoralenvernetzungsanalyse unterzogen.

Abb. 3-24 zeigt das Ergebnis der ChEC-Analyse. Der Kontrollstamm NOY505 (ohne MNase) weist vor und nach Aminosäureentzug nur die Banden intrazellulärer endogener Nukleasen auf. Für den Rn3p-MNase-Fusionsstamm ist das gleiche wie bei der Rapamycinbehandlung zu beobachten. Der Aminosäureentzug scheint sich jedoch stärker auszuwirken als die Rapamycinbehandlung. Die Bandenintensitäten sind nach dem Aminosäureentzug wesentlich schwächer als nach der Rapamycinbehandlung. So sind die Schnitte im Promotor- und Enhancerbereich nur noch sehr schwer zu erkennen, die im nicht transkribierten Bereich sind völlig verschwunden. Die rDNA wird von dem Rpa43p-MNase-Fusionsprotein nach dem Entzug von Aminosäuren weniger stark verdaut als vor dem Entzug (vgl. XcmI-Banden bei 4,9kb), was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, daß die Polymerasedichte an der rDNA infolge des Nährstoffentzugs sinkt (Claypool et al., 2004).

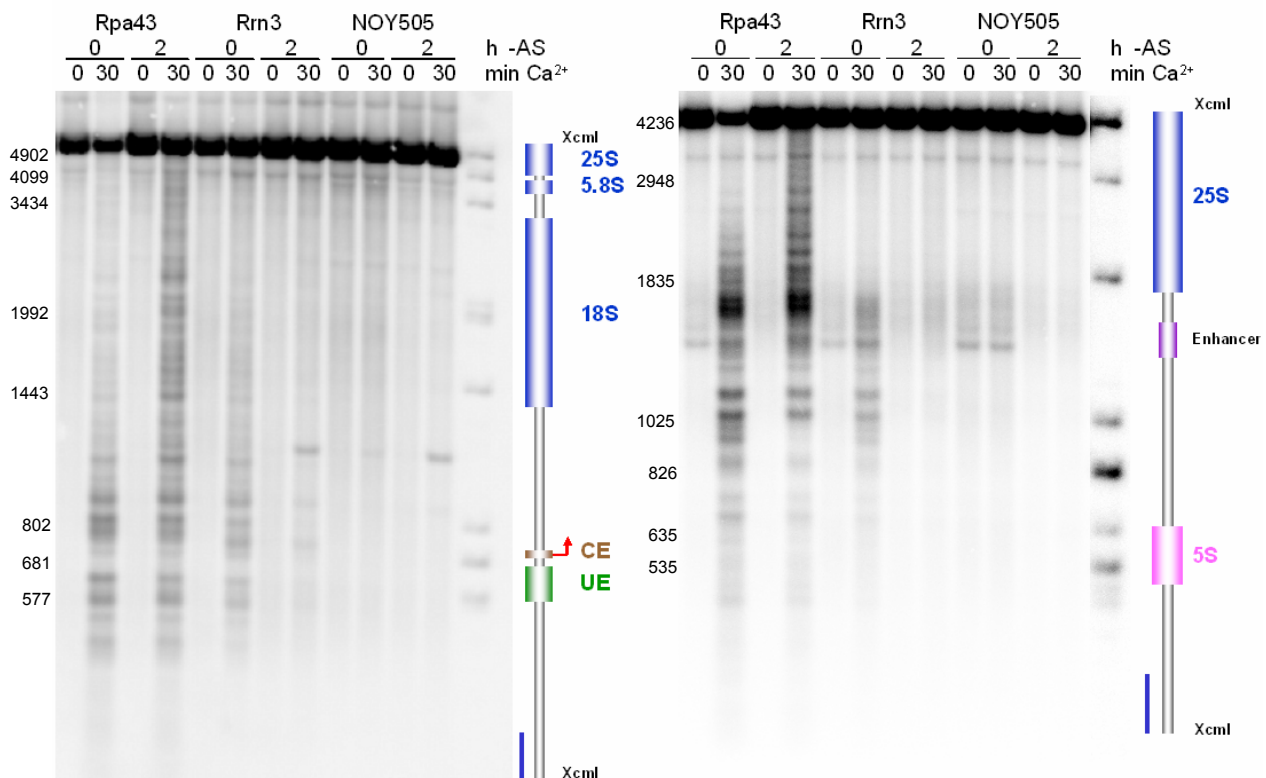


Abb. 3-24: *In vitro* ChEC Analyse der Rpa43p- und Rrn3p-MNase-Fusionsstämme des Stammhintergrundes NOY505 nach Aminosäureentzug. Die Nuklei formaldehydvernetzter Zellen wurden in Abwesenheit (0min) und Anwesenheit von Ca^{2+} für 30min bei 30°C inkubiert. Die DNA wurde isoliert und mit XcmI linearisiert. Der Gesamtsatz wurde in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit der XcmI-Promotor- (links) bzw. XcmI-5S-Sonde (rechts) im Southernblot analysiert. Als Kontrolle diente NOY505 (ohne MNase).

3.4.2. Transkriptionsfaktoren (außer Rrn3p) und Histone bleiben bei Nährstoffentzug mit der gleichen Chromatinform assoziiert wie vor dem Entzug

Zur Untersuchung, ob sich die Assoziation einzelner Faktoren mit einer bestimmten Chromatinform nach dem Nährstoffentzug ändert, wurden die Nuklei der vorherigen Versuche nach dem ChEC mit Psoralen vernetzt. Die Psoralenanalysen des transkribierten Bereichs mit der Psoralen-Sonde zeigten vor der Rapamycinbehandlung zwei Banden. Danach nahm die Psoralenzugänglichkeit der oberen Bande zunehmend ab und näherte sich im Gel der unteren immer weiter an, was in der Profilanalyse der Southernblots am nach rechts Wandern der schwarzen Kurven sehr gut zu erkennen ist (Abb. 3-25). Die veränderte Psoralenzugänglichkeit könnte darauf hindeuten, daß unter Nährstoffmangelbedingungen eine alternative Chromatinstruktur ausgebildet wird. Im weiteren wird diese DNA Population allerdings immer noch als „offen“ beschrieben. Hmo1p und Rpa43p, die mit der offenen Chromatinform assoziiert sind, bleiben auch nach der Rapamycinbehandlung mit dieser Form assoziiert. Die Profilanalyse der Southernblots zeigt dies deutlich, da die Schulter in der Profilanalyse der DNA Banden aus Nuklei in Abwesenheit von Calcium (schwarze Kurven) in der Profilanalyse der DNA aus Nuklei nach Inkubation mit Calcium fehlt (graue Kurven).

Rrn3p, das nicht mit dem transkribierten Bereich der 25S rDNA assoziiert ist, weist keine Änderungen auf. Gleiches wurde für die UAF- und CF-Transkriptionsfaktoren beobachtet. Die Histone blieben auch nach der Rapamycinbehandlung mit der geschlossenen Chromatinform assoziiert (Daten nicht gezeigt).

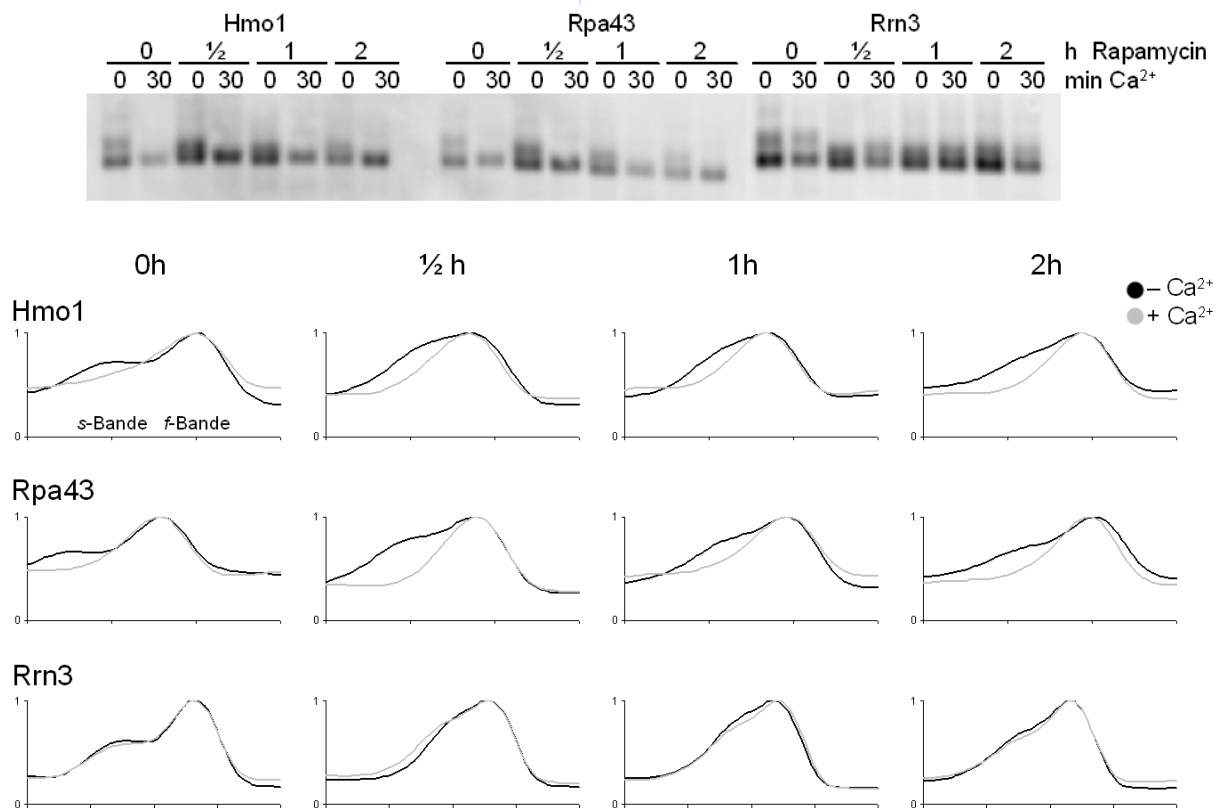


Abb. 3-25: Kombinierte *in vitro* ChEC- und Psoralenvernetzungsanalyse des transkribierten Bereichs der MNase-Fusionsstämme des Stammhintergrundes NOY505 nach Rapamycinbehandlung. Formaldehydvernetzte Nuklei ohne (-) und mit (+) Induktion der MNase durch Ca^{2+} wurden im Anschluß an das ChEC Experiment mit Psoralen inkubiert und die DNA isoliert. Die DNA wurde mit EcoRI linearisiert, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und im Southernblot mit der Psoralen-Sonde analysiert, die ein 2,85kb großes Fragment detektiert (Abb. 3-3). Die Profile der Southernblots zeigen links die stark psoralenvernetzte Bande der offenen Chromatinform (s-Bande) und rechts die schwächer vernetzte Bande der geschlossenen Form (f-Bande). Die Y-Achse repräsentiert dabei die Intensität.

Im Promotorbereich ist ebenfalls zu erkennen, daß die obere Bande sowohl nach Rapamycinbehandlung als auch nach Aminosäureentzug für Psoralen weniger zugänglich ist als zuvor (Abb. 3-26). Hmo1p und Rpa43p bleiben nach der Rapamycinbehandlung und Rpa43p nach dem Aminosäureentzug mit der offenen Chromatinform assoziiert. Im Profil von Rrn3p ist deutlich zu erkennen, daß die Assoziation von Rrn3p mit der rDNA bereits nach einer halben Stunde Rapamycinbehandlung stark abnimmt. Der Entzug von Aminosäuren führt ebenfalls zu einer starken Reduktion der Rrn3p Assoziation mit dem rDNA Promotor. Die anderen Transkriptionsfaktoren bleiben mit der offenen und die Histone mit beiden Chromatinformen assoziiert (Daten nicht gezeigt).

Nach dem Abschalten der Pol I Transkription durch Nährstoffentzug (Rapamycinbehandlung bzw. Aminosäureentzug) bleiben sowohl im transkribierten als auch im Promotorbereich bis

auf Rrn3p alle untersuchten Faktoren, mit der gleichen Chromatinform wie vor dem Entzug assoziiert.

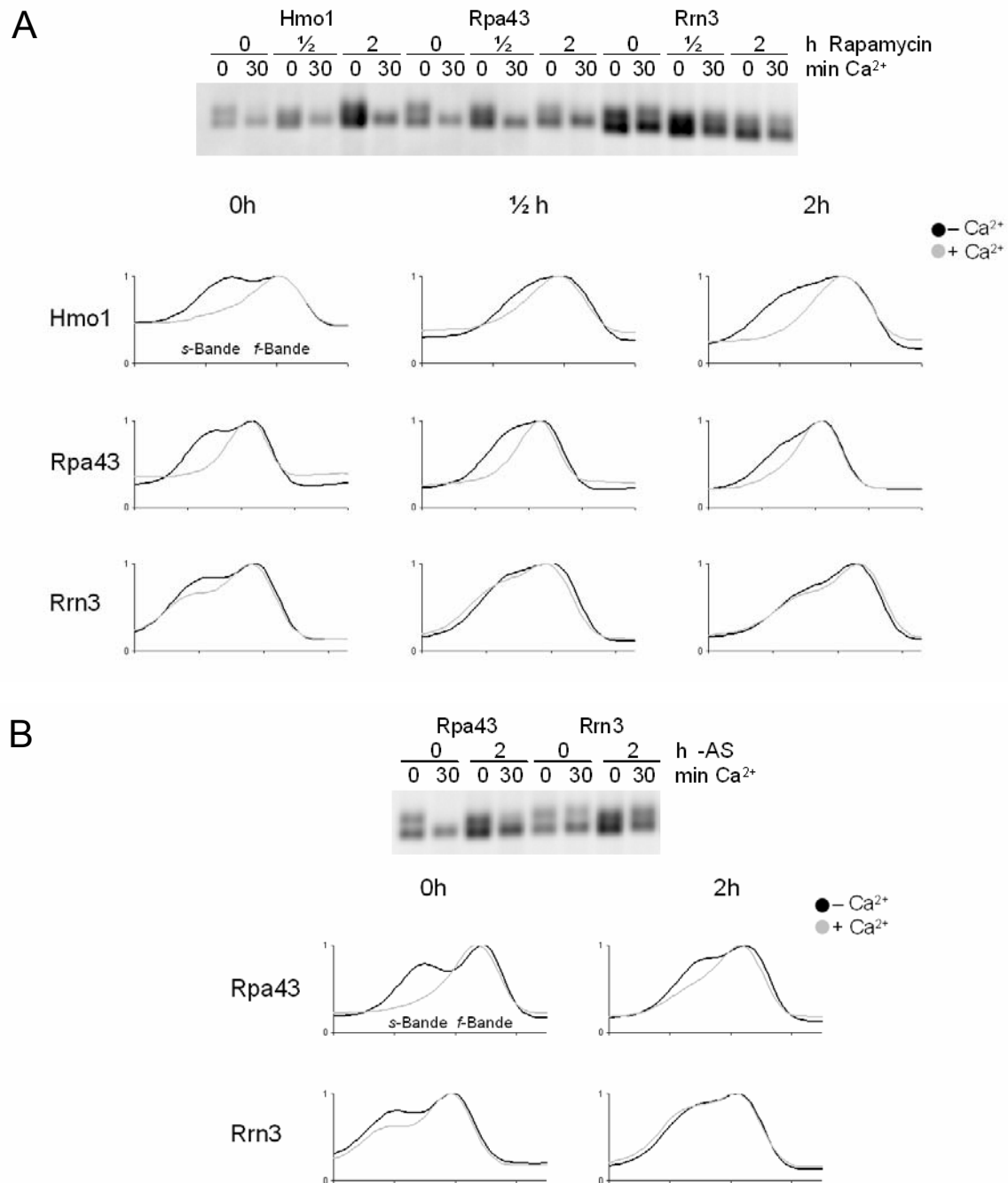


Abb. 3-26: Kombinierte *in vitro* ChEC- und Psoralenvernetzungsanalyse des Promotorbereichs der MNase-Fusionsstämme des Stammhintergrundes NOY505 nach (A) Rapamycinbehandlung und (B) Aminosäureentzug. Formaldehydvernetzte Nuklei ohne (-) und mit (+) Induktion der MNase durch Ca²⁺ wurden im Anschluß an das ChEC Experiment mit Psoralen inkubiert und die DNA isoliert. Die DNA wurde mit XcmI/ SacII linearisiert, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und im Southernblot mit der XcmI-Promotor-Sonde analysiert, die ein 2kb großes Fragment detektiert (Abb. 3-3). Die Profile der Southernblots zeigen links die stark psoralenvernetzte Bande der offenen Chromatinform (s-Bande) und rechts die schwächer vernetzte Bande der geschlossenen Form (f-Bande). Die Y-Achse repräsentiert dabei die Intensität.

3.5. NOY886: Ein konstitutiv aktiver Stamm

In logarithmisch wachsenden Zellen liegt etwa die Hälfte der rRNA Gene in aktiver Form vor, so daß die ChEC-Analysen immer ein überlagertes Muster aus aktiver und inaktiver Population repräsentieren. Die Analyse einer „reinen“ inaktiven Fraktion ist anhand der UAF- und CF-Mutanten möglich, die nur die inaktive Form aufweisen (vgl. Abb. 3-12). Zur Analyse der Chromatinstruktur einer „reinen“ aktiven Population wurde im folgenden ein konstitutiv aktiver Stamm untersucht (NOY886, s. 1.3.3), der ~40 rDNA Kopien besitzt, die alle als aktiv beschrieben wurden (French et al., 2003). Nach der Psoralenbehandlung von Nuklei, sowie von Zellen der NOY886-MNase-Fusionsstämme wurde in der DNA-Analyse hauptsächlich die obere Bande der offenen Chromatinform beobachtet (Abb. 3-27). Zusätzlich weisen die Nuklei die untere Bande der geschlossenen Chromatinform auf, die jedoch nur als leichter Schatten unter der oberen Bande wahrzunehmen ist. Im 40-Kopienstamm liegen also nicht alle 40 rDNA Kopien in der aktiven Form vor.

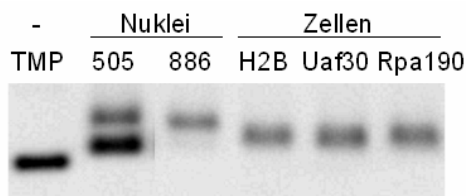


Abb. 3-27: Die rDNA des konstitutiv aktiven Stammes NOY886 liegt in der offenen Chromatinform vor. Ganze Zellen bzw. Nuklei der NOY886-Fusionsstämme wurden mit Psoralen behandelt. Die DNA wurde isoliert, mit EcoRI linearisiert und im Southernblot mit der ORF-Sonde analysiert (Abb. 3-3). Als Kontrolle dienten Nuklei von NOY505 (WT).

3.5.1. UAF ist nicht mit dem Enhancer des konstitutiv aktiven Stammes NOY886 assoziiert

Die NOY886-MNase-Fusionsstämme wurden in der ChEC-Analyse mit denen des Wildtypstammes NOY505 verglichen, dessen rDNA Kopien zur Hälfte aktiv transkribiert werden und zur Hälfte inaktiv sind. Die Verdauemuster der MNase-Fusionsproteine von Hmo1p und den drei Pol I Untereinheiten A43, A49 und A190 sind in beiden Stämmen als auch untereinander über den gesamten rDNA Lokus identisch (Daten nicht gezeigt). Die UAF-Komponenten Uaf30p und Rrn10p weisen ebenfalls in beiden Stämmen am Promotor und im transkribierten Bereich die selben Assoziationsstellen auf (Abb. 3-28). Das für NOY505-MNase-Fusionsstämme typische Schnittmuster am Enhancer fehlt jedoch bei denen von NOY886. Histon H3 hingegen weist an gleicher Stelle in beiden Stämmen vergleichbare Bandenintensitäten auf, so daß davon ausgegangen werden kann, daß UAF im Gegensatz zu NOY505 nicht mit dem Enhancer von NOY886 assoziiert ist. Mögliche Ursachen dafür werden in Kapitel 4.1.2. diskutiert. Der Histon H3-MNase-Fusionsstamm von NOY886 (nur aktive Form) weist im transkribierten Bereich deutlich weniger Schnitte auf als der von NOY505 (aktive und inaktive Form; s. auch Kapitel 3.7.), was ein Hinweis darauf ist, daß der transkribierte Bereich der rDNA nahezu frei von Nukleosomen ist.

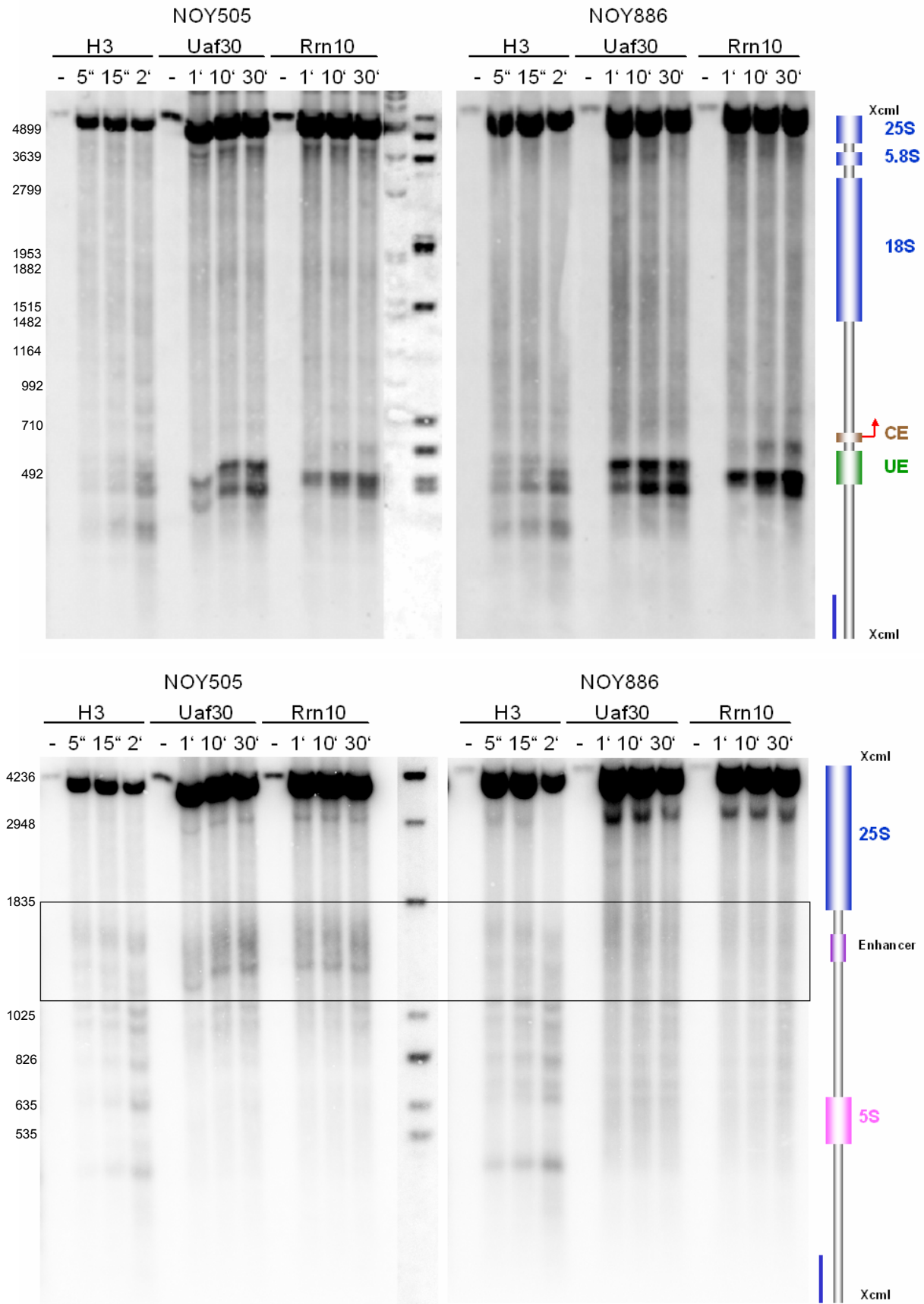


Abb. 3-28: Der Enhancer von NOY886 ist nicht mit UAF assoziiert. *In vitro* ChEC Analyse der MNase-Fusionsstämme der Stammhintergründe NOY505 und NOY886. Von NOY886 wurde aufgrund der geringeren Kopienzahl die doppelte Zellmenge eingesetzt. Die Nuklei formaldehydvernetzter Zellen wurden in Abwesenheit (0min) und Anwesenheit von Ca^{2+} für 5s, 15s oder 2min (Histon H3) bzw. 1min, 10min oder

30min bei 30°C inkubiert. Die DNA wurde isoliert und mit XcmI linearisiert. Von den 0min Ansätzen wurde 1/10, von den restlichen Proben der Gesamtansatz in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit der XcmI-Promotor- (oben) bzw. XcmI-5S-Sonde (unten) im Southernblot analysiert.

3.6. Chromatinstruktur nach Uracildepletion

3.6.1. Die Depletion von Uracil führt zu einer veränderten Psoralenzugänglichkeit der rDNA von NOY886

Zum Abschalten der Pol I Transkription sollte dem konstitutiv aktiven Stamm NOY886 wie den MNase-Fusionsstämmen des Wildtypstammes NOY505 (vgl. 3.4.) die Nährstoffe entzogen werden. NOY886 weist den folgenden Genotyp auf: *ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rpa135ΔLEU2 fob1ΔHIS pNOY117 (CEN, RPA135, TRP1)* und kann daher alle Aminosäuren synthetisieren. Darum wurde der Stamm zum Abschalten der Pol I Transkription in Abwesenheit von Uracil kultiviert.

Eine in YPD bzw. synthetischem Vollmedium (SCD) logarithmisch wachsende Kultur wurde geteilt und zwei Drittel wurden für zwei bzw. fünf Stunden in Mangelmedium (SCD-Ura) weiterkultiviert. Von der Hälfte der Zellen wurden die Nuklei isoliert. Die übrigen Zellen und die isolierten Nuklei wurden mit Psoralen vernetzt. Sowohl die Zellen als auch die Nuklei, die in YPD kultiviert wurden, weisen vor der Uracildepletion nur die obere Bande der offenen Chromatinform auf (Abb. 3-29). Die in SCD kultivierten Zellen und deren Nuklei weisen wie NOY886 zusätzlich noch die untere Bande auf, die als leichter Schatten unter der oberen Bande wahrzunehmen ist. Die Vernetzungseffizienz der Nuklei mit Psoralen war auch bei diesem Versuch deutlich höher als die ganzer Zellen, denn die Bande der Nuklei wandert im Gel langsamer als die der Zellen. Mit fortschreitender Uracildepletion nimmt die Psoralenzugänglichkeit der oberen Bande ab, wobei sich dieser Effekt bei den psoralenvernetzten Zellen deutlich stärker bemerkbar macht als bei den Nuklei. Nach fünfstündiger Depletion wandert die Bande der Zellen genau zwischen der oberen und der unteren Bande des Nullwertes (0h), wobei die untere Bande der in SCD vorkultivierten Zellen verschwindet und vermutlich in die obere übergeht (die Linien wurden in die Mitte der oberen und unteren Bande des Nullwertes gelegt). Bei den Nuklei nimmt die Psoralenzugänglichkeit nicht so stark ab, wie bei den Zellen, was auf die höhere Gesamtvernetzungseffizienz der Nuklei zurückzuführen ist. Die Bande läuft jedoch nach fünfstündiger Depletion unterhalb der des Nullwertes (0h). Auch bei den Nuklei der in SCD vorkultivierten Zellen verschwindet die untere Bande und geht vermutlich in die offene Bande auf mittlerer Höhe über.

Ziel der Uracildepletion war es, die Pol I Transkription abzuschalten. Wie beim Nährstoffentzug (vgl. 3-25, 26) nahm auch bei der Uracildepletion die Psoralenzugänglichkeit der oberen Bande ab, überraschenderweise nahm gleichzeitig die der unteren Bande zu. Eine mögliche Erklärung dessen wird in Kapitel 4.4. (vgl. Abb. 4-3D) diskutiert.

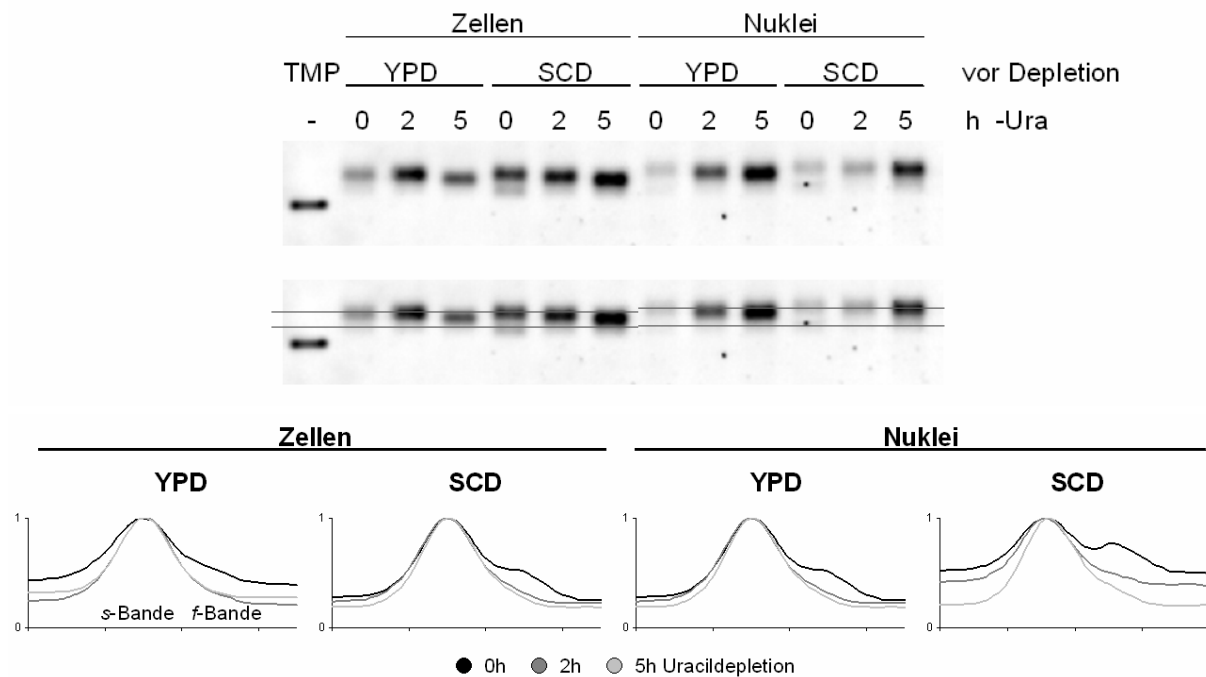


Abb. 3-29: Psoralenvernetzungsanalyse von NOY886 Zellen und Nuklei vor und nach Uracildepletion. NOY886 Zellen wurden in YPD bzw. SCD kultiviert und anschließend wurde Uracil für zwei bzw. fünf Stunden depletiert. Die DNA wurde isoliert, mit EcoRI linearisiert, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und im Southernblot mit der ORF-Sonde analysiert (Abb. 3-3). Die Linien wurden in die Mitte der oberen und unteren Bande des Nullwertes gelegt. Unterschiede in den Intensitäten der Banden sind darauf zurückzuführen, daß anstelle gleicher Zellzahlen gleiche Volumina (Zellen aus 25ml Kultur) analysiert wurden. Das Profil des Southernblots zeigt links die stark psoralenvernetzte Bande der offenen Chromatinform (*s*-Bande) und rechts die schwächer vernetzte Bande der geschlossenen Form (*f*-Bande). Die Y-Achse repräsentiert dabei die Intensität.

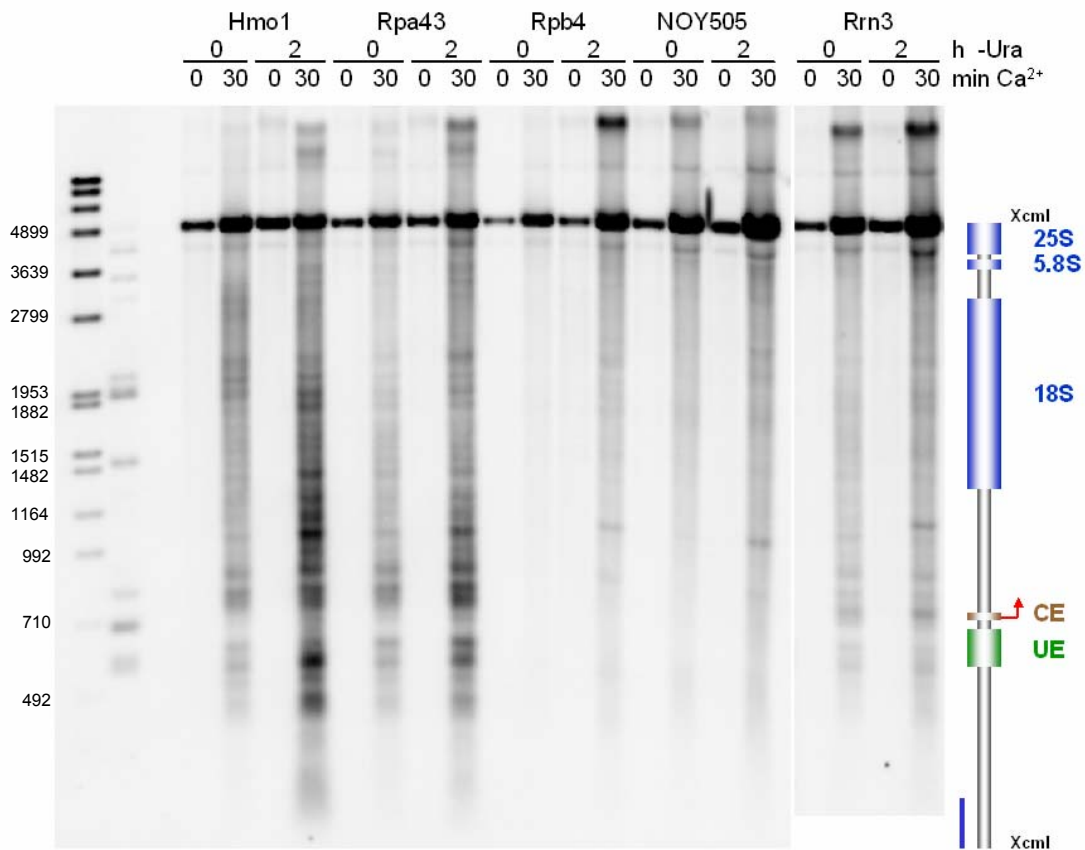
3.6.2. Die Uracildepletion verhindert möglicherweise die Elongation von Pol I

Aufgrund der unerwarteten Beobachtung, daß die Psoralenzugänglichkeit der unteren Bande von NOY886 (40-Kopienstamm) nach Uracildepletion zunahm und in die obere Bande überzugehen schien, wurde die Chromatinstruktur der NOY505-MNase-Fusionsstämme ebenfalls nach der Depletion von Uracil mittels ChEC- und Psoralenvernetzungsanalyse untersucht. Dafür wurden die Zellen in YPD kultiviert und Uracil wie bei NOY886 für zwei Stunden depletiert.

Die Verdaumuster von Hmo1p und Rpa43p unterscheiden sich nach der Uracildepletion nicht von denen ohne Depletion (Abb. 3-30). Beide Stämme weisen wie zuvor ein identisches Muster auf. Es scheint als sei die Elongation beeinträchtigt und als ob Rpa43p und Hmo1p an bestimmten Stellen der rDNA pausierten. Während Rrn3p nach der Aminosäuredepletion nicht mehr mit dem Promotor assoziiert war, bindet es nach der Uracildepletion noch immer an ihn. Rrn3p bleibt ebenfalls mit dem Enhancer und dem nicht transkribierten Bereich assoziiert. Die rDNA ist sowohl vor als auch nach der Uracildepletion nicht mit Pol II assoziiert. An den Assoziationsmustern der Transkriptionsfaktoren Uaf30p, Rrn10p, Rrn7p

und denen der Histone traten nach der Uracildepletion keine Änderungen auf (Daten nicht gezeigt).

Möglicherweise wird die Pol I Transkription der rDNA von *S. cerevisiae* auch auf Ebene der Elongation reguliert. Ein mögliches Szenarium, das sich an der rDNA abspielen könnte, wird in Kapitel 4.2.2. diskutiert.



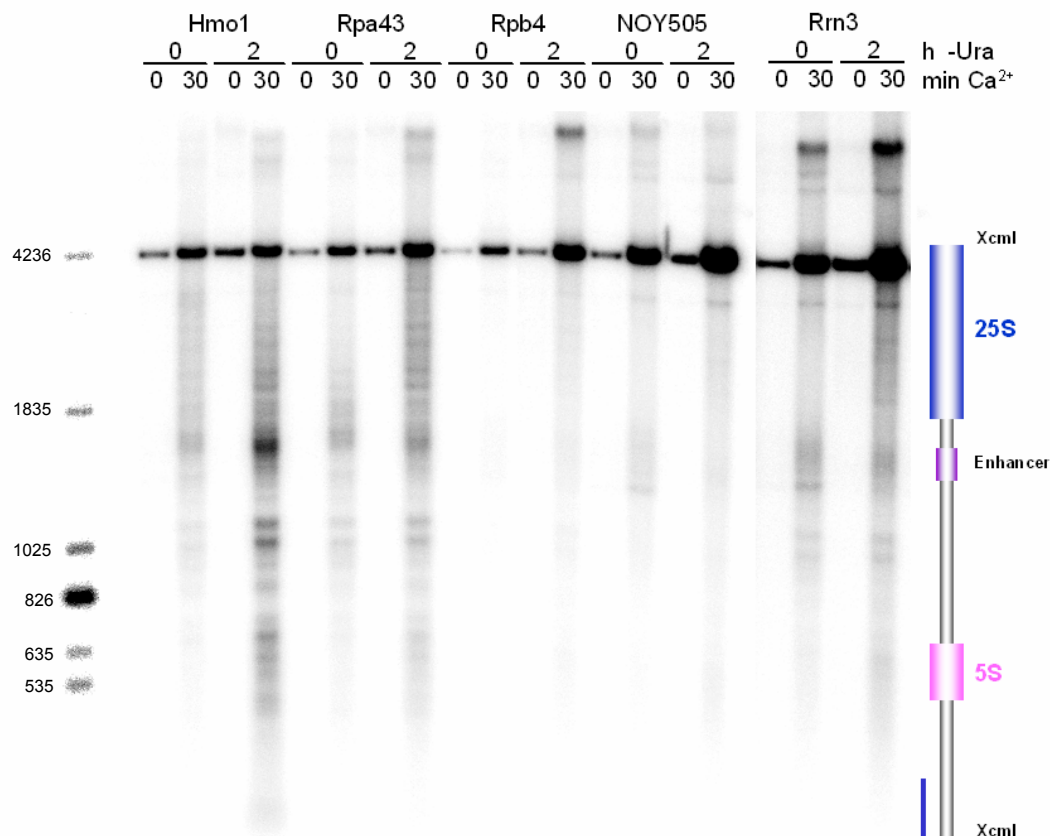


Abb. 3-30: *In vitro* ChEC Analyse der MNase-Fusionsstämme des Stammhintergrundes NOY505 vor (0h) und nach (2h) Uracildepletion. Die Nuklei formaldehydvernetzter Zellen wurden in Abwesenheit (0min) und Anwesenheit von Ca^{2+} für 30min bei 30°C inkubiert. Die DNA wurde isoliert und mit XcmI linearisiert. Von den 0min Ansätzen wurde 1/10, von den restlichen Proben der Gesamtansatz in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit der XcmI-Promotor- (oben) bzw. XcmI-5S-Sonde (unten) im Southernblot analysiert.

3.6.3. Die Depletion von Uracil führt zu einer veränderten Psoralenzugänglichkeit der rDNA von NOY505-MNase-Fusionsstämmen

Die Psoralenanalysen des transkribierten Bereichs mit der Psoralen-Sonde zeigten vor der Uracildepletion zwei Banden. Danach nahm die Psoralenzugänglichkeit der oberen Bande ab und sie näherte sich wie bei NOY886 und beim Nährstoffmangel der unteren an, was in der Profilanalyse der Southernblots am nach rechts Wandern der schwarzen Kurven sehr gut zu erkennen ist (Abb. 3-31). Zusätzlich nimmt die Intensität der oberen Bande nach zweistündiger Depletion zu, während die der unteren Bande abnimmt. Offensichtlich beginnt sich die geschlossene Chromatinform zu „öffnen“ und geht die offene Form über. Rpa43p und Hmo1p bleiben auch nach der Depletion mit der offenen Chromatinform assoziiert, so wie die Histone H2B, H3 und H4 mit der inaktiven assoziiert bleiben (Daten nicht gezeigt). Die Transkriptionsfaktoren des UAF- und CF-Komplexes, die an den rDNA Promotor binden, sind erwartungsgemäß weder vor noch nach der Uracildepletion mit dem transkribierten Bereich assoziiert.

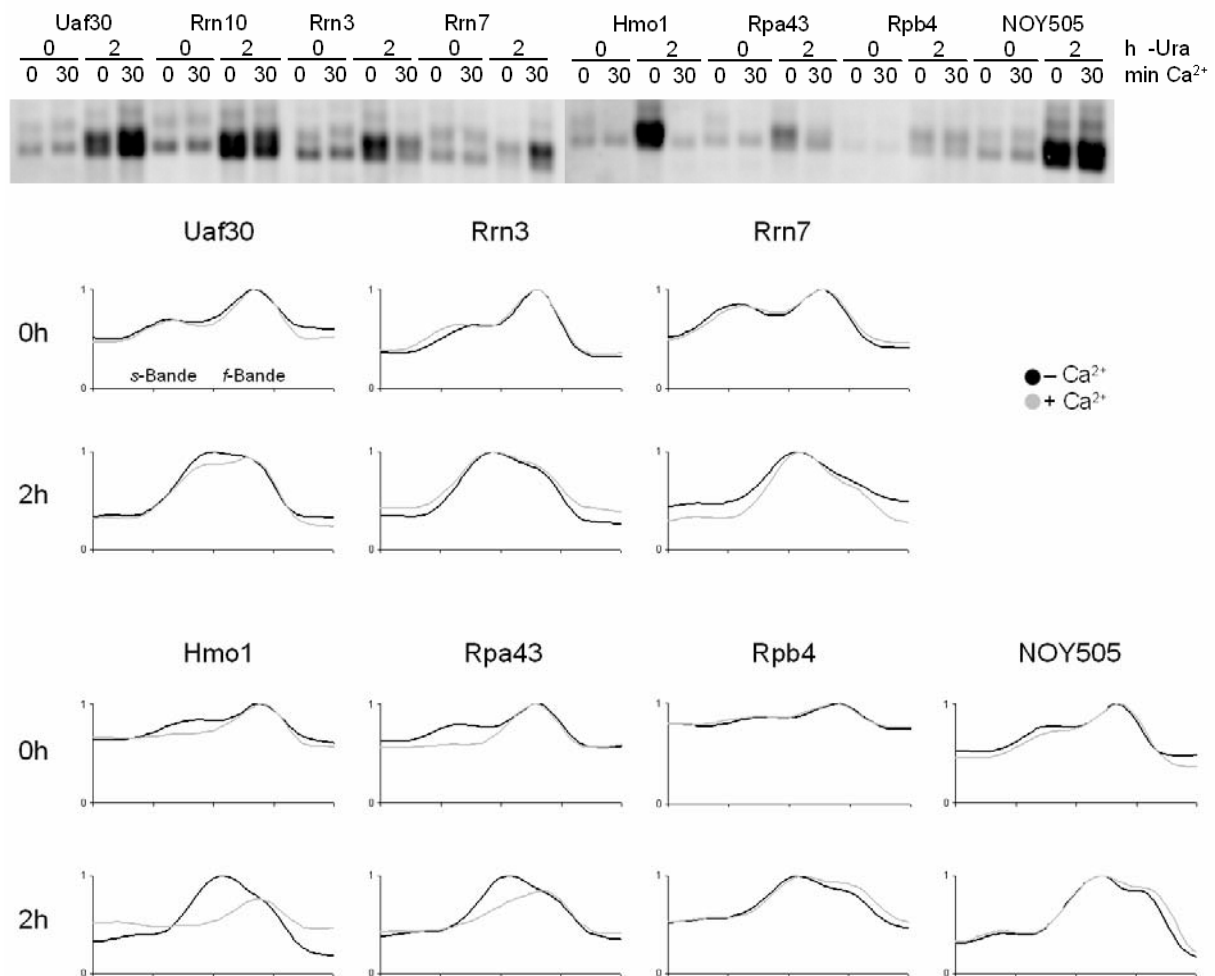


Abb. 3-31: Kombinierte *in vitro* ChEC- und Psoralenvernetzungsanalyse des transkribierten Bereichs der MNase-Fusionsstämme des Stammhintergrundes NOY505 vor (0h) und nach 2h Uracildepletion. Formaldehydvernetzte Nuklei ohne (-) und mit (+) Induktion der MNase durch Ca²⁺ wurden im Anschluß an das ChEC Experiment mit Psoralen inkubiert und die DNA isoliert. Die DNA wurde mit EcoRI linearisiert, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und im Southernblot mit der Psoralen-Sonde analysiert, die ein 2,85kb großes Fragment detektiert (Abb. 3-3). Die Profile der Southernblots zeigen links die stark psoralenvernetzte Bande der offenen Chromatinform (*s*-Bande) und rechts die schwächer vernetzte Bande der geschlossenen Form (*f*-Bande). Die Y-Achse repräsentiert dabei die Intensität.

Die Psoralenanalyse des Promotorbereichs mit der XcmI-Promotor-Sonde ergab ebenfalls, daß die Psoralenzugänglichkeit der oberen Bande nach der Uracildepletion abnimmt und sich die rDNA zusätzlich zu öffnen beginnt. Die Intensität der unteren Bande nimmt ab und die der oberen zu (Abb. 3-32). In der Profilanalyse der Southernblots ist deutlich zu erkennen, daß Uaf30p und Rrn3p nach der Depletion mit der offenen Chromatinform assoziiert bleiben. Gleiches gilt für die anderen UAF- und CF-Komponenten. Rpa43p und Hmo1p bleiben wie im transkribierten Bereich mit der aktiven rDNA Fraktion verbunden. Auch an der Assoziation der Histone am rDNA Promotor mit beiden rDNA Populationen änderte sich nichts (Daten nicht gezeigt).

Nach der Uracildepletion bleibt die Assoziation der analysierten Faktoren mit einer bestimmten Chromatinform sowohl im transkribierten als auch im Promotorbereich

unverändert. Die geschlossene Chromatinform beginnt sich zu öffnen und geht in die offene Form über (vgl. 4.4., Abb 3-4D).

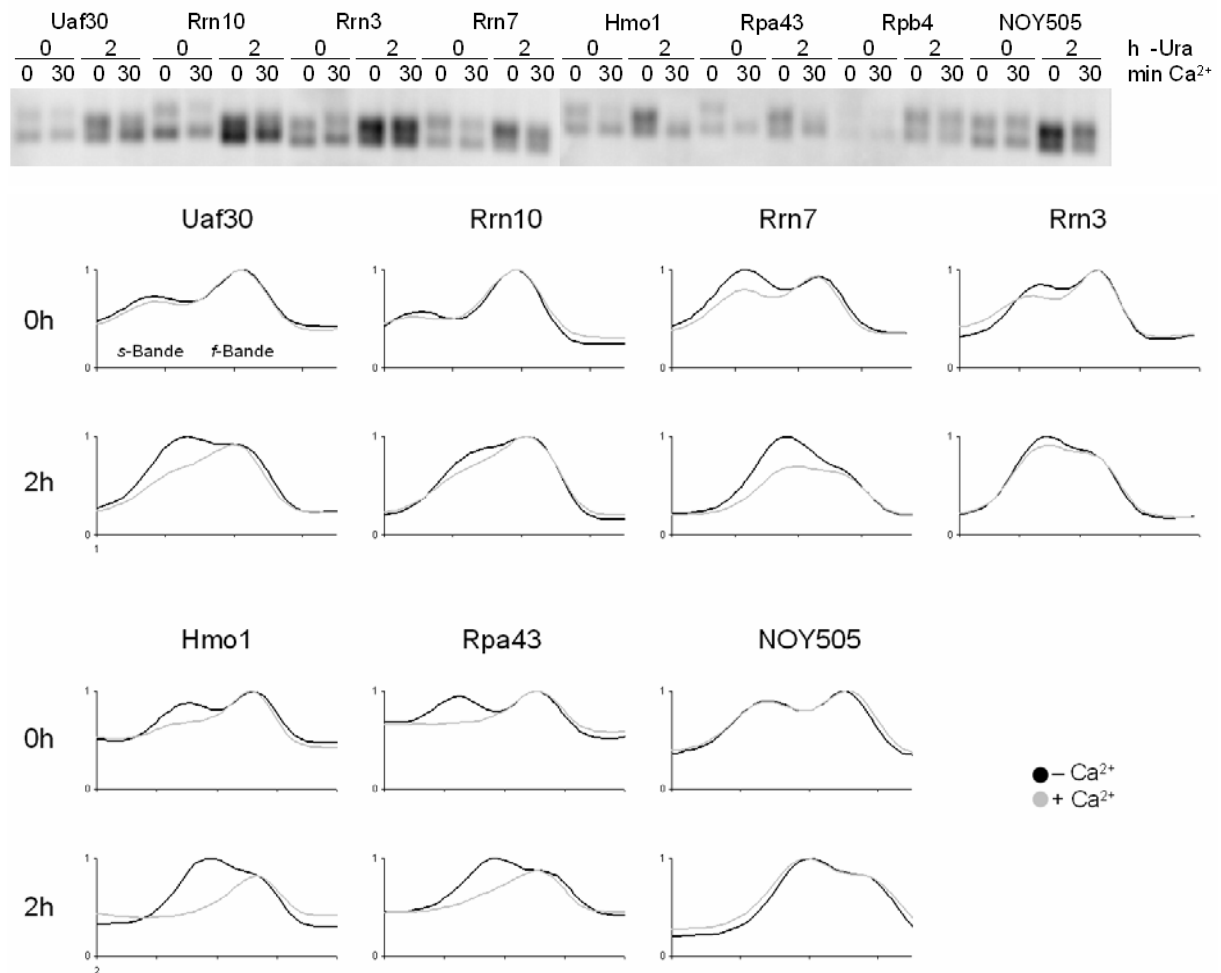


Abb. 3-32: Kombinierte *in vitro* ChEC- und Psoralenvernetzungsanalyse des Promotors der MNase-Fusionsstämme des Stammhintergrundes NOY505 vor (0h) und nach 2h Uracildepletion. Formaldehydvernetzte Nuklei ohne (-) und mit (+) Induktion der MNase durch Ca^{2+} wurden im Anschluß an das ChEC Experiment mit Psoralen inkubiert und die DNA isoliert. Die DNA wurde mit XcmI/ SacII linearisiert, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und im Southernblot mit der XcmI-Promotor-Sonde analysiert, die ein 2kb großes Fragment detektiert (Abb. 3-3). Die Profile der Southernblots zeigen links die stark psoralenvernetzte Bande der offenen Chromatinform (s-Bande) und rechts die schwächer vernetzte Bande der geschlossenen Form (f-Bande). Die Y-Achse repräsentiert dabei die Intensität.

3.7. Nukleosomenpositionierung an der rDNA

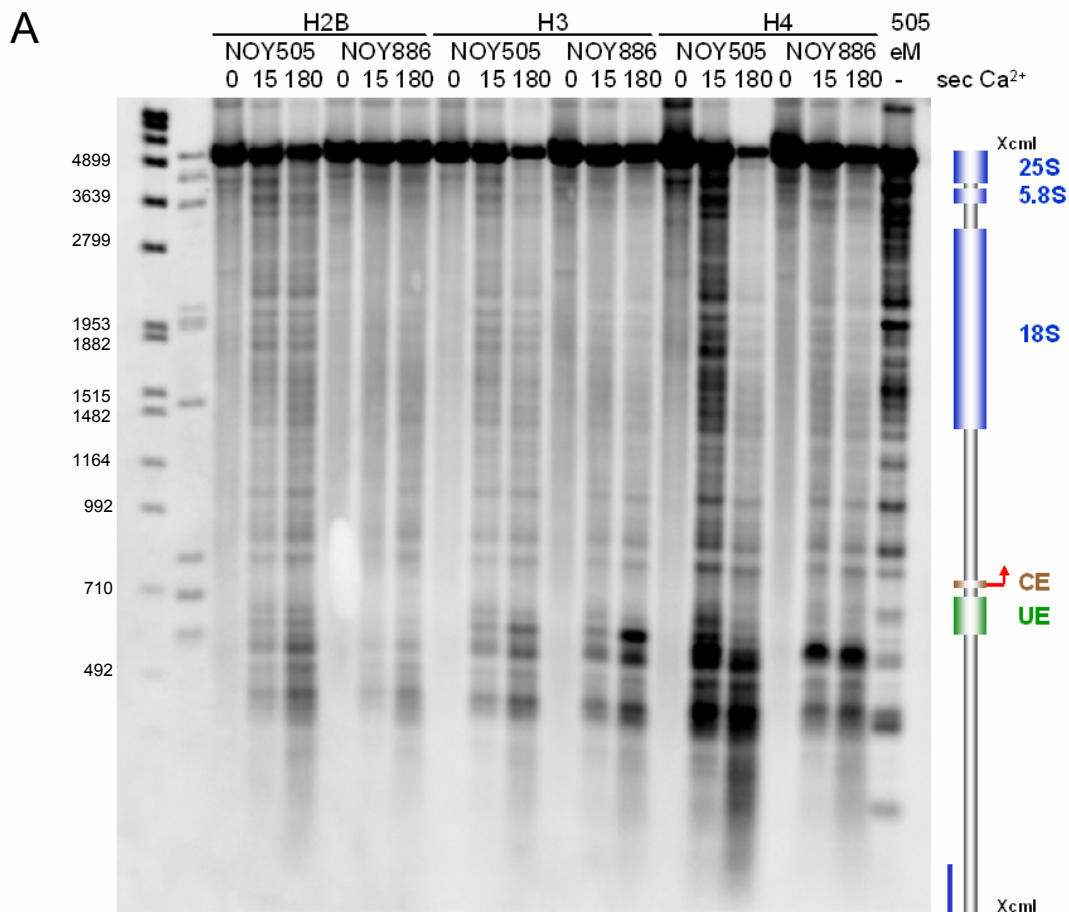
3.7.1. Die aktive rDNA hat eine stark verminderte Nukleosomenokkupanz

Um Herauszufinden, ob die rDNA mit positionierten Nukleosomen besetzt ist, wurden die Histon-MNase-Fusionsstämme von NOY505 und NOY886 (40-Kopienstamm) mittels ChEC-Analyse untersucht. Da NOY886 nur ca. ein Viertel der NOY505 rDNA Kopien besitzt, wurde von NOY886 die vierfache Menge an Nuklei analysiert, um vergleichbare Signalintensitäten in den Southernblotanalysen zu erhalten. Die Assoziationsstellen mit der rDNA sind bei NOY505 für alle drei Histone identisch (Abb. 3-33A, B). Lediglich Histon H3 weist eine zusätzliche Bande im *upstream* Element auf (Abb. 3-33A). Die Schnittmuster der Histon-Fusionsproteine von NOY886 sind ebenfalls identisch und H3 weist den gleichen Schnitt im UE auf wie NOY505. Die MNase-Fusionsproteine der Histone H3 und H4 scheinen die rDNA im Bereich des UE stärker zu schneiden als das von H2B. Dies zeigt sich besonders bei den NOY886 Stämmen. Das H4-MNase-Fusionsprotein von NOY886 scheint im Gegensatz zu NOY505 am UE zusätzlich ein etwas größeres Fragment zu produzieren. Im Promotorbereich weisen NOY505 und NOY886 ähnliche Bandenintensitäten auf. NOY886, dessen rDNA Kopien alle aktiv sind, ist im transkribierten Bereich nahezu frei von Histonen (Abb. 3-33A). Im nicht transkribierten Bereich treten keinerlei Unterschiede zwischen beiden Stämmen auf (Abb. 3-33B). Zur Kontrolle wurden die Nuklei von NOY505 mit exogener MNase verdaut. Der exogene MNase Verdau zeigt das gleiche Muster wie das der Histone der MNase-Fusionsstämme. Es unterscheidet sich von dem der MNase-Fusionsstämme lediglich in der Hypersensitivität einiger Stellen. Eine nukleosomale Leiter, wie sie im folgenden für die GAL-Gene detektiert wurde, konnte für die rDNA nicht festgestellt werden.

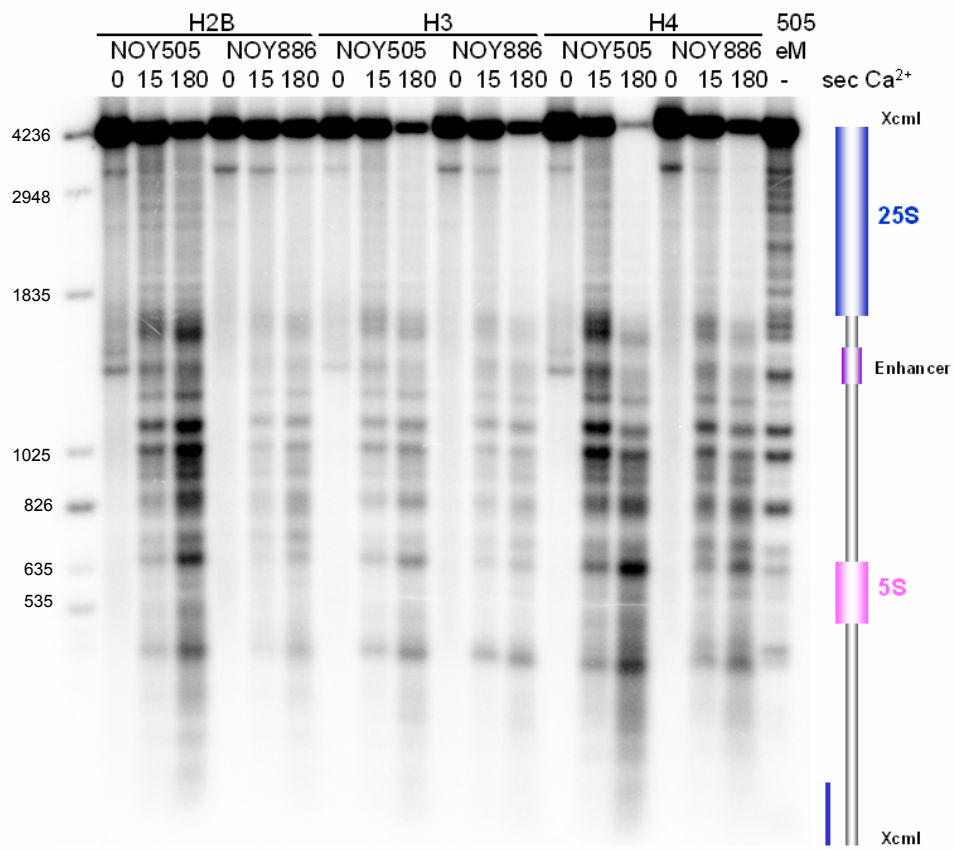
Der Blot wurde mit einer Sonde nachhybridisiert, die die Pol II transkribierten Gene GAL1, GAL10 und GAL7 detektiert, die nach Kultivierung in glucosehaltigem Medium inaktiv und somit nukleosomal sind (Abb. 3-33C). Da in diesem Fall Einzelkopiengene analysiert wurden, deren Signale im Southernblot im Gegensatz zur rDNA ~150 Mal schwächer sind, hätte der Blot zuerst mit der GAL-Sonde hybridisiert werden sollen. Fälschlicherweise wurde er aber zuerst mit der XcmI-5S-Sonde hybridisiert und anschließend mehrmals *gestrippt*. Bereiche, die mit der rDNA-Sonde stark hybridisieren, werden immer noch detektiert und liefern Hintergrundsignale (•, Abb. 3-33C). Alle drei Histone beider Stämme zeigen das gleiche Assoziationsmuster am GAL-Lokus. Während das Vollängen-XcmI-Fragment bei der Hybridisierung des Blots mit den rDNA-Sonden weitgehend erhalten bleibt, verschwindet dieses bei der Hybridisierung mit der GAL-Sonde. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf einen niederen nukleosomalen Besatz am rDNA Lokus. Die Histone weisen ebenfalls die von Schmid et al., 2004 mit dem H2B-MNase-Fusionsstamm detektierte nukleosomale Leiter auf, die durch hypersensitive Schnittstellen (*) gekennzeichnet ist. Die stärkeren Bandenintensitäten von NOY886 sind darauf zurückzuführen, daß die vierfache Gesamtmenge an DNA analysiert wurde. Der exogene MNase Verdau von NOY505 zeigt ebenfalls eine nukleosomale Leiter, die sich jedoch in der Bandenintensität deutlich von dem

der MNase-Fusionsstämme unterscheidet. Hypersensitive Stellen, die sich in ihrer Intensität von den anderen Banden abheben, fehlen ihm gänzlich.

Die beobachteten Ergebnisse legen nahe, daß der codierende Bereich der rDNA bei aktiven Genen nahezu frei von Nukleosomen ist und bei inaktiven Genen mit nicht positionierten Nukleosomen besetzt ist.



B



C

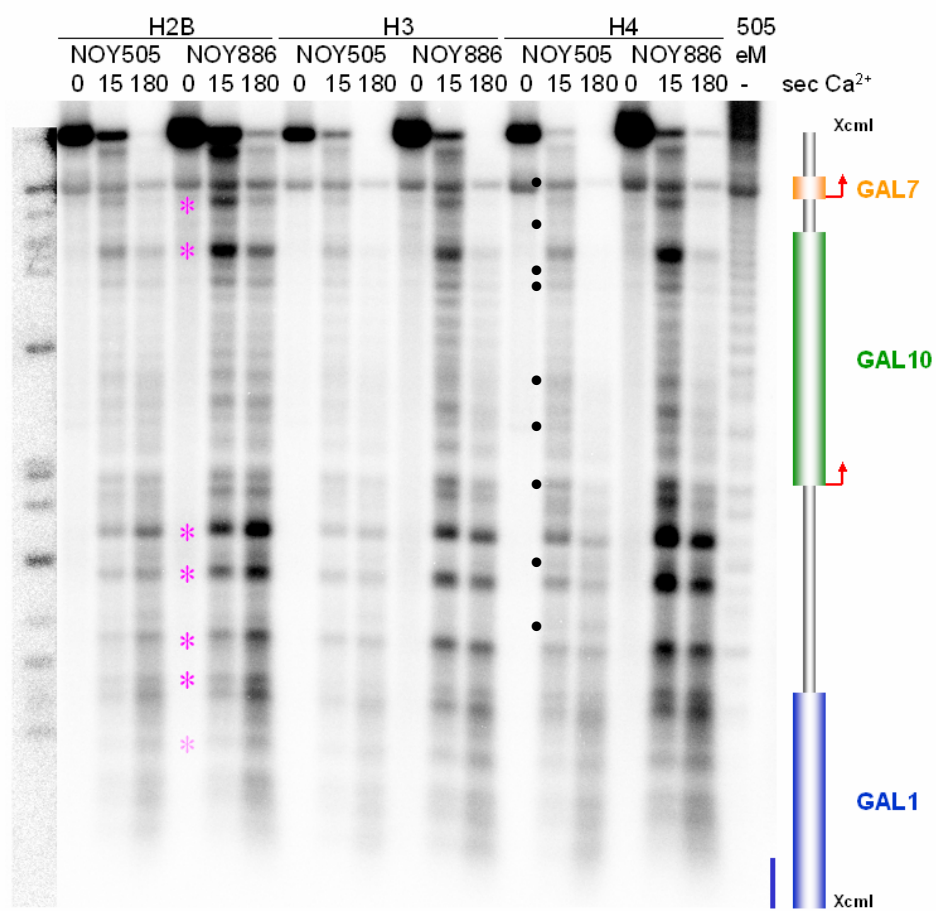


Abb. 3-33: *In vitro* ChEC Analyse der Histonverteilung von MNase-Fusionsstämmen der Stammhintergründe NOY505 und NOY886 an der rDNA und am GAL-Lokus. Die Nuklei formaldehydvernetzter Zellen wurden in Abwesenheit (0min) und Anwesenheit von Ca^{2+} für 30min bei 30°C inkubiert. Die DNA wurde isoliert und mit XcmI linearisiert. Der Gesamtansatz wurde in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und im Southernblot mittels indirekter Endmarkierung analysiert. Autoradiogramme der Analysen (A) des Promotorbereichs und der 18S rDNA mit der XcmI-Promotor-Sonde, (B) der 25S rDNA und des intergenen *Spacers* mit der XcmI-5S-Sonde und (C) des GAL-Lokuses mit der GalI-Sonde. eM: zu NOY505 exogen zugegebene MNase, • Hintergrundsignale der vorhergehenden Hybridisierung mit der XcmI-5S-Sonde.

3.7.2 Nukleosomale Organisation der rDNA in stationären Zellen

Nach dem Erreichen der stationären Phase sollte die Pol I Transkription abgeschaltet sein. Psoralenvernetzungsanalysen von ganzen Zellen und Nuklei stationärer Zellen lieferten unterschiedliche Ergebnisse, was die nukleosomale Organisation der rDNA dieser Zellen betrifft (Dammann et al., 1993; Fahy et al., 2005; Sandmeier et al., 2002). Eine der daraus abgeleiteten Vorstellungen ist, daß die offene in die geschlossene Chromatinform übergeht und sich die rDNA stationärer Zellen nukleosomal zu organisieren beginnt (vgl. auch 1.4.3; (Dammann et al., 1993; Sandmeier et al., 2002). Zur Untersuchung der Chromatinstruktur stationärer Zellen wurden neben einer weiteren Psoralenvernetzungsanalyse ein exogener MNase Verdau und ChEC-Analysen durchgeführt.

Die ganzen Zellen und Nuklei einer logarithmisch wachsenden und einer stationären Kultur des Wildtypstammes NOY505 wurden mit Psoralen vernetzt. Der Wildtypstamm zeigte sowohl für die logarithmisch wachsenden als auch die stationären Zellen wie Nuklei zwei Banden, die der offenen und der geschlossenen Chromatinform entsprechen (Abb. 3-34A). Wie schon in Abb. 3-2 deutlich zu erkennen ist, weisen auch hier die beiden Banden der Nuklei ein langsames Laufverhalten im Gel auf als die der Zellen. Zusätzlich sind die Banden der Nuklei stärker aufgetrennt, was erneut dafür spricht, daß die DNA-Vernetzungseffizienz der Nuklei deutlich höher ist als die ganzer Zellen.

Die Psoralenvernetzungsanalyse dieser Arbeit (Abb. 3-14A) und von (Fahy et al., 2005) deuten darauf hin, daß die offene Chromatinform nukleosomenfrei bleibt. Möglicherweise kommt die Differenz in den Analysen dadurch zustande, daß die Psoralenzugänglichkeit der DNA stationärer Zellen (aufgrund der verdickten Zellwand) im Gegensatz zu den Nuklei deutlich reduziert ist (vgl. 1.4.3, Abb.3-14A; Fahy et al., 2005).

Exogene MNase Verdaue stationärer Zellen zeigten keinerlei Änderungen in den MNase Verdaumustern und lieferten somit ebenfalls keinen Hinweise darauf, daß sich die rDNA in stationären Zellen nukleosomal zu organisieren beginnt (Daten nicht gezeigt).

Zuletzt wurden logarithmisch wachsende und stationäre Zellen der H2B-MNase-Fusionsstämme von NOY886 und NOY505 im Vergleich analysiert. Die Verdaumuster der stationären Zellen zeigen keinerlei Änderungen gegenüber denen der logarithmisch wachsenden Zellen (Abb. 3-34B). Weder bei den stationären Zellen des Wildtypstammes noch bei denen des 40-Kopienstammes konnte nach dem Abschalten der Pol I Transkription die Etablierung eines nukleosomalen Musters beobachtet werden. Lediglich die

Verdaueffizienz der MNase nahm bei den stationären Zellen wider Erwarten ab, als sei die rDNA weniger stark mit H2B assoziiert als zuvor. Bei stationären Zellen ist die Zellwand verdickt, so daß dieses Ergebnis vermutlich darauf zurückzuführen ist, daß die DNA-Vernetzungseffizienz in stationären Zellen mit Formaldehyd deutlich geringer ist als die in logarithmisch wachsenden Zellen. Vermutlich gehen die Histone/ Nukleosomen dadurch bei der Nukleisolierung verloren. Eine alternative Erklärung wäre, daß sich die tatsächlich stationären Zellen der Population aufgrund ihrer Zellwandstärke nicht öffnen lassen und das Ergebnis die Situation nicht-stationärer Zellen widerspiegelt.

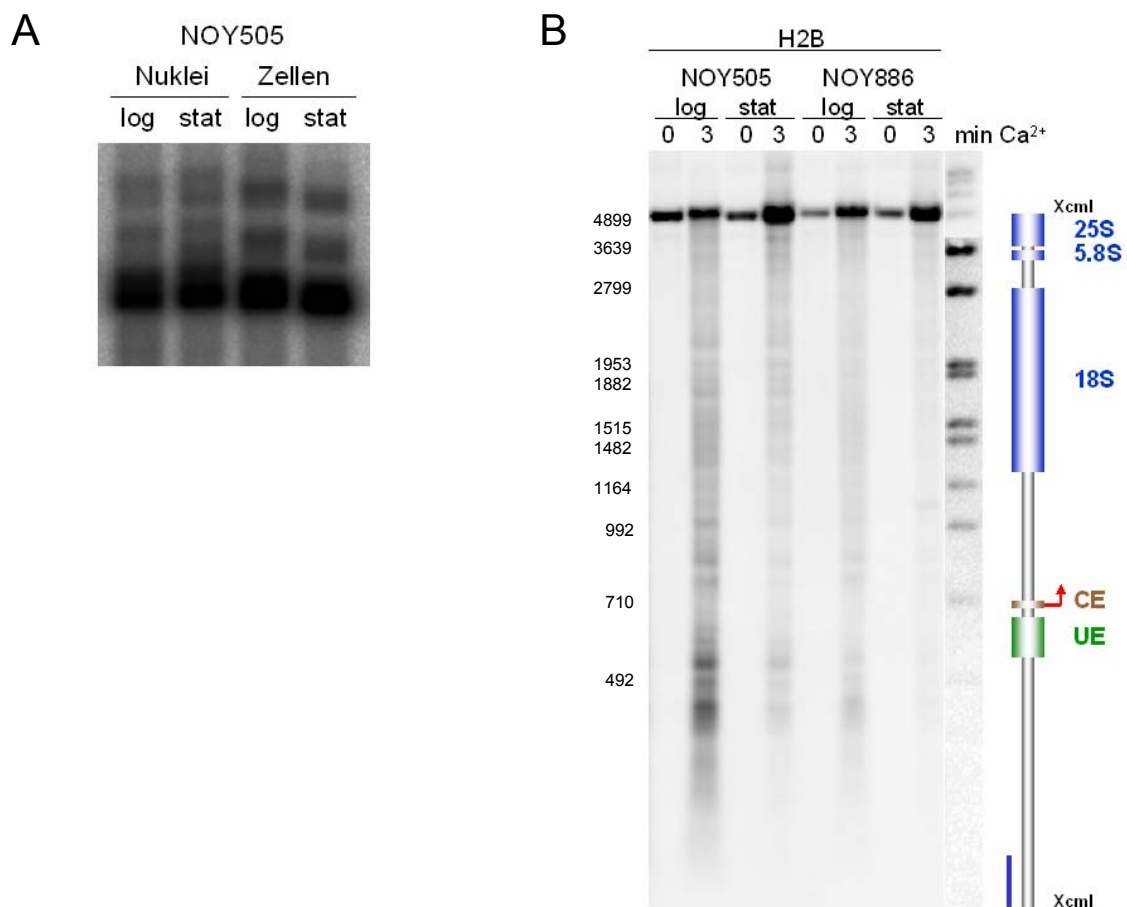


Abb. 3-34: **(A)** Psoralenvernetzungsanalysen von ganzen Zellen und Nuklei (formaldehydvernetzt) des Wildtypstammes NOY505. Ganze Zellen bzw. Nuklei wurden mit Psoralen (+) behandelt. Die DNA wurde isoliert, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit EcoRI linearisiert und im Southernblot mit der 1,9kb-Sonde analysiert (Abb. 3-3). **(B)** *In vitro* ChEC Analyse logarithmisch wachsender und stationärer Zellen der H2B-Fusionsstämme der Stammhintergründe NOY505 und NOY886. Die Nuklei formaldehydvernetzter Zellen wurden in Abwesenheit (0min) und Anwesenheit von Ca²⁺ für 30min bei 30°C inkubiert. Die DNA wurde isoliert und mit XcmI linearisiert. Der Gesamtansatz wurde in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit der XcmI-Promotor-Sonde im Southernblot analysiert.

3.7.3. Nukleosomales *Spacing* am rDNA Lokus

Um Informationen über das nukleosomale *Spacing* am rDNA Lokus zu erhalten, wurden die Nuklei von NOY505 (WT), NOY558 (CF-Mutante) und NOY699 (UAF-Mutante) einem exogenen MNase Verdau unterzogen. Zusätzlich wurden die H2B- und H3-MNase-Fusionsstämme des Wildtypstammes NOY505 nach ¼- und 3-minütigem ChEC analysiert. Die DNA wurde dieses Mal nicht linearisiert im Agarosegel aufgetrennt und im Southernblot mit drei Sonden analysiert, die an den GAL-Lokus (Gal1-Sonde), den rDNA Promotor (UE-Sonde) oder den transkribierten Bereich der rDNA (Psoralen-Sonde) binden (Abb. 3-35).

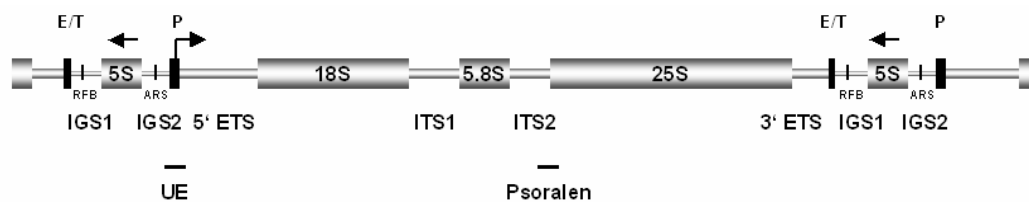


Abb. 3-35: rDNA Lokus. Die Balken repräsentieren die Lage der verwendeten Sonden in der rDNA.

Die Analyse mit der Gal1-Sonde ergab, daß NOY505 und die H2B- und H3-MNase-Fusionsstämme, die in glucosehaltigem Medium kultiviert wurden, am GAL-Lokus ein nukleosomales Muster aufweisen (Abb. 3-36). Die nukleosomale Leiter der beiden MNase-Fusionsstämme weist deutlich niedrigere Bandenintensitäten als NOY505 auf und ist zusätzlich von einem „Schmier“ überlagert. Die Zellen der beiden Mutanten NOY699 und NOY558 wurden in YPG kultiviert, so daß der GAL-Lokus von Pol II aktiv transkribiert wird und die nukleosomale Okkupanz dort deutlich reduziert ist (Lohr, 1984; Lohr and Hopper, 1985). Die DNA ist bei niedrigeren MNase Konzentrationen erwartungsgemäß als „Schmier“ zu sehen und wird mit steigender MNase Konzentration nahezu vollständig verdaut.

Der gleiche Blot wurde mit einer weiteren Sonde (UE-Sonde) hybridisiert, die im Bereich des rDNA Promotors bindet (–206 bis +111). Die ChEC-Verdaue der MNase-Fusionsstämme zeigen, daß die DNA des GAL-Lokuses durch die Histon-MNase-Fusionsproteine deutlich stärker verdaut wird als die des rDNA Lokuses. Dies könnte einerseits darauf zurückzuführen sein, daß der rDNA Lokus im Vergleich zum GAL-Lokus schwächer mit Nukleosomen assoziiert ist. Andererseits könnte dies auch auf unterschiedliche Einbaueffizienzen der Histon-MNase-Fusionsproteine in nukleäres bzw. nukleoläres Chromatin hindeuten.

Für den Wildtypstamm NOY505, dessen rDNA jeweils zur Hälfte aktiv und inaktiv ist, wäre bei exogener MNase Zugabe im Falle von positionierten Nukleosomen ein „Schmier“ für die aktive nukleosomenfreie und eine darüber gelagerte nukleosomale Leiter für die inaktive Population zu erwarten gewesen. Bei nicht linearisierter DNA werden von der Sonde sowohl die Sequenzen stromauf- als auch stromabwärts ihrer Bindestelle detektiert, wodurch die Interpretation der Muster zusätzlich erschwert wird. Die UE-Sonde liefert somit ein überlagertes Muster der kodierenden und der ingergen Sequenzen. Für die Histon-MNase-Fusionsstämme von NOY505 wäre hingegen nur eine nukleosomale Leiter für die inaktive

Population zu erwarten gewesen. Nicht positionierte Nukleosomen resultieren beim exogenen wie endogenen MNase Verdau ebenfalls in einem „Schmier“. Für die MNase-Fusionsstämme kann lediglich der „Schmier“ nicht positionierter Nukleosomen detektiert werden. Dieser wird hingegen bei NOY505 von einem Bandenmuster überlagert, das jedoch keiner nukleosomalen Leiter wie am GAL-Lokus entspricht. Die CF-Mutante NOY558, deren Pol I Transkription der rDNA komplett abgeschaltet ist, weist eine nukleosomale Leiter auf, deren Abstände im unteren Bereich des Blots kleiner sind als die von NOY505 am GAL-Lokus. Alle Banden von NOY558 können auch bei NOY505 detektiert werden. NOY699, die zum PSW befähigte UAF-Mutante weist im Vergleich zu NOY558 am rDNA Lokus eine niedrigere Verdaueffizienz als am GAL-Lokus auf. Das Verdauemuster der UAF-Mutante zeigt ein regelmäßiges Schnittmuster, welches jedoch weder mit dem von NOY505 am GAL-Lokus noch mit dem des Wildtypstammes oder dem der CF-Mutante am rDNA Lokus korreliert (s. Linien). Jones et al., 2007 haben gezeigt, daß die Fragmente am Promotor aufgrund ihrer Größe nicht nukleosomaler Herkunft sein können und wahrscheinlich auf stabile Pol I Transkriptionsinitiationskomplexe zurückzuführen sind. Die Fragmentgrößen im unteren Bereich des Blots hängen somit bei Verwendung der UE-Sonde von der Größe des durch UAF und CF oder durch alternative Proteine (mutanter Stammhintergründe) geschützten Bereichs ab. Dadurch kommt es im oberen Bereich des Blots zu Verschiebungen der Schnittmuster, so daß diese nicht mit dem des Wildtypstammes NOY505 am GAL-Lokus korrelieren.

Der Blot wurde mit einer dritten Sonde (Psoralen-Sonde) hybridisiert, die im transkribierten Bereich an die rDNA bindet. Da die Psoralen-Sonde sowohl die chromosomale rDNA als auch die 35S rDNA des Pol II transkribierten Helferplasmids detektiert (vgl. 3.2.), sind die MNase Verdaue der UAF- und CF-Mutanten bei Verwendung dieser Sonde nicht interpretierbar. Für die aktive nukleosomenfreie Population von NOY505 wäre bei exogener MNase Zugabe ein „Schmier“ mit einer darüber gelagerten nukleosomalen Leiter für die inaktive Fraktion zu erwarten gewesen. Für die Histon-MNase-Fusionsstämme wäre hingegen nur eine nukleosomale Leiter zu erwarten gewesen. Im Falle von unpositionierten Nukleosomen wäre sowohl beim exogenen als auch endogenen MNase Verdau nur ein „Schmier“ zu erwarten gewesen. NOY505 weist diesen „Schmier“ auf, der im unteren Drittel des Blots von vier klaren Banden überlagert wird, die auf der gleichen Höhe wandern wie die des GAL-Lokuses. Im mittleren Bereich des Blots steigt die Anzahl der Schnittereignisse deutlich an, die Abstände zwischen den Banden nehmen stark ab, bzw. können im oberen Drittel des Gels nicht mehr voneinander unterschieden werden. Eine nukleosomale Leiter wie am GAL-Lokus ist auch im transkribierten Bereich der rDNA nicht detektierbar. Bei den Histon-MNase-Fusionsstämmen dominiert der „Schmier“, der von einem Schnittmuster überlagert wird, dessen Fragmente ein größeres nukleosomales *Spacing* aufweisen als die nukleosomalen Leitern des GAL- und rDNA-Lokuses. Das Schnittmuster des H2B-MNase-Fusionsstammes ist deutlich stärker ausgeprägt als das des H3-MNase-Fusionsstammes.

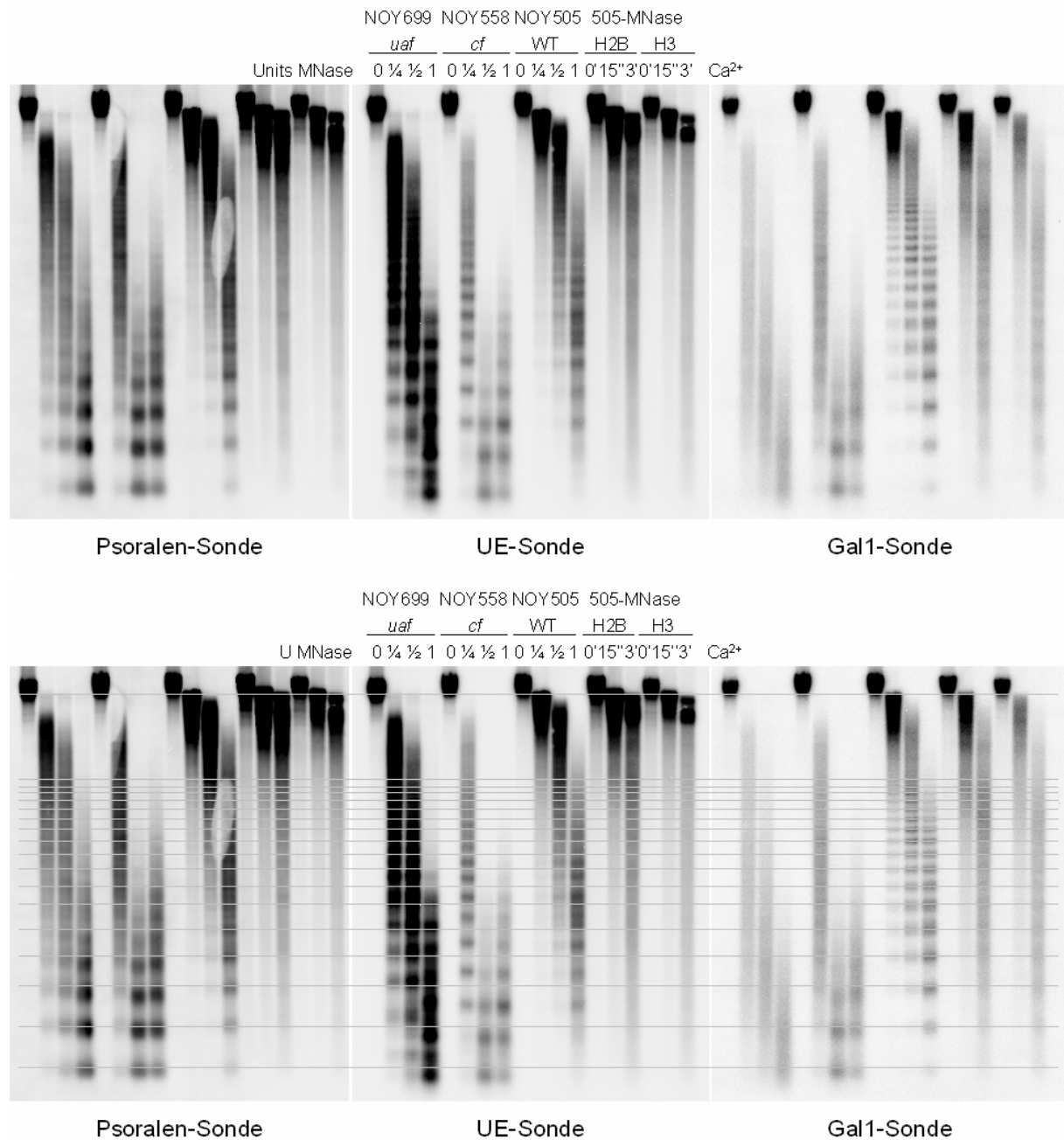


Abb. 3-36: Exogener MNase Verdau der Nuklei der Stämme NOY505, NOY558 und NOY669 und *in vitro* ChEC-Analyse der H2B- und H3-MNase-Fusionsstämme des Stammhintergrundes NOY505. Die Nuklei wurden für 20min bei 37°C mit der angegebenen MNase-Konzentration verdaut. Die Nuklei der MNase-Fusionsstämme wurden in Abwesenheit (0min) und Anwesenheit von Ca²⁺ für 15s bzw. 3min bei 30°C inkubiert. Die DNA wurde isoliert, der Gesamtansatz in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit den angegebenen Sonden im Southernblot analysiert.

Des weiteren wurde YCC95 vor (24°C) und nach dem Abschalten der Pol I Transkriptionsinitiation durch Temperaturerhöhung auf 37°C analysiert. Die Zellen wurden wie unter 3.2.2. beschrieben in YPD kultiviert und die Nuklei isoliert und mit exogener MNase verdaut. Die DNA wurde wie im vorherigen Versuch ebenfalls nicht linearisiert im Agarosegel aufgetrennt und im Southernblot analysiert (Abb. 3-37). Mit der Gal1-Sonde wies die Rrn3p-ts-Mutante am inaktiven GAL-Lokus sowohl bei 24°C als auch bei 37°C die gleiche nukleosomale Leiter wie der logarithmisch wachsende Wildtyp NOY505 auf. Als nächstes wurde der Blot mit einer Sonde (Psoralen-Sonde) hybridisiert, die an den transkribierten Bereich der rDNA bindet. Die Verdauemuster von NOY505 und der bei 24°C kultivierten ts-Mutante unterscheiden sich nicht. Beide Stämme weisen keine nukleosomale Leiter, wie am GAL-Lokus auf, sondern einen von einem Bandenmuster überlagerten „Schmier“. Nach der Temperaturerhöhung nimmt die Intensität der Banden zu und die des „Schmiers“ ab, was ein Hinweis darauf ist, daß sich die rDNA nach dem Abschalten der Transkription nukleosomal zu organisieren beginnt. Mit der Sonde, die an den rDNA Promotor bindet (UE-Sonde), kann ebenfalls keine nukleosomale Leiter wie am GAL-Lokus detektiert werden. Die Banden, von NOY505 und der bei 24°C kultivierten ts-Mutante weisen das gleiche Muster auf, das von einem „Schmier“ begleitet wird. Die bei 37°C kultivierte Rrn3p-ts-Mutante weist mit dieser Sonde im unteren Bereich des Blots lediglich einen „Schmier“ auf. Dies könnte ein Hinweis auf konformationelle und/oder kompositionelle Umorganisationen am rDNA Promotor sein, da sich die Protektion der rDNA offensichtlich ändert. Die mit dieser Sonde detektierten Fragmente enthalten wie oben beschrieben immer den von UAF und CF geschützten Bereich, der wahrscheinlich nicht nukleosomal ist (Jones et al., 2007).

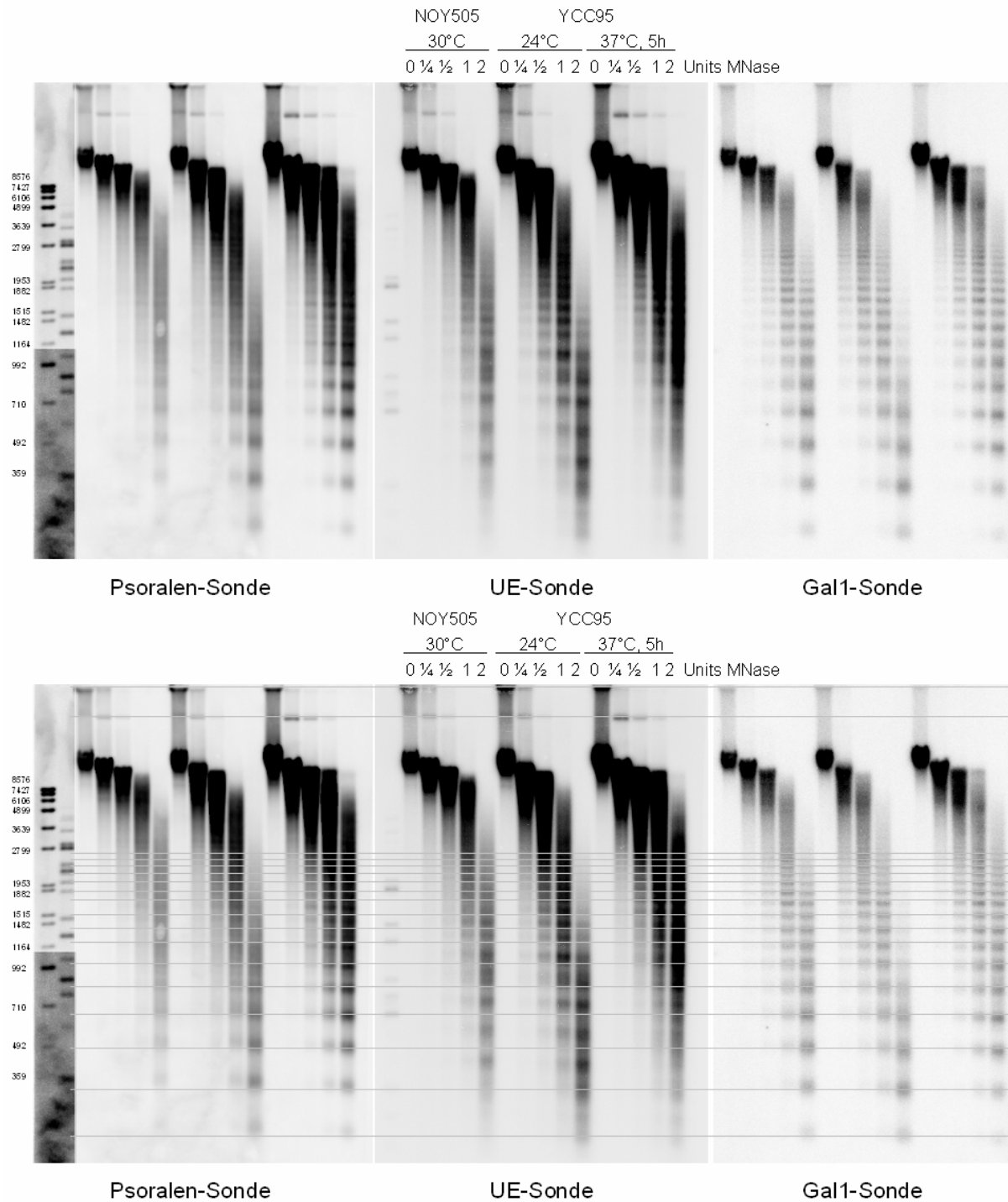


Abb. 3-37: Exogener MNase Verdau der Nuklei der Stämme NOY505 und YCC95 vor (24°C) und nach Temperaturerhöhung auf 37°C. Die Nuklei wurden für 20min bei 37°C mit der angegebenen MNase-Konzentration verdaut. Die DNA wurde isoliert, der Gesamtansatz in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit den angegebenen Sonden im Southernblot analysiert.

3.8. Die rDNA des Plasmids pKM6 des Stammes YKM1 besitzt eine alternative Chromatinstruktur

In logarithmisch wachsenden Hefezellen liegt etwa die Hälfte der ~150 rRNA Gene in offener Chromatinform vor und wird von Pol I transkribiert. Die rDNA des Stammes YKM1 ist chromosomal deletiert. YKM1 ist durch das Multikopienplasmid pKM6 (Abb. 3-38), das eine rDNA Kopie unter dem Wildtyppromotor trägt und von Pol I transkribiert wird, lebensfähig. Die 35S rDNA von pKM6 wird von einem RS-LexA- (vor dem Promotor) und einem RS-Element flankiert, die die Rekombination der beiden RS-

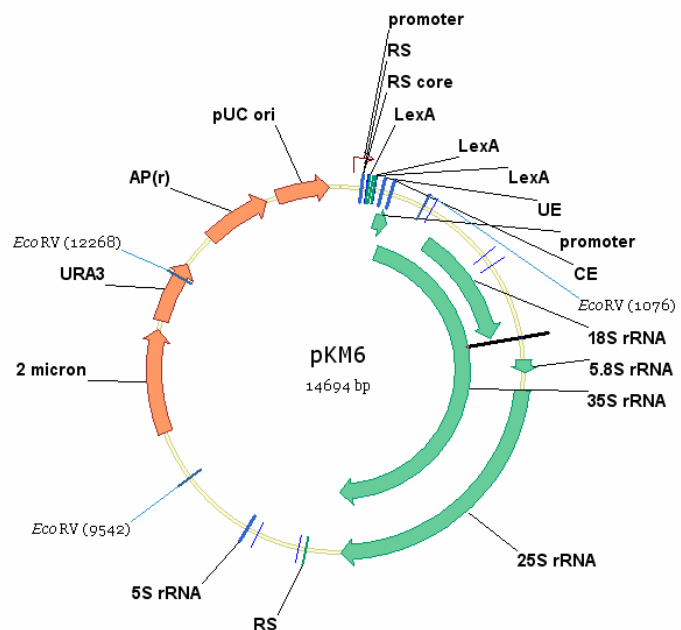


Abb. 3-38: Plasmid pKM6 des Stammes YKM1. Die 35S rDNA wird von einem RS-LexA- und einem RS-Element flankiert.

die ringförmige 35S rDNA über das LexA-Element aufgereinigt und isoliert werden (Griesenbeck et al., 2003). Um Herauszufinden, ob sich die Chromatinstruktur der rDNA ändert, wenn diese in der Zelle ektopisch außerhalb des Chromosoms von der RNA Polymerase I abgeschrieben wird, wurden die Fusionsstämme zunächst anhand einer ChEC- und Psoralenanalyse untersucht.

Das Ergebnis der ChEC-Analyse von Uaf30p, Hmo1p und den Pol I Untereinheiten A43 ist in Abb. 3-39A dargestellt. Uaf30p, das beim Wildtypstamm NOY505, bei dem jeweils die Hälfte der rDNA Kopien aktiv und inaktiv ist, und bei NOY886, dem konstitutiv aktiven Stamm, zwei Mal im *upstream* Element schnitt (vgl. Abb. 3-4, 31), schneidet die rDNA des Plasmids pKM6 nur einfach. Die Schnittmuster von Hmo1p und den Pol I Untereinheiten A43, A49 und A190 (Daten für A49 und A190 nicht gezeigt) sind wie bei NOY505 identisch. Allerdings sind Hmo1p und die Pol I Untereinheiten mit dem Plasmidhintergrund von pKM6 assoziiert und scheinen dort stärker zu binden als an die rDNA des Plasmids. Die Bandenintensitäten im Promotorbereich sind deutlich schwächer als die von Uaf30p. Die DNA von YKM1 (ohne MNase) weist bis auf eine hypersensitive Schnittstelle im RS-Element, die auf intrazelluläre endogene Nukleasen zurückzuführen ist, keinerlei Schnitte auf. Die Schnittmuster der Histone H2B, H3 und H4 sind vollkommen identisch (Abb. 3-39B). Die Histone sind mit dem gesamten Bereich, der analysiert wurde, assoziiert, wobei sie im Plasmidhintergrund vom pKM6 keinerlei nukleosomale Struktur aufweisen. Während das *upstream* Element von NOY505 nur einen einzigen Schnitt von Histon H3 aufwies und von

den beiden anderen Histonen gar nicht geschnitten wurde, weisen alle drei Histone von YKM1 Schnitte im UE auf. Die Chromatinstruktur des rDNA-Promotors des Plasmids pKM6 unterscheidet sich also vollkommen von der des Wildtypstammes NOY505. In der Psoralenanalyse wiesen alle Stämme lediglich die untere Bande der geschlossenen Chromatinform auf (Daten nicht gezeigt), obwohl Rpa43p mit pKM6 assoziiert ist. Dies ist ein zusätzlicher Hinweis auf eine alternative Chromatinstruktur der Plasmid-rDNA.

Die Chromatinkomposition- und Struktur der episomalen rDNA unterscheidet sich von den chromosomalen rDNA Kopien eines Wildtypstammes.

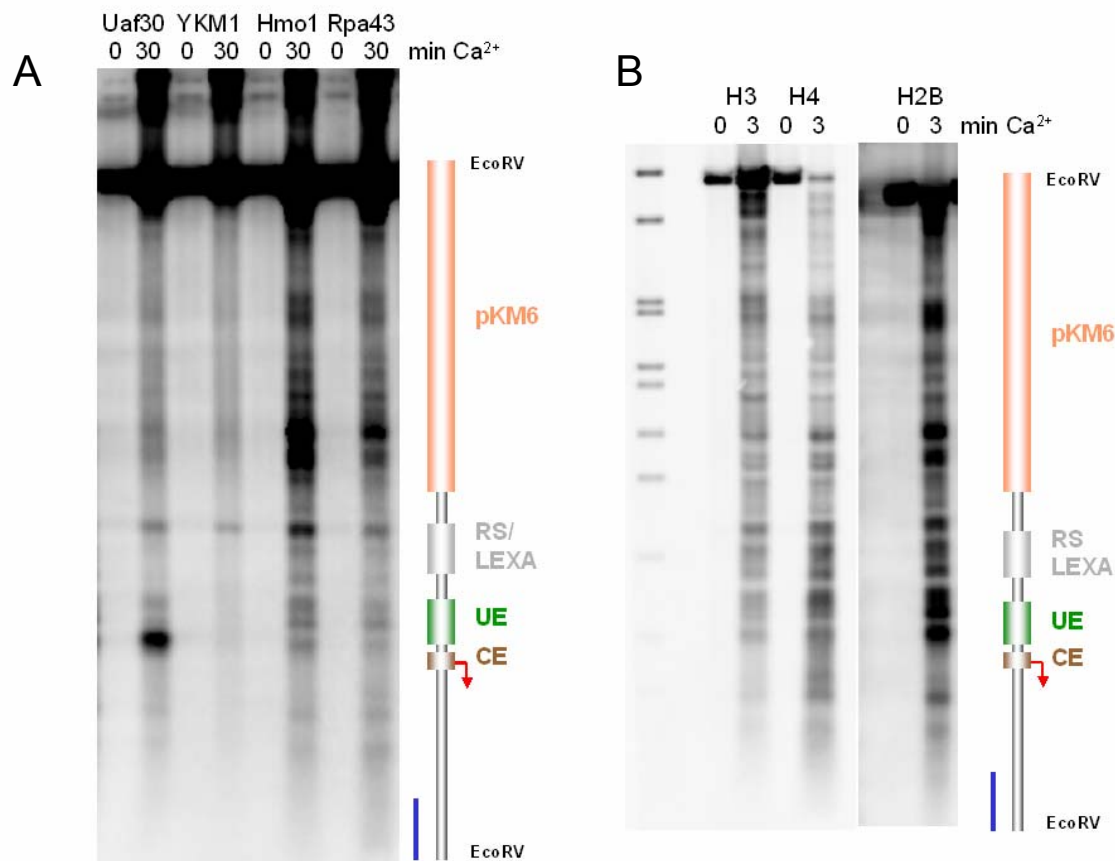


Abb. 3-39: *In vitro* ChEC Analyse der MNase-Fusionsstämmes des Stammhintergrundes YKM1. Die Nuklei formaldehydvernetzter Zellen wurden in Abwesenheit (0min) und Anwesenheit von Ca²⁺ für 3min (Histone) bzw. 30min bei 30°C inkubiert. Die DNA wurde isoliert und mit EcoRV linearisiert. Von den 0min Ansätzen der Histon H3- und H4-MNase-Fusionsstämmes wurde 1/10, von den restlichen Proben der Gesamtansatz in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit der Promotor-Sonde im Southernblot analysiert (Abb. 3-3). Assoziationsstellen (A) der Transkriptionsfaktoren Uaf30p und Hmo1p, sowie der Pol I und (B) der Histone mit pKM6. Als Kontrolle diente YKM1 (ohne MNase).

4. Diskussion

4.1. Organisation der rDNA

4.1.1. Ist die DNA des *upstream* Elements um UAF gewunden?

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Komposition und Struktur des ribosomalen Chromatins in Abhängigkeit von der transkriptionellen Aktivität *in vivo* zu untersuchen. Neben klassischen Methoden wie der Psoralenvernetzung und Endonukleaseverdauen kam ChEC (*chromatin endogenous cleavage*) zum Einsatz (Schmid et al., 2004). Zur Untersuchung der Dynamik von Assoziations- und Dissoziationsereignissen an der rDNA wurde eine Kollektion von Hefestämmen mit Fusionsproteinen bekannter rDNA-Bindeproteine etabliert. Die MNase-Fusionsstämme zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten wie ihr korrespondierender Wildtypstamm und wiesen in etwa die gleiche Anzahl an rDNA Kopien auf. Auch bei der Psoralenvernetzungsanalyse, einem Indikator der charakteristischen Chromatinzustände der rDNA, zeigten sie im Vergleich mit dem jeweiligen Hintergrundstamm keine Auffälligkeiten.

Die Assoziationsstellen DNA-bindender Proteine an der rDNA wurden mittels *in vitro* ChEC lokalisiert. Durch die Kombination der ChEC- und der Psoralenvernetzungsanalyse war es erstmals möglich, die Chromatinform/en zu bestimmen, mit der einzelne Faktoren assoziiert sind. Da bei der kombinierten Analyse jedoch keine Standardisierung mit einem Einzelkopiengen erfolgte, kann anhand der Gelprofile (Kap. 3.1.3., 3.3.2., 3.4.2., 3.6.3.) keine Aussage über absolute Werte getroffen werden. Das Verhältnis von offenen zu geschlossenen rDNA Kopien gibt jedoch Auskunft darüber, mit welcher Chromatinform ein Faktor präferentiell assoziiert ist und ob er beispielsweise nach dem Abschalten der Transkription mit dieser assoziiert bleibt.

Die Bindung des RNA Polymerase I Transkriptionskomplexes an den rDNA Promotor ist in Abb. 1-3 modellhaft dargestellt. Die beobachteten Ergebnisse der ChEC-Analysen dieser Arbeit legen nahe, daß sich durch die Bindung von UAF und CF am Promotor eine Überstruktur ausbildet. Anhand der Schnittereignisse, die im folgenden diskutiert werden, wurde ein Modell erstellt, bei dem sich die DNA des *upstream* Elements einmal um den UAF-Komplex windet, was weiterhin als „UAF-Schleife“ bezeichnet wird (Abb. 4-1).

UAF Die UAF-Komponenten Rrn10p und Uaf30p sind mit dem *upstream* Element des rDNA Promotors assoziiert und binden präferentiell an die offene Chromatinform (Abb. 3-4, 8). Beide Fusionsproteine schneiden das UE doppelt, wobei die Schnitte von Uaf30p die von Rrn10p flankieren. Die Histone H3 und H4, wurden ebenfalls als Bestandteile des UAFs beschrieben (Keener et al., 1997). Im Promotorbereich sind sie sowohl mit der offenen als auch der geschlossenen Chromatinform assoziiert, im transkribierten Bereich assoziieren sie mit der geschlossenen Form (Abb. 3-8). Das MNase-Fusionsprotein von Histon H3 schneidet das *upstream* Element im 5' Bereich ein Mal (Abb. 3-4). Die Lokalisierung der

Schnittereignisse verschiedener Experimente ergab, daß der Schnitt im vorderen Drittel des *upstream* Elements variiert und nicht immer an der selben Stelle erfolgt. Histon H4 wies hingegen keinerlei Schnitte im Promotorbereich auf. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, daß es in UAF so komplexiert ist, daß die Entfernung zur DNA zu groß ist, um sie schneiden zu können (Abb. 4-1). Die MNase-Fusionsproteine der Histone H3, H4 und H2B schneiden die rDNA zusätzlich stromaufwärts des Promotors. Der Abstand zwischen den ersten beiden Schnitten beträgt $\leq 100\text{bp}$, was für ein Nukleosom ($\sim 140\text{bp}$) deutlich zu klein ist. Durch das aufgestellte Modell (Abb. 4-1) sind die Schnitte nicht erklärbar, da die Entfernung der UAF-Histone zur DNA einerseits zu groß wäre, um sie schneiden zu können. Andererseits stellte sich die Frage nach der Herkunft der Schnitte des H2Bs, welches kein Bestandteil des UAFs ist. Neben einer einfachen Windung der DNA um UAF wäre auch die Ausbildung einer mehrfach gewundenen helikalen Struktur denkbar. Möglicherweise ließen sich die Schnitte der Histone dadurch erklären. Eine plausiblere Erklärung wird in Kapitel 4.1.2. diskutiert.

CF Rrn7p, eine Untereinheit des *core* Faktors ist präferentiell mit der offenen Chromatinform assoziiert und weist keine Schnitte im Bereich des *core Elements* auf, sondern schneidet stromauf- und stromabwärts des *upstream* Elements mit einem Abstand von $\sim 188\text{bp}$. Dieses Ergebnis legt nahe, daß die Promotor-DNA bei aktiver Pol I Transkription nicht linear sein kann. Die DNA der UAF-Schleife könnte an der Ein- und Austrittsstelle der rDNA von Rrn7p stabilisiert werden. Einen Hinweis darauf liefert die temperatursensitive Mutante YCC95, bei der die rRNA-Synthese nach der Temperaturerhöhung auf 37°C nahezu abgeschaltet wird. Rrn7p ist nach der Temperaturerhöhung nicht mehr präferentiell mit der offenen Chromatinform (bzw. was von ihr noch übrig ist) assoziiert (Abb. 3-21), weist aber bei der ChEC-Analyse das typische Schnittmuster auf (Abb. 3-18). Dies deutet darauf hin, daß Rrn7p nach der Temperaturerhöhung mit beiden Chromatinformen gleichermaßen assoziiert ist. Die Schnittintensität stromaufwärts des UEs nimmt jedoch im Vergleich zu der stromabwärts stark ab. Rrn7p könnte eine stabilisierende Funktion bei der Ausbildung der UAF-Schleife einnehmen.

TBP verbindet den UAF- mit dem CF-Komplex und schnitt die Promotor-DNA zwischen dem UE und CE (Maria Hondele, unveröffentlichte Daten).

Hmo1p, Pol I und Rrn3p Die rDNA von *S. cerevisiae* wird unter normalen Bedingungen ausschließlich von der RNA Polymerase I transkribiert. Die Pol II Untereinheit Rpb4p zeigte keinerlei Assoziation mit der rDNA von Wildtypstämmen. Pol I (Rpa43p, -49p und -190p) ist mit der offenen Chromatinform assoziiert und konnte am gesamten transkribierten Bereich der rDNA bis hin zum Terminator lokalisiert werden. Hmo1p ist ebenfalls mit der offenen Chromatinform assoziiert und wies stets das gleiche Schnittmuster auf wie die Polymerase. Gadai et al., 2002 identifizierten Hmo1p als einen Pol I Faktor, der mit der A49-Untereinheit synergistisch interagiert. Des weiteren wurde für Hmo1p beschrieben, daß es mit der gesamten 35S rDNA assoziiert sei (Hall et al., 2006), was durch die ChEC-Analyse bestätigt wurde.

Rrn3p, das mit der A43-Untereinheit der Pol I einen initiationskompetenten Komplex bildet (Milkereit and Tschochner, 1998), ist ebenfalls mit der offenen Chromatinform assoziiert.

Rrn3p, das nicht an die DNA bindet, wies bei den ChEC-Analysen die schwächsten Schnittintensitäten auf. Für das Schneiden der DNA durch das MNase-Fusionsprotein ist somit eine transiente Bindung an die DNA ausreichend. Rrn3p, Hmo1p sowie die Pol I Untereinheiten schnitten das UE ebenfalls doppelt. Die Schnitte lagen jeweils eng zusammen und befanden sich in unmittelbarer Nähe derer von Rrn10p (Abb. 4-1). Bei der dargestellten Anordnung der Faktoren könnten alle beschriebenen Schnittereignisse erfolgen. Rpa43p und Hmo1p wiesen stromaufwärts des Promotors zusätzliche Assoziationsstellen auf. Diese sind wie die der Histone mit dem dargestellten Modell jedoch nicht erklärbar, könnten möglicherweise aber auch durch eine mehrfach gewundene helikale Struktur des Promotorbereichs zustande kommen. Eine plausible Erklärung liefert auch hier Kapitel 4.1.2.

Die Grundlage für dieses UAF-Schleifen-Modell bildet die Annahme, daß sich die beobachteten Mehrfachschnitte des jeweiligen Fusionsproteins an ein und demselben DNA Molekül ereignen. Sollte jedoch beispielsweise einer der Schnitte präferentiell an offenen Genen und der andere bevorzugt an geschlossenen erfolgen, wäre das Modell hinfällig. Anhand des ChECs alleine kann dies nicht unterschieden werden. Im Labor wird zur Zeit versucht, eine Methode zu etablieren, die es ermöglicht, einzelne Genpopulationen voneinander zu unterscheiden.

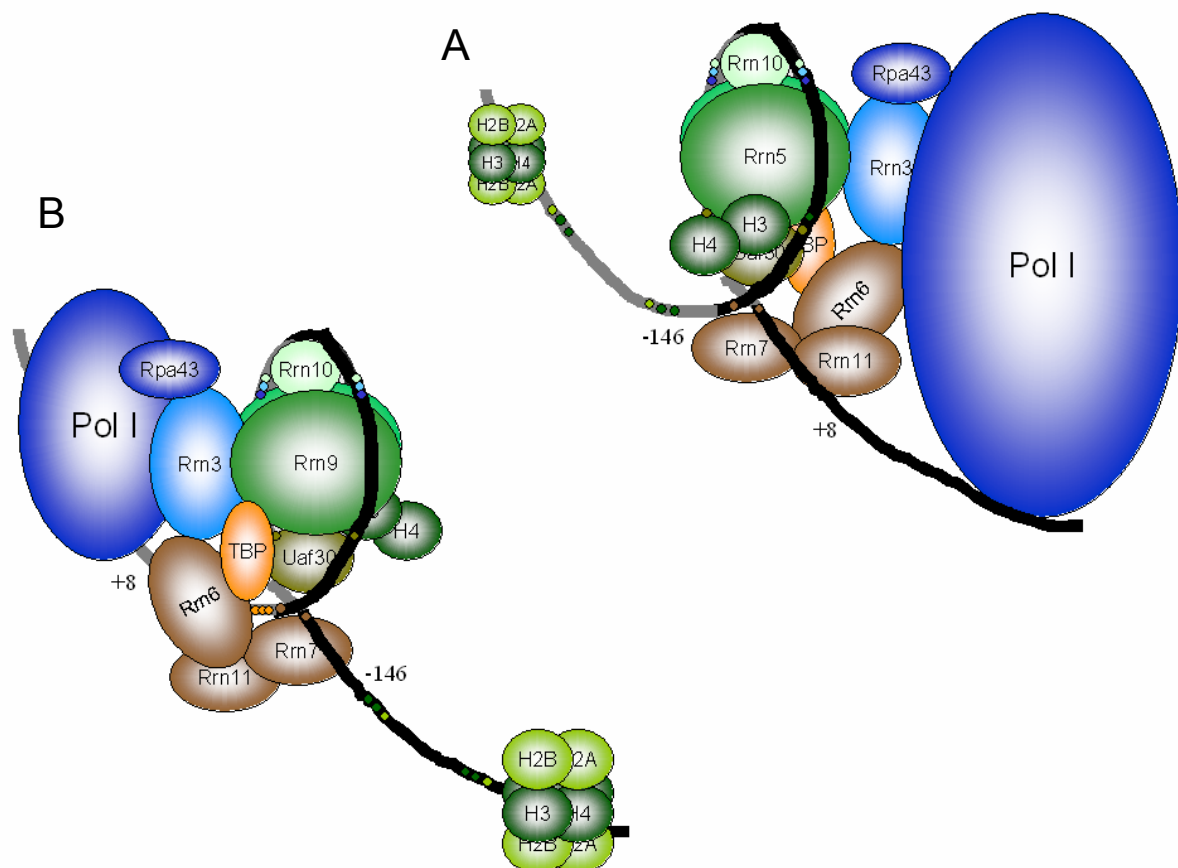


Abb. 4-1: Modell der UAF-Schleife. Die DNA des *upstream* Elements windet sich einmal um den UAF-Komplex, wodurch die Schnittereignisse des *upstream* Elements erklärbar sind. Modell aus Sicht der (A) Promotorrichtung und (B) der IGS2-Richtung. Die räumliche Anordnung kann hier nur zweidimensional

dargestellt werden. DNA, die sich räumlich weiter vorne befindet ist in schwarz und DNA, die sich weiter hinten befindet in grau dargestellt. Die an der rDNA auftretenden Schnittereignisse (kleine runde Kreise) sind in der Farbe des jeweiligen Proteins dargestellt, von dem sie stammen.

4.1.2. Existiert der „Ribomotor“?

Die ChEC-Analysen ergaben weiterhin, daß die UAF- und CF-Komponenten neben dem Promotor zusätzlich mit dem Enhancer assoziiert sind, nicht jedoch mit dem transkribierten Bereich der rDNA. Sie wiesen über weite Bereiche des Enhancers Schnittereignisse auf.

Kempers-Veenstra et al., 1986 postulierten das Modell des „Ribomotors“, welches die Vorstellung vertritt, daß jede rDNA Einheit die Form einer Schleife (*loop*) annimmt, so daß der Promotor und das Terminator/Enhancer-Element der gleichen, sowie der benachbarten Transkriptionseinheit in unmittelbare Nähe gebracht werden. Terminierende Pol I Moleküle könnten somit direkt vom Terminator/Enhancer-Element auf den Promotor der gleichen oder der proximal stromabwärts gelegenen Transkriptionseinheit übergehen, ohne zuvor in den freien *Pool* überzutreten. Die Nähe von Enhancer und Promotor könnte durch Reb1p vermittelt werden, das sowohl an den Enhancer als auch ca. 215bp stromaufwärts der 35S rDNA Transkriptionsstartstelle bindet (Kulkens et al., 1992; Morrow et al., 1989; Oakes et al., 2006b; Planta, 1997; Wai et al., 2001).

Die Daten der ChEC-Analysen dieser Arbeit unterstützen die Hypothese des „Ribomotors“. Die an den Promotor gebundenen Muliproteinkomplexe UAF und CF könnten durch eine solche Schleife in die Nähe des Enhancers gelangen und dessen DNA schneiden. Die Analyse von Rrn3p zeigte, daß eine transiente Bindung der Faktoren für das Schneiden der DNA durch die MNase ausreichend ist. Da sich die Schnittereignisse über den gesamten Enhancerbereich erstrecken, erfolgt vermutlich keine lokalisierte Bindung der Transkriptionskomplexe an den Enhancer. Die MNase-Fusionsproteine der UAF-Komponenten Rrn10p und Uaf30p des konstitutiv aktiven Stammes NOY886 schneiden am Enhancer nicht. Einerseits könnte dies darauf hindeuten, daß UAF nur mit den Enhancern inaktiver Gene interagiert. Andererseits fehlt dem Stamm NOY886 Fob1p, das die Rekombination der rDNA Kopien beeinflußt (Kobayashi and Horiuchi, 1996) und vom Enhancer zur Steigerung der Transkription benötigt wird (Wai et al., 2001). Vermutlich ist Fob1p für die Interaktionen von Promotoren und Enhancern erforderlich.

Terminierende Polymerasen (assoziiert mit Hmo1p) oder vom Enhancer auf den Promotor übertretende Polymerasen würden in die Nähe des Promotors gelangen, so daß sowohl die MNase-Fusionsproteine von Pol I als auch Hmo1p die DNA stromaufwärts des UEs schneiden könnten. Die intergenen *Spacer* sind sowohl bei aktiven als auch inaktiven rDNA Kopien nukleosomal (Dammann et al., 1995; Vogelauer et al., 1998). Infolge der Ausbildung von DNA-Überstrukturen könnten die Schnitte der Histon-Fusionsproteine (H2B, H3 und H4) stromaufwärts des Promotors durch die Nukleosomen der intergenen *Spacer* vermittelt

werden (Abb. 4-2). Die „Reichweite“ der nukleosomalen Fusionsproteine könnte durch die Schleifenbildung und/oder potentielle Biegungen der DNA ausgedehnt werden.

Neben dem Modell des „Ribomotors“ gibt es für die Schnittereignisse der Histon-Fusionsproteine stromaufwärts des UEs (Abb. 4-2, roter Punkt) eine weitere Erklärung. Möglicherweise ist Nukleosom eins des intergenen *Spacers* nicht so strikt positioniert, wie angenommen wird (Vogelauer et al., 1998). Die ChEC-Analysen könnten das überlagerte Muster verschieden positionierter Nukleosomen repräsentieren, da einzelne Gene in der Southernanalyse nicht voneinander unterscheidbar sind (vgl. 4.1.1.). Dadurch wären Abstände <140bp zwischen den Schnittereignissen erklärbar.

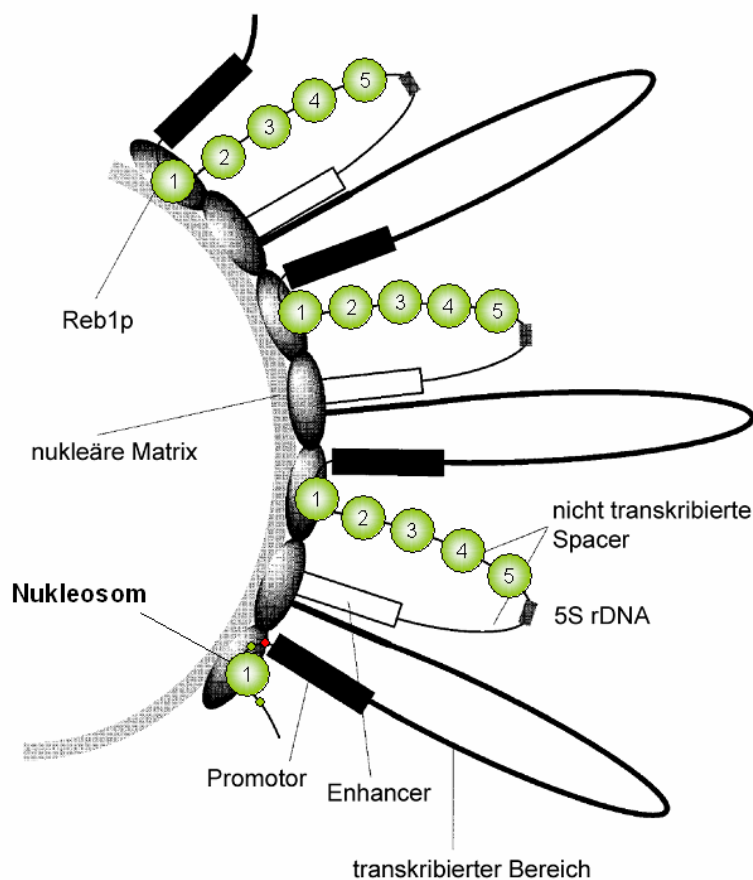


Abb. 4-2: Looping-Modell der Enhancer vermittelten Regulation der Pol I Transkription. Die großen Schleifen (dicke schwarze Linien) stellen die Pol I Operons dar, die kleineren Schleifen repräsentieren die intergenen *Spacer*, die die 5S rRNA Gene enthalten. Die Promotor (schwarze Kästen) und Enhancer (weiße Kästen) werden durch oligomerisiertes Reb1p, das entweder direkt oder indirekt an die nukleoläre Matrix gebunden ist, in unmittelbare Nachbarschaft gebracht. Die intergenen Spacer sind mit fünf positionierten Nukleosomen besetzt (grüne Kreise). Durch die Überstrukturen kann die „Reichweite“ der Fusionsproteine der Nukleosomen ausgeweitet werden, so daß zusätzliche Schnittereignisse (rot) auftreten können. Verändert nach Planta, 1997.

4.2. Dynamik von Assoziations- und Dissoziationsereignissen an der rDNA

Die Dynamik von Assoziations- und Dissoziationsereignissen rDNA-bindender Faktoren wurde mittels ChEC in Abhängigkeit von der transkriptionellen Aktivität in verschiedenen Systemen untersucht. Die Pol I Transkription wurde im Wildtypstamm NOY505 durch Nährstoffentzug (Rapamycinbehandlung, Aminosäuredepletion) und bei der temperatursensitiven Rrn3p-Mutante YCC95 durch Temperaturerhöhung abgeschaltet.

4.2.1. Rrn3p ist nach Nährstoffentzug kaum noch mit der rDNA assoziiert

Der TOR (*target of rapamycin*) Kinase Signaltransduktionsweg ist ein wichtiger Signaltransduktionsweg für die Modulation der rRNA, der ribosomalen Proteine und der 5S rRNA als Reaktion auf die Verfügbarkeit von Nährstoffen. TOR wird durch Rapamycin inaktiviert, wobei der Effekt eines Nährstoffmangels imitiert wird (Crespo and Hall, 2002). Die TOR Inaktivierung ist eine Möglichkeit zum Abschalten der Pol I Transkription, indem die Bildung des Rrn3p-Pol I Initiationskomplexes verhindert wird. Das Verhältnis von offener zu geschlossener Chromatinform ändert sich dabei nicht (Claypool et al., 2004). Die kombinierte ChEC- und Psoralenanalyse bestätigte, daß sich nach Nährstoffentzug (Rapamycinbehandlung und Aminosäureentzug) das Verhältnis der beiden Chromatinformen nicht ändert und die offene Form erhalten bleibt (Abb. 3-25, 26).

Nach einer zweistündigen Rapamycinbehandlung bzw. Aminosäuredepletion wurde die Assoziation von Rrn3p mit dem rDNA Promotor auf ein Minimum reduziert (Abb. 3-23, 24). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von ChIP-Experimenten, bei denen die Assoziation von Rrn3p mit dem Promotor nach Rapamycinbehandlung auf 30% sank (Claypool et al., 2004; Anja Philippi, unveröffentlichte Daten).

Die Assoziation der Transkriptionsfaktorkomplexe UAF und CF, der RNA Polymerase I und Hmo1p sowie der Histone mit der rDNA wurde durch den Nährstoffentzug nicht beeinträchtigt. Sie blieben mit der gleichen Chromatinform assoziiert und lieferten die gleichen ChEC-Muster wie vor dem Entzug. Claypool et al., 2004 fanden hingegen heraus, daß die Bildung des Initiationskomplexes aus Rrn3p und Pol I nach Rapamycinbehandlung um 50-62% und die Polymerasedichte an der rDNA um ca. 64% sank. Die ChEC-Analyse ermöglicht es zwar eine qualitative Aussage über die Assoziation von Faktoren treffen zu können, ermöglicht jedoch keine quantitative Analyse. Versuche zur Quantifizierung der ChEC-Analysen mittels qPCR werden zur Zeit im Labor durchgeführt. Ziel ist es, die Okkupanz der rDNA mit einzelnen Faktoren an bestimmten Stellen zu ermitteln.

Puls-labeling Experimente zeigten, daß die Gesamt-RNA-Syntheserate nach einstündiger Rapamycinbehandlung um 90% reduziert wurde (Claypool et al., 2004), was nicht mit der Reduktion der gebildeten Initiationskomplexe korreliert (s.o.). Die rRNA-Synthese bleibt vermutlich auch nach zweistündiger Rapamycinbehandlung (bzw. Aminosäuredepletion) auf einem basalen Grundlevel erhalten, so daß zwar die Assoziation von Rrn3p mit dem rDNA

Promotor bei der ChEC-Analyse auf ein Minimum reduziert wird (schwache Schnitte beim ChEC), die Initiation jedoch noch immer erfolgt und Pol I mit der rDNA assoziiert bleibt (keine sichtbare Veränderung in der Schnittintensität beim ChEC). Alternativ wäre es möglich, daß arretierte, in der Elongation inhibierte Pol I Moleküle an die rDNA gebunden bleiben, bis sie ein „positives“ Signal zum Fortsetzen der Transkription erhalten. Um diese Hypothese zu überprüfen, werden zur Zeit Versuche im Labor durchgeführt.

4.2.2. Die Pol I Transkription wird auch auf Ebene der Elongation reguliert

Es zeigte sich, daß die Assoziation der Transkriptionsfaktoren UAF und CF, sowie Rrn3p mit der rDNA und der offenen Chromatinform nach der Depletion von Uracil unverändert blieb (Abb. 3-30, 32). Die ChEC-Analysen der MNase-Fusionsstämme von Pol I und Hmo1p zeichneten sich durch besonders hohe Schnittintensitäten stromabwärts des Transkriptionsstartpunktes im Bereich des 3' extern transkribierten *Spacers* und dem Beginn der 18S rDNA, sowie am Terminator aus (Abb. 3-30). Ein mögliches Szenarium, das diese Beobachtungen erklären könnte, wäre das folgende: Die für die Initiation benötigten Faktoren sind funktional und in ausreichender Menge vorhanden. Die Synthese der rRNA erfolgt nach der Uracildepletion so lange, bis das vorhandene Uracil der Zelle aufgebraucht ist (dies müßte anhand von *Puls-labeling* Experimenten überprüft werden). Aufgrund des nun herrschenden Nukleotidmangels kann die Elongation nicht fortgesetzt werden, so daß es zum Stillstand der RNA Polymerase I und Hmo1p kommt. Terminierende Polymerasen und Hmo1p, akkumulieren am Terminator, da sie durch den Rückstau der Polymerasen am Promotor nicht vom Enhancer auf diesen übertreten können (unter Vorraussetzung der Existenz des „Ribomotors“; vgl. auch 4.1.2.).

Die beobachteten Ergebnisse legen nahe, daß die Pol I Transkription der rDNA in *S. cerevisiae* auch auf Ebene der Elongation reguliert wird, wie es bei höheren Eukaryoten der Fall ist (Moss et al., 2006; Stefanovsky et al., 2006a; Stefanovsky et al., 2006b). Bisher gab es für eine solche Regulation in der Hefe nur sehr wenige Hinweise (Bouchoux et al., 2004; Fath et al., 2004; Schneider et al., 2006; Tongaonkar et al., 2005). Im Labor werden zur Zeit Experimente durchgeführt, die zur Klärung der Frage, ob es tatsächlich zum Stillstand der Polymerasen kommt, beitragen sollen.

4.2.3. Bindung von CF ist nicht zyklisch

Nach der Temperaturerhöhung auf 37°C kann der Stamm YCC95 kein funktionales Rrn3p mehr synthetisieren, so daß der initiationskompetente Komplex aus Rrn3p und Pol I nicht mehr gebildet werden kann. Durch das Fehlen einer funktionalen Polymerase wird die Transkription nahezu eingestellt (der Gesamt-RNA-Gehalt beträgt nach 2h Temperaturerhöhung ~5-10%; Juliane Merl) und die offene Chromatinform geht fast vollständig in die geschlossene über. Uaf30p und Rrn7p waren nach der Temperaturerhöhung

nicht mehr präferentiell mit der aktiven Fraktion (bzw. dem Rest davon) assoziiert. Die ChEC-Analyse zeigte hingegen, daß die MNase-Fusionsproteine beider Faktoren noch immer am Promotor schnitten, wobei die Schnittintensität von Rrn7p stromaufwärts des UEs abnahm. Dies führte zur Schlußfolgerung, daß die Ausbildung der UAF-Schleife möglicherweise durch die Bindung von Rrn7p stromaufwärts des UEs stabilisiert werden könnte (s. 4.1.1.). Diese Bindung wird offensichtlich wiederum durch eine funktionale Polymerase stabilisiert. Dies ist mit den aus Endonukleaseverdauen gewonnenen Daten von Bordi et al., 2001 konsistent.

Die Ergebnisse der ChEC-Analyse zeigten, daß sowohl UAF (Uaf30p) als auch CF (Rrn7p) nach dem Abschalten der Pol I Transkriptionsinitiation durch Temperaturerhöhung mit dem rDNA Promotor assoziiert bleiben. Dies spricht gegen die Hypothese von Aprikian et al., 2001, daß die Bindung von CF zyklisch sei und CF nach der Transkriptionsinitiation vom Promotor dissoziiere. Die Resultate legen vielmehr nahe, daß sowohl UAF als auch CF während des gesamten Transkriptionszykluses stabil an den rDNA Promotor gebunden bleiben.

4.2.4. Ist Hmo1p ein funktionelles Homolog zu UBF?

Nach Rapamycinbehandlung wird die RNA-Synthese von *S. cerevisiae* auf ein Minimum reduziert (Claypool et al., 2004). Hmo1p ist ein mit der RNA Polymerase I synergistisch interagierender Faktor (Gadal et al., 2002), der mit der gesamten rDNA assoziiert ist und auch an die Promotoren vieler ribosomaler Proteine bindet (Hall et al., 2006). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß Hmo1p sowohl mit der rDNA als auch dem Promotor des ribosomalen Proteins RPA23A nach dem Abschalten der Pol I Transkription durch Rapamycinbehandlung assoziiert bleibt (Pol I ist ebenfalls noch mit der rDNA assoziiert). Im Gegensatz dazu bindet Hmo1p bei der CF- und den UAF-Deletionsmutanten, deren chromosomale Pol I Transkription der rDNA vollständig abgeschaltet ist, nicht an die rDNA (keine Assoziation der Pol I mit der rDNA). Der Promotor des Pol II transkribierten Gens RPA23A dieser Mutanten ist hingegen mit Hmo1p assoziiert. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die Rekrutierung von Hmo1p an die rDNA über Pol I erfolgt, wie auch Hall et al., 2006 vermuten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen weiterhin, daß die Assoziation von Hmo1p im Stamm YCC95 nach dem Abschalten der Transkriptionsinitiation durch Temperaturerhöhung mit der rDNA abnimmt. Hmo1p bleibt jedoch mit der offenen Chromatinform assoziiert. Pol I hingegen dissoziiert von der rDNA. Die beobachteten Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß sich Hmo1p, das wahrscheinlich über Pol I an die rDNA rekrutiert wird, von der elongierenden Polymerase löst und an die rDNA bindet und auch nach dem Dissoziieren der Polymerase an diese gebunden bleibt. Möglicherweise ist Hmo1p tatsächlich ein funktionales Homolog von UBF (Gadal et al., 2002), das die rDNA höherer Eukaryoten für elongierende Polymerasen passierbar macht (Stefanovsky et al., 2006a; Stefanovsky et al., 2006b).

Der HMO1-Deletionsstamm, der sowohl die offene als auch die geschlossene Chromatinform aufweist (Abb. 3-12), zeigt, daß Hmo1p für die Ausbildung der Chromatinstruktur entbehrlich ist. Nach der Temperaturerhöhung bleibt Hmo1p bei der Rrn3p-ts-Mutante im Gegensatz zu Rpa43p mit der rDNA assoziiert. Gleichzeitig nimmt die Psoralenzugänglichkeit der rDNA ab. Hmo1p ist somit alleine nicht ausreichend, um die „volle“ Psoralenzugänglichkeit der rDNA zu erhalten. Offensichtlich wird dafür eine effizient elongierende RNA Polymerase I an der rDNA benötigt.

4.3. UAF ist für die Chromatinstruktur am rDNA Locus verantwortlich

Die Chromatinstruktur der rDNA wurde anhand exogener MNase Verdaue und Psoralenvernetzungsanalysen untersucht. Dabei ergab sich für den Wildtypstamm NOY505, ein charakteristisches MNase Verdaumuster, welches ein überlagertes Muster aus offener und geschlossener Chromatinform repräsentiert. Deletionen von Transkriptionsfaktoren (Hmo1p) oder das Abschalten der Pol I Transkriptionsinitiation durch Temperaturerhöhung bei temperatursensitiven Mutanten (Rpa43p, Rrn3p), Aminosäureentzug (NOY505, NOY886) oder das Erreichen der stationären Phase führten zu keinerlei Änderungen in den MNase Verdaumustern.

In UAF- und CF-Mutanten ist die Pol I Transkription vollkommen abgeschaltet. Es zeigte sich, daß die Deletion von UAF, CF oder beiden Komplexen zur Ausbildung alternativer Chromatinstrukturen am rDNA Locus führte. Die Psoralenanalyse ergab zusätzlich, daß diese Stämme nur die geschlossene Chromatinform aufweisen.

Die Deletion von CF (*rrn7Δ*, NOY558) resultierte am rDNA Locus in einer Struktur, die der inaktiver Pol II transkribierter Gene ähnlich ist (z.B. *GALI-10*; Abb. 3-10, 33C). Diese sind mit positionierten Nukleosomen besetzt, die in regelmäßigen Abständen angeordnet sind (Lohr, 1984; Lohr and Hopper, 1985).

Deletionen von UAF (*rrn5Δ*, NOY699; *rrn9Δ* NOY703) führten hingegen zu einer alternativen Chromatinstruktur am rDNA Locus (Abb. 3-10). Die Verdaumuster beider UAF-Stämme waren identisch und zeichneten sich bei der Analyse mittels indirekter Endmarkierung im Vergleich zum Verdaumuster des Wildtypstammes NOY505 und der CF-Mutante durch Bandenverschiebungen aus. Die nukleosomalen Abstände waren im Gegensatz zur CF-Mutante nicht regelmäßig. Die Ausbildung einer alternativen Chromatinstruktur war auch bei der Psoralenvernetzungsanalyse sichtbar (Abb. 3-12).

Anhand der exogenen MNase Verdaue läßt sich jedoch keine endgültige Aussage über die Nukleosomenpositionierung am rDNA Locus treffen, da Nukleaseverdaue immer in ihrer Aussagekraft limitiert sind. Durch sie ist es nicht möglich, die Faktoren zu unterscheiden, die zum Schutz der DNA vor Nukleasen beitragen. Jones et al., 2007 haben gezeigt, daß die Fragmente am rDNA Promotor aufgrund ihrer Größe nicht nukleosomaler Herkunft sein können und wahrscheinlich auf stabile Pol I Transkriptionsinitiationskomplexe

zurückzuführen sind. Über die tatsächliche Nukleosomenpositionierung am rDNA Lokus und deren *Spacing* können nur ChEC-Analysen von Histon-Fusionsproteinstämmen der UAF- und CF-Deletionsmutanten Aufschlüsse liefern. Dies war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, da die Konstruktion dieser Fusionsstämmen trotz mehrmaliger Versuche nicht gelang.

UAF-Deletionen führen normalerweise zum Polymerase *switch* von Pol I zu Pol II. Da sowohl beide UAF-Mutanten (NOY699, NOY703) als auch die UAF/CF-Doppelmutante (YKM41) das gleiche MNase Verdauemuster aufweisen, die chromosomale rDNA von NOY703 aber nicht wie bei NOY699 oder der UAF/CF-Doppelmutante von Pol II transkribiert wird, ist die Ausbildung der alternativen Chromatinstruktur dieser Stämme am rDNA Lokus auf die Deletion bzw. das Nichtbinden von UAF zurückzuführen und sowohl von CF als auch der Pol II Transkription unabhängig.

Die Psoralenanalyse der temperatursensitiven Rrn3p-Mutante YCC95 zeigte, daß sich die rDNA dieses Stammes nach dem Abschalten der Pol I Transkriptionsinitiation durch Temperaturerhöhung nahezu vollständig schließt. Dies deutet sich beim MNase Verdau vage dadurch an, daß der „Schmier“, der die offene Chromatinform repräsentiert, abnimmt und die Intensität der Banden, die die Nukleosomen repräsentieren, zunimmt. Diese Änderungen waren jedoch nicht so signifikant wie die der Psoralenanalyse. Die ChEC-Analyse ergab, daß die Rrn3p-ts-Mutante bei 24°C zwar größtenteils von Pol I aber in geringem Maße auch von Pol II transkribiert wird (Abb. 3-19). Beide Stämme weisen das gleiche MNase Verdauemuster (indirekte Endmarkierung) wie der Wildtypstamm NOY505 auf. Dies stärkt die Hypothese, daß die Chromatinstruktur des rDNA Lokuses nicht durch die Pol II Transkription beeinflusst wird, sondern ausschließlich von der An- oder Abwesenheit von UAF abhängt.

Es wurde beschrieben, daß ausschließlich UAF-Deletionen zum PSW führen und Mutationen der Pol I oder anderer Transkriptionsfaktoren, wie CF oder Sir2p, nicht eigenständig zur rDNA Transkription durch Pol II führen können (Oakes et al., 1999). Die rDNA der Rrn3p-ts-Mutante YCC95, die keine UAF-Deletion aufweist, wird jedoch im Gegensatz zum Wildtypstamm NOY505 bei 24°C von Pol II transkribiert und der chromosomale rDNA Lokus ist mit ~300 rDNA Kopien ebenfalls expandiert. Die Resultate dieser Arbeit zeigen, daß neben einer Deletion von UAF auch Mutationen in Rrn3p einen Polymerase *switch* hervorrufen können.

4.4. Die Psoralenzugänglichkeit der rDNA hängt von der Polymerasepräsenz ab

Lange Zeit wurde darüber diskutiert, ob die Transkription durch die Anzahl aktiver rRNA Gene oder die Transkriptionsrate aktiver rRNA Gene reguliert würde. Bisher wurde davon ausgegangen, daß die Regulation der Transkription über die Transkriptionsrate erfolgt und von der Anzahl der offenen Gene unabhängig ist. Folgendes spricht für diese Hypothese: 1. Beim Eintritt der Hefezellen in die stationäre Phase sinkt die Pol I Transkription der rRNA Gene drastisch, wobei die Anzahl der aktiven rRNA Gene nahezu konstant bleibt (Conconi, 2005; Dammann et al., 1993; Fahy et al., 2005; Sandmeier et al., 2002; Abb. 3-34). 2. Das Abschalten der Pol I Transkription durch Nährstoffentzug, wie nach Rapamycinbehandlung (Claypool et al., 2004) oder Aminosäuredepletion, ändert am Verhältnis von offenen zu geschlossenen rRNA Genen nichts (Abb. 3-25, 26). 3. Die Anzahl der offenen Gene des Stammes Gpy11-6, dessen Pol I Untereinheit A43 chromosomal deletiert ist und von einem Plasmid (mit einer Mutation in Rpa43p) unter dem Wildtyppromotor transkribiert wird, bleibt nach dem Abschalten der Pol I Transkriptionsinitiation durch Temperaturerhöhung unverändert (Abb.3-14). 4. Auch die Deletion von Hmo1p (Y06969) führt zu keiner Veränderung in der Anzahl der offenen Gene. 5. Beim konstitutiv aktiven Stamm NOY886 (~42 rDNA Kopien) wird die rRNA Synthese durch das Anpassen der Polymerasedichte an die aktiven Gene reguliert. Die Anzahl der Polymerasen pro Gen ist bei ihm doppelt so hoch wie in einem Wildtypstamm (French et al., 2003). Die Psoralenanalysen dieser Arbeit bestätigten, daß nahezu alle rDNA Kopien dieses Stammes in der offenen Chromatinform vorliegen (Abb. 3-27).

Weitere Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch auch, daß die Anzahl der aktiven rRNA Gene nicht immer konstant, sondern variabel ist: 1. Die rDNA beginnt sich nach der Uracildepletion zu öffnen (Abb. 3-30, 31, 32). 2. Mit zunehmender Inaktivierung der Pol I Transkriptionsinitiation der Rrn3p-ts-Mutante durch Temperaturerhöhung nimmt die Psoralenzugänglichkeit der offenen Chromatinform ab, so daß sich die *s*-Bande der *f*-Bande stark annähert (Abb. 3-16, 20, 21). 3. Die rDNA der CF- und UAF-Mutanten, bei denen die Pol I Transkription vollständig abgeschaltet ist, liegt in der geschlossenen Chromatinform vor (Abb. 3-12).

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, daß die Transkription nicht über die Anzahl der offenen psoralenzugänglichen Gene reguliert wird. Sie zeigen, daß die Psoralenzugänglichkeit der rDNA mit der Präsenz von RNA Polymerase I (in Unabhängigkeit von der transkriptionellen Aktivität) korreliert. In Anwesenheit von Pol I liegt die offene psoralenzugängliche Chromatinform vor, in Abwesenheit die unzugängliche geschlossene. Der Psoraleneinbau ist jedoch nicht zur Polymerasedichte an der rDNA proportional. Der Wildtypstamm NOY505 weist mit ~50 Polymerasen/Gen im Gegensatz zum konstitutiv aktiven Stamm NOY886, nur die Hälfte an Polymerasen pro aktiv transkribiertem Gen auf (French et al., 2003). Die *s*-Bande der psoralenvernetzten DNA beider Stämme zeigt im

Agarosegel jedoch das gleiche Laufverhalten, so daß davon ausgegangen werden kann, daß bei beiden Stämmen ähnliche Psoralenmengen in die rDNA interkalieren (Abb. 4-3A, B).

Die Bindung von UAF und CF an den rDNA Promotor ist die Voraussetzung für die Bindung der initiationskompetenten RNA Polymerase I. Durch die Deletion dieser Faktoren ist die chromosomale Pol I Transkription der UAF- und CF-Mutante vollständig abgeschaltet (Bordi et al., 2001; Keys et al., 1996; Keys et al., 1994). An der rDNA befinden sich folglich keine Pol I Komplexe und die rDNA beider Mutanten liegt vollständig in der psoralenunzugänglichen geschlossenen Chromatinform vor (Abb. 3-12, 4-3F).

Bei der Rrn3p-ts-Mutante YCC95 kann der initiationskompetente Komplex aus Rrn3p und Pol I nach der Temperaturerhöhung nicht mehr ausgebildet werden, so daß keine Initiation und somit auch keine Transkription mehr erfolgen kann. Es zeigte sich, daß sich die *s*- der *f*-Bande nach Rrn3p Inaktivierung durch eine zweistündige Inkubation bei 37°C stark annäherte und die rDNA nicht mehr mit Pol I, jedoch noch immer mit Hmo1p assoziiert war (Abb. 3-16, 20, 21). Die exogenen MNase Verdauere deuteten zudem an, daß sich die rDNA nach dem Abschalten der Transkription nukleosomal zu organisieren beginnt (Abb. 3-37). Durch den zunehmenden Besatz an Nukleosomen wird die vor dem Abschalten der Pol I Transkription stark psoralenzugängliche Chromatinform für das Psoralen immer unzugänglicher. Das noch an der rDNA vorhandene Hmo1p erleichtert möglicherweise die Interkalation von Psoralen in die *s*-Bande (Abb. 4-3C). Die UAF- und CF-Mutanten zeigen an der rDNA keinerlei Besatz mit Pol I und Hmo1p (Abb. 3-13). Vermutlich verläßt Hmo1p der Rrn3p-ts-Mutante die rDNA ebenfalls nach vollständiger nukleosomaler Organisation. Diese scheint jedoch nach einer fünfstündigen Temperaturerhöhung noch nicht erreicht zu sein. Dies zeigen zum einen der exogene MNase Verdau, der noch immer den „Schmier“ der offenen Chromatinform aufweist und zum anderen die Psoralenvernetzungsanalysen, deren Southernblotprofile noch immer eine Schulter aufweisen. Die daraus resultierende Frage, ob die rDNA nach einer längeren Temperaturerhöhung (<5h) nur noch die geschlossene Chromatinform aufweist und diese vollständig nukleosomal organisiert ist und ob diese noch mit Hmo1p assoziiert ist, soll anhand weiterer Versuche im Labor geklärt werden.

Die Rapamycinbehandlung von Hefezellen (Claypool et al., 2004) und das Eintreten in die stationäre Phase (Milkereit and Tschochner, 1998) reduzieren die rRNA-Syntheserate etwa auf ein Zehntel, ebenso die Mengen an Pol I und Rrn3p. „Miller *spread*“ Analysen der rRNA Gene zeigen zusätzlich, daß Rapamycin bzw. das Erreichen der stationären Phase die Anzahl der Polymerasen eines einzelnen rRNA Gens reduziert, die Anzahl an aktiv transkribierten rRNA Genen jedoch nicht verändert (Claypool et al., 2004). Dies spiegelt sich bei der Psoralenvernetzungsanalyse ebenfalls wider, da das Verhältnis von offenen zu geschlossenen Genen unverändert bleibt. Gleichzeitig ist jedoch ein Annähern der *s*- an die *f*-Bande zu erkennen, was für eine reduzierte Psoralenzugänglichkeit der offenen Chromatinform spricht. Dies wird möglicherweise durch die Reduktion der Polymerasedichte hervorgerufen (Abb. 4-3C). Dies scheint auf den ersten Blick jedoch unlogisch, da die DNA mit sinkender Polymerasezahl „nackter“ und somit psoralenzugänglicher werden sollte. Aber genau das Gegenteil wird beobachtet. Eine Erklärung hierfür wäre, daß die Psoraleninterkalation in die

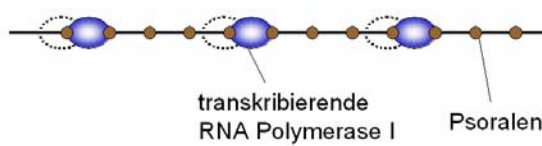
während der Transkription durch die Polymerase aufgewundene DNA begünstigt ist. Möglicherweise ist die rDNA in regelmäßigen Abständen mit von der Polymerase dissoziiertem Hmo1p assoziiert, welches an diesen „polymerasefreien“ Stellen wiederum den Einbau von Psoralen begünstigen könnte (Abb. 4-3C).

Nach der Uracildepletion sind alle zur Transkriptionsinitiation benötigten Faktoren (UAF, CF, Rrn3p) vorhanden und werden durch die Depletion nicht in ihrer Assoziation mit der rDNA und der offenen Chromatinform beeinträchtigt (Abb. 3-30, 31, 32), so daß die Fähigkeit zur Transkriptionsinitiation uneingeschränkt erhalten bleiben sollte. Die ChEC-Analysen geben Hinweise darauf, daß es nach der Depletion zum Stillstand der Polymerasen kommen könnte (Abb. 3-30; vgl. auch 4.4.1.). Gleichzeitig war erstmals ein Öffnen der rDNA zu beobachten. Ein mögliches Szenarium, das sich an der rDNA abspielen könnte wäre folgendes: Mit zunehmender Uracildepletion pausieren immer mehr RNA Polymerasen an den aktiven rRNA Genen. Die Promotorregion wird durch arretierte Pol I Komplexe blockiert, wodurch keine weiteren Pol I-Rrn3p-Komplexe mehr binden können. Diese werden daraufhin an die zuvor psoralenunzugänglichen Gene rekrutiert und öffnen diese (Abb. 4-3D). Die Transkription erfolgt so lange, bis die Polymerasen mit zunehmender Uracildepletion auch an ihnen pausieren.

Wird davon ausgegangen, daß die Polymerasen die rDNA mit zunehmender Uracildepletion nicht verlassen, sondern an ihr pausieren, sollte die Psoralenzugänglichkeit der *s*-Bande unverändert bleiben. Diese nimmt jedoch wie bei sinkender Polymerasedichte ab (Abb. 4-3C, D). Dies ließe sich dadurch erklären, daß die DNA der Transkriptionsblase durch eine sich bewegende Polymerase psoralenzugänglicher ist als durch eine arretierte Polymerase. Möglicherweise korreliert die maximale Psoraleninterkalation mit der Position der transkribierenden Polymerase an der aufgewundenen DNA.

s-Bande: stark psoralenzugängliche offene Chromatinform

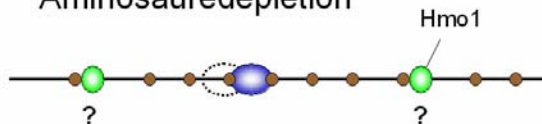
A NOY505



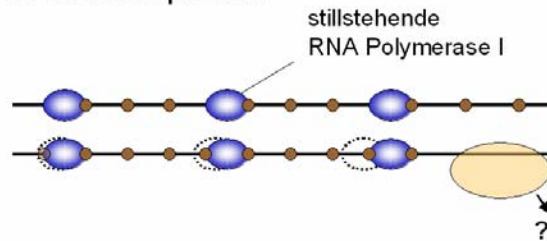
B NOY886



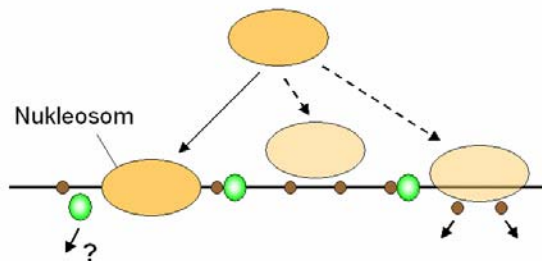
C stationäre Phase, Rapamycin, Aminosäuredepletion



D Uracildepletion



E YCC95 nach Temperaturerhöhung



f-Bande: schwach psoralenzugängliche geschlossene Chromatinform



F UAF-/ CF-Deletionsmutanten

Laufverhalten im Agarosegel

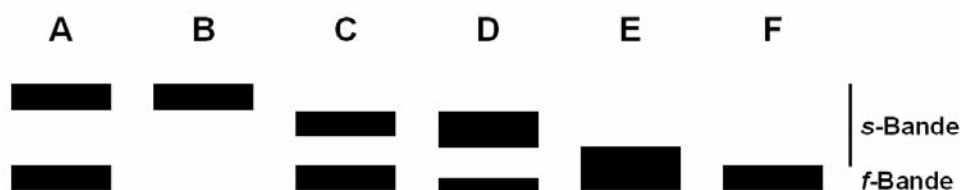


Abb. 4-3: Modelle für den Psoraleneinbau. (A-E) Psoraleneinbau in die s-Bande der rDNA. (A, B) Der maximale Psoraleneinbau erfolgt bei NOY505 und NOY886, deren rDNA aktiv transkribiert wird. (C) Bei der stationären Phase, Rapamycinbehandlung oder Aminosäuredepletion ist die DNA aufgrund der reduzierten Polymerasedichte psoralenunzugänglicher als bei NOY505 und NOY886. (D) Nach Uracildepletion ist die Psoralenzugänglichkeit der DNA ebenfalls reduziert, was möglicherweise auf arretierte Polymerasen zurückzuführen ist. (E) Die größte Reduktion der Psoraleninterkalation in die s-Bande erfolgt bei YCC95 nach dem Abschalten der Transkriptionsinitiation durch Temperaturerhöhung. (F) Die f-Bande der rDNA besitzt die minimalste Psoralenzugänglichkeit. Bis auf NOY886 besitzen alle Stämme diese Chromatinform. UAF- und/oder CF-Mutanten weisen nur diese Form auf. Für nähere Erläuterungen s. Text.

4.5. Nukleosomen

Psoralenanalysen der rDNA ergaben, daß aktiv transkribierte Gene nukleosomenfrei und inaktive Gene nukleosomal sind (Dammann et al., 1993). Die intergenen *Spacer*, die inaktive rDNA Kopien flankieren, sind in regelmäßigen Abständen mit fünf positionierten Nukleosomen besetzt (Vogelauer et al., 1998), wohingegen die *Spacer*, die aktive Gene flankieren, sowohl mit Nukleosomen als auch regulatorischen Proteinen assoziiert sind (Dammann et al., 1995; Vogelauer et al., 1998).

In dieser Arbeit sollte anhand von exogenen MNase Verdauen, sowie ChEC-Analysen geklärt werden, ob aktiv transkribierte rRNA Gene tatsächlich frei von Nukleosomen sind und ob die Nukleosomen der inaktiven rDNA Kopien positioniert sind. Dazu wurden Endonukleaseverdau von Chromatin mit exogen zugesetzter MNase, sowie ChEC-Analysen von Chromatin aus MNase-Fusionsproteinstämmen der Histone H2B, H3 und H4 durchgeführt.

35S rDNA Die ChEC-Analyse der Histone im konstitutiv aktiven Stamm NOY886 ergab, daß die aktiv transkribierte 35S rDNA nahezu frei von Schnittereignissen ist. Die Schnittereignisse sind wahrscheinlich zum einen auf eine minimale Subpopulation inaktiver rDNA Kopien des konstitutiv aktiven Stammes zurückzuführen, die in der Psoralenanalyse detektiert wurden. Zum anderen können Proteine, darunter auch freie Histone, die sich zum Zeitpunkt der Formaldehydvernetzung in die Nähe der rDNA befinden, mit dieser vernetzt werden, so daß bei den ChEC-Analysen immer ein Hintergrund unspezifischer Schnittereignisse auftritt. Weitere Analysen des Labors zeigen aber auch, daß die Histon-Fusionsproteine die DNA mit zunehmender Inkubationszeit stark fragmentieren, so daß sie aus der DNA „herausgeschnitten“ werden und mit zunehmender Verdauzeit wie eine freie, exogen zugegebene MNase wirken. Da die Schnittintensitäten im Vergleich zum Wildtypstamm NOY505, dessen rDNA zur Hälfte aktiv transkribiert wird und zur Hälfte inaktiv ist, deutlich reduziert sind, kann davon ausgegangen werden, daß die aktiv transkribierte 35S rDNA tatsächlich weitgehend frei von Nukleosomen ist (Abb. 3-33). Die kombinierte ChEC- und Psoralenanalyse dieser Arbeit zeigte zudem, daß die inaktive Population der transkribierten 25S rDNA mit Histonen assoziiert ist, die aktive jedoch nicht. Nur im Bereich stromaufwärts des Promotors waren die Histone mit beiden Chromatinformen assoziiert, was mit den Ergebnissen von (Dammann et al., 1995; Vogelauer et al., 1998) konsistent ist.

Diese Ergebnisse stehen jedoch im Widerspruch zu einer jüngsten Studie von Jones et al., 2007, die zu dem Schluß kommen, daß die RNA Polymerase I eine dynamische nukleosomale rDNA transkribiert. Sie verwenden dabei ebenfalls den konstitutiv aktiven Stamm NOY886 (~42 rDNA Kopien) und untersuchen die rDNA im direkten Vergleich mit dem Stamm NOY1051, der mit ~143, ca. 3,4 mal mehr rDNA Kopien besitzt. Als Methoden nutzen sie ChIP-Analysen und exogene MNase Verdau, die im Anschluß in quantitativen Southernblots analysiert werden. Die ChIP-Experimente zeigen, daß ungefähr 40% der Histon H2B- und 25% der Histon H3-Menge des Kontrollstammes mit der rDNA des 40-Kopienstammes

assoziiert sind. Die Southernblot Analysen messen für den durch Pol I abgeschriebenen Bereich der rDNA im 40-Kopienstamm etwa 30% der Nukleosomenokkupanz des Wildtypstammes. Während die durchgeführten Analysen sich gut eignen eine qualitative Abschätzung durchzuführen, ist die genaue Quantifizierung nach unseren Erfahrungen mit den verwendeten experimentellen Systemen eher fraglich. Die von den Autoren gemessene deutliche Reduzierung nukleosomaler Okkupanz für einen Stamm mit 40 rDNA Kopien steht allerdings im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Die Präsenz von Nukleosomen im Hefestamm mit 40 rDNA Kopien läßt sich durch die hier (Abb. 3-27, 29) beobachtete, inaktive rDNA Subpopulation der NOY886 Zellen erklären.

Eine der größten Limitierungen des exogenen MNase Verdaus ist es, nicht unterscheiden zu können, wodurch ein Protektionsmuster an der DNA (Histone oder andere Proteine) hervorgerufen wird. Der große Vorteil der in dieser Arbeit angewandten ChEC-Analyse ist es, einzelne Faktoren als MNase-Fusionsproteine spezifisch und mit hoher Präzision an der DNA lokalisieren zu können. In Kombination mit der Psoralenvernetzungsanalyse wird die Aussagekraft der ChEC-Analyse gestärkt, da zusätzlich die Chromatinform der rDNA bestimmt werden kann, mit der ein Protein (z.B. Histone) assoziiert ist.

Intergene Spacer Die Endonukleaseverdaue und ChEC-Analysen ergaben weiterhin, daß die Nukleosomen der inaktiven rDNA Kopien nicht positioniert sind und die Abstände der Nukleosomen nicht regelmäßig, wie bei inaktiven Pol II transkribierten Genen, sind (Abb. 3-33, 36, 37). Am GAL-Kontrollokus hingegen konnten mit allen drei Histonen, wie zuvor von Schmid et al., 2004 mit Histon H2B (HTB2, wie in dieser Arbeit), regelmäßig positionierte Nukleosomen detektiert werden. Die Existenz der fünf positionierten Nukleosomen des intergenen *Spacers* 2 (Vogelauer et al., 1998) konnte bestätigt werden, wobei Nukleosom drei mit den hier verwendeten Sonden nicht detektierbar war. Die ChEC-Analyse der Stämme NOY505 und NOY886 ergab, daß die 5S rDNA aktiver wie inaktiver Gene durch ein Nukleosom vor Endonukleaseverdaue geschützt ist (Abb. 3-33).

Psoralenanalysen zeigten, daß der Enhancer am 3'Ende eines jeden aktiv transkribierten Genes frei von Nukleosomen ist, wohingegen auf inaktive, nukleosomale Gene ein regelmäßig mit Nukleosomen besetzter Enhancer folgt (Dammann et al., 1995). In dieser Arbeit konnte bei der ChEC-Analyse im Bereich des Enhancers kaum ein Unterschied zwischen dem Wildtypstamm NOY505 und dem konstitutiv aktiven Stamm NOY886 festgestellt werden (Abb. 3-33A, B). Beide Stämme unterscheiden sich in der Intensität der Schnittereignisse, wobei dieser Unterschied nicht so signifikant wie bei der 35S rDNA ist. Vermutlich sind die Schnittereignisse, von NOY886 wiederum auf die inaktive Subpopulation zurückzuführen, so daß an dieser Stelle kein qualitativer Unterschied im ChEC-Verdaumuster erkennbar ist.

Abschalten der Pol I Transkription

Die ChEC-Analysen zeigten, daß die Assoziation der Histone mit der rDNA nach dem Abschalten bzw. dem Herunterregulieren (rRNA-Restsynthese <10%) der Pol I Transkription durch Nährstoffentzug oder das Erreichen der stationären Phase nahezu unverändert blieb. Die Assoziation der Histone mit der rDNA nahm bei den stationären Zellen der Stämme

NOY505 und NOY886 im Vergleich zu logarithmisch wachsenden Zellen sogar ab. Die Psoralenanalyse zeigte hingegen, daß die Anzahl der offenen Gene konstant bleibt, so daß keine Zunahme in der Assoziation der rDNA mit Nukleosomen zu erwarten ist. Die beobachtete Abnahme der Assoziation ist vermutlich auf die verminderte Effizienz der Formaldehydvernetzung stationärer Zellen im Vergleich zu logarithmisch wachsenden Zellen zurückzuführen, so daß die Nukleosomen der stationären Zellen vermutlich bei der Nukleipräparation verloren gehen. Dadurch scheint die rDNA stationärer Zellen bei der ChEC-Analyse schwächer mit Histonen assoziiert zu sein als logarithmisch wachsende.

Komposition ribosomaler Nukleosomen

In dieser Arbeit wurde die nicht essentielle Kopie von H2B, HTB2, mit der MNase fusioniert, da dies für die essentielle Kopie, HTB1, nicht gelang. Die ChEC-Analysen der Histon-Fusionsstämme des konstitutiv aktiven Stammes NOY886 und des Wildtypstammes NOY505 zeigen, daß das H2B-Fusionsprotein von NOY886 die rDNA deutlich schwächer schneidet als das von NOY505 (Abb. 3-33A, B). Die Fusionsproteine der Histone H3 und H4 schneiden hingegen in beiden Stammhintergründen mit ähnlicher Stärke. Mögliche Erklärungen dafür wären Unterschiede in der Komposition ribosomaler Nukleosomen im Vergleich zu anderen Nukleosomen und/oder unterschiedliche Kompositionen der Nukleosomen beider rDNA Chromatinformen. Möglicherweise enthalten die Nukleosomen der aktiven rDNA Population weniger HTB2 als die der inaktiven. Eine alternative Möglichkeit wäre, daß die Stabilität der Nukleosomen der aktiven Fraktion reduziert ist und die H2A/H2B-Dimere während der Nukleisolierung verloren gehen. Zur Klärung dieser Frage werden im Labor zur Zeit Fusionsstämme des Histons H2A untersucht. Liefert das entsprechende Fusionsprotein im Stammhintergrund NOY886 ähnlich schwache Schnittintensitäten wie der H2B-Fusionsstamm, wäre dies ein Hinweis darauf, daß die Stabilität der Nukleosomen reduziert ist. Sind die Intensitäten jedoch mit denen der Histon H3- und H4-Fusionsstämme vergleichbar, würde dies auf einen verminderten Einbau von HTB2 in ribosomale Nukleosomen der aktiven Fraktion hindeuten. Um in allen Fällen ausschließen zu können, daß die jeweils andere Histonkopie präferentiell in (ribosomale) Nukleosomen eingebaut wird, müßte die jeweils andere Histonkopie (ohne MNase) deletiert werden. Dies ist eines der langfristigen Ziele dieser Arbeitsgruppe.

4.6. Episomale rDNA unterscheidet sich von chromosomaler rDNA

Anhand des ChECs ist es möglich, die Chromatinstruktur und -Komposition des endogenen rDNA Lokuses zu untersuchen. Gängige Methoden, wie die Chromatinimmunopräzipitation (ChIP) oder *ChIP-on-chip*-Analysen haben zur genomweiten Lokalisierung von DNA-Bindeproteinen beigetragen und massenspektroskopische Untersuchungen von Gesamtchromatin lieferten einen Überblick über mögliche Chromatinbestandteile, bzw. deren Modifikationen. Diese Methoden stoßen jedoch an ihre Grenzen, da sie entweder nicht quantifizierbar sind oder keine Lokalisierung ermöglichen.

Eine andere Methode ermöglicht es hingegen, spezifische Chromatindomänen aus ihrem chromosomalen Kontext zu isolieren und sie anschließend einer funktionellen Analyse zu unterziehen. Dies gelang erstmals für das Pol II transkribierte Einzelkopiengen PHO5, das in für massenspektroskopische Analysen ausreichenden Mengen angereichert werden konnte (Griesenbeck et al., 2003; Griesenbeck et al., 2004). Die zu untersuchenden Loci werden zunächst mit Erkennungssequenzen (RS-Elemente) für eine sequenzspezifische Rekombinase flankiert und zusätzlich wird eine Bindestelle für LexA integriert (RS-LexA; Ansari et al., 1999). Die unter einem GAL-Promotor stehende Rekombinase wird über ein Plasmid in den Hefestamm eingeführt und durch Galaktose induziert. Die bei der Rekombination entstehenden ringförmigen Chromatindomänen werden über eine differentielle Zentrifugation von der chromosomalen DNA getrennt und anschließend über die LexA-Bindestelle affinitätschromatographisch aufgereinigt (Griesenbeck et al., 2004).

Zur Analyse der nativen Chromatinstruktur des rDNA Lokuses wurden im Labor verschiedene Hefestämme etabliert, bei denen definierte chromosomale Abschnitte der rDNA mit RS-Elementen flankiert sind. Ein alternativer Ansatz erfolgte in einem Hefestamm dessen rDNA chromosomal deletiert ist. Dieser enthält ein Multikopienplasmid, das eine rDNA Kopie unter dem Wildtyppromotor trägt, die von Pol I transkribiert wird. Die 35S rDNA dieses Plasmids wurde mit RS-Elementen flankiert und erste Untersuchungen ergaben, daß 60% der episomalen rDNA rekombinieren (Daten nicht gezeigt). Die ChEC- und Psoralenvernetzungsanalysen zeigten, daß die Chromatinstruktur der episomalen rDNA nicht mehr der chromosomalen entspricht (Abb. 3-4, 39). Dies wurde auch für plasmidgebundene Einzelkopiengene beobachtet (Haswell and O'Shea, 1999). Die chromosomale Chromatinstruktur der rDNA wird vermutlich durch Chromatinüberstrukturen bestimmt, die bei dem plasmidgebundenen Mehrkopiengen nicht mehr ausgebildet werden können. Der Plasmidstamm ist zwar somit für weitere Untersuchungen der nativen Chromatinkomposition der rDNA mittels Massenspektrometrie oder Elektronenmikroskopie ungeeignet, stellt aber ein optimales Modellsystem für weitere Untersuchungen von Chromatinüberstrukturen anhand von ChEC-Analysen dar. Er könnte beispielsweise zur Klärung der Frage, ob Rrn7p tatsächlich eine stabilisierende Funktion bei der Ausbildung der „UAF-Schleife“ einnimmt, beitragen (vgl. 4.1.1., Abb. 4-1).

5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Komposition und Struktur ribosomalen Chromatins von *S. cerevisiae* *in vivo* zu untersuchen.

In einer logarithmisch wachsenden Hefezelle wird etwa die Hälfte der ~150 rRNA Gene aktiv von der RNA Polymerase I (Pol I) transkribiert (offene Chromatinform), die andere Hälfte ist inaktiv und nukleosomal organisiert (geschlossene Chromatinform). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß die Deletion der beiden Transkriptionsfaktorkomplexe UAF (*upstream activating factor*) und CF (*core factor*), deren Bindung an den rDNA Promotor für die Pol I Transkription erforderlich ist, dazu führen, daß die ribosomale DNA (rDNA) vollständig in der inaktiven Chromatinform vorliegt. Es konnte zusätzlich gezeigt werden, daß UAF für die Ausbildung der Chromatinstruktur am rDNA Locus verantwortlich ist.

Die präzise Lokalisierung einzelner chromatinassoziierter Faktoren an der rDNA wurde durch den Einsatz einer neuen Methode, dem ChEC (*chromatin endogenous cleavage*) möglich (Schmid et al., 2004). Bei dieser Methode wird die Mikrokokken-Nuklease (MNase) mit dem Protein fusioniert, dessen DNA-Bindestellen lokalisiert werden sollen. Die MNase wird in isolierten Nuklei durch Ca^{2+} -Zugabe aktiviert, so daß die DNA an den Stellen geschnitten wird, an denen sie mit dem Fusionsprotein assoziiert ist. Zur Analyse der Dynamik von Assoziations- und Dissoziationsereignissen an der rDNA, in Abhängigkeit von der transkriptionellen Aktivität, wurde eine Kollektion von Hefestämmen mit Fusionsproteinen bekannter rDNA-Bindeproteine etabliert.

Durch die Kombination der ChEC- und der DNA-Vernetzungsanalyse mit Psoralen ist es nun möglich, zu bestimmen, mit welcher der beiden Chromatinformen (offen/ geschlossen) Transkriptionsfaktoren, Komponenten der Pol I Transkriptionsmaschinerie oder Nukleosomen präferentiell assoziiert sind.

Es konnte gezeigt werden, daß am Promotor die UAF- (Uaf30p, Rrn10p) und CF-Komponenten (Rrn7p), Rrn3p, das mit Pol I einen initiationskompetenten Komplex bildet, die RNA Polymerase I, sowie der Transkriptionsfaktor Hmo1p, der mit Pol I synergistisch interagiert, präferentiell mit der offenen Chromatinform assoziiert sind. Im Gegensatz dazu sind die Histone mit beiden Formen assoziiert. Im transkribierten Bereich sind dagegen nur Hmo1p und die RNA Polymerase I mit der offenen und die Histone mit der geschlossenen Chromatinform assoziiert, während alle anderen Transkriptionsfaktoren nicht gebunden sind.

Die ChEC-Analysen zeigten, daß Hmo1p und die RNA Polymerase I an den selben Stellen des transkribierten Bereichs lokalisieren, da sie die gleichen Assoziationsmuster an der rDNA aufweisen. Die Fusionsproteine der UAF- (Uaf30p, Rrn10p) und CF-Komponenten (Rrn7p), sowie Rrn3p weisen neben spezifischen Schnitten in der Promotorregion (schwache) Schnittereignisse in der 2kb stromaufwärtsgelegenen Enhancersequenz auf, was ein Hinweis auf potentielle Interaktion der beiden Elemente ist (möglicherweise durch die Ausbildung von rDNA-Überstrukturen). Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß der codierende Bereich der

rDNA bei der aktiven Population nahezu frei von Nukleosomen ist und bei inaktiven Genen mit nicht positionierten Nukleosomen besetzt ist. Die intergenen *Spacer* und die 5S rDNA sind bei beiden Populationen mit positionierten Nukleosomen besetzt.

Nach dem Abschalten der Pol I Transkription durch Nährstoffentzug (Rapamycinbehandlung, Aminosäureentzug) oder Uracildepletion zeigte sich, daß beide Chromatinformen erhalten bleiben und die Assoziation der oben genannten Faktoren mit der rDNA und der jeweiligen Chromatinform unverändert bleibt. Die einzige Ausnahme bildet Rrn3p, das nach dem Nährstoffentzug nicht mehr mit dem rDNA Promotor assoziiert ist. Interessanterweise bleibt die RNA Polymerase I an die rDNA gebunden, obwohl keine RNA mehr synthetisiert wird, was auf einen Regulationsschritt der rRNA Synthese auf Ebene der Elongation hinweist. Die Depletion von Uracil führte erstaunlicherweise dazu, daß die geschlossene Chromatinform teilweise in die offene übergeht.

Die Ergebnisse geben einen Überblick über die strukturellen und kompositorischen Voraussetzungen, die das Chromatin des rDNA Lokuses erfüllen muß, damit Transkription erfolgen kann. Anhand der angewandten Methoden eröffnen sie eine Perspektive, Zusammenhänge zwischen der Chromatinstruktur, der Transkription und der Regulation der Ribosomenbiogenese im Detail besser verstehen zu können.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CF	<i>core</i> Faktor
ChEC	<i>chromatin endogenous cleavage</i>
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2-Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(β-aminoethylether)N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>f</i> -Bande	<i>fast-migrating band</i>
kb	Kilobasenpaar
MaBS	Maleinsäure-gepufferte Saline
MNase	Mikrokokken-Nuklease
mRNA	Messenger-RNA
MW	relatives Molekulargewicht
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI	Proteaseinhibitoren
PMSF	Phenylmethylsulfonylchlorid
Pol	RNA Polymerase
PSW	<i>polymerase switch for growth</i>
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
rDNA	ribosomale DNA
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rP	ribosomales Protein
rpL	Protein der 60S-Untereinheit
rpm	Rotationen pro Minute
rpS	Protein der 40S-Untereinheit
rRNA	ribosomale RNA

RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
s-Bande	<i>slow-migrating band</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Natriumcitrat-gepufferte Kochsalzlösung
Tab.	Tabelle
TBP	TATA-Bindeprotein
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
ts	temperatursensitiv
U	<i>Unit</i> (Enzymaktivität)
UAF	<i>upstream activating</i> Faktor
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp

Es werden SI-Einheiten und die Symbole der chemischen Elemente verwendet.

Literaturverzeichnis

- Ahmad, K. and Henikoff, S. (2001) Centromeres are specialized replication domains in heterochromatin. *J Cell Biol*, **153**, 101-110.
- Ahmad, K. and Henikoff, S. (2002) The histone variant h3.3 marks active chromatin by replication- independent nucleosome assembly. *Mol Cell*, **9**, 1191-1200.
- Allfrey, V.G., Faulkner, R. and Mirsky, A.E. (1964) Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **51**, 786-794.
- Ansari, A., Cheng, T.H. and Gartenberg, M.R. (1999) Isolation of selected chromatin fragments from yeast by site-specific recombination in vivo. *Methods*, **17**, 104-111.
- Aprikian, P., Moorefield, B. and Reeder, R.H. (2001) New Model for the Yeast RNA Polymerase I Transcription Cycle. *Mol Cell Biol*, **21**, 4847-4855.
- Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.C., Love, W.E. and Moudrianakis, E.N. (1991) The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10148-10152.
- Arney, K.L. and Fisher, A.G. (2004) Epigenetic aspects of differentiation. *J Cell Sci*, **117**, 4355–4433.
- Bannister, A.J. and Kouzarides, T. (2004) Histone methylation: recognizing the methyl mark. *Methods Enzymol*, **376**, 269-288.
- Bazett-Jones, D.P., Leblanc, B., Herfort, M. and Moss, T. (1994) Short-range DNA looping by the Xenopus HMG-box transcription factor, xUBF. *Science*, **264**, 1134-1137.
- Bedford, M.T. and Richard, S. (2005) Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol Cell*, **18**, 263-272.
- Berezney, R. and Coffey, D.S. (1974) Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem Biophys Res Commun*, **60**, 1410-1417.
- Bier, M., Fath, S. and Tschochner, H. (2004) The composition of the RNA polymerase I transcription machinery switches from initiation to elongation mode. *FEBS Lett*, **564**, 41-46.
- Bodem, J., Dobрева, G., Hoffmann-Rohrer, U., Iben, S., Zentgraf, H., Delius, H., Vingron, M. and Grummt, I. (2000) TIF-IA, the factor mediating growth-dependent control of ribosomal RNA synthesis, is the mammalian homolog of yeast Rrn3p. *EMBO Rep*, **1**, 171-175.
- Bordi, L., Cioci, F. and Camilloni, G. (2001) In vivo binding and hierarchy of assembly of the yeast RNA polymerase I transcription factors. *Mol Biol Cell*, **12**, 753-760.
- Bouchoux, C., Hautbergue, G., Grenetier, S., Carles, C., Riva, M. and Goguel, V. (2004) CTD kinase I is involved in RNA polymerase I transcription. *Nucleic Acids Res*, **32**, 5851-5860.
- Braunstein, M., Rose, A.B., Holmes, S.G., Allis, C.D. and Broach, J.R. (1993) Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced histone acetylation. *Genes Dev*, **7**, 592-604.
- Briggs, S.D., Bryk, M., Strahl, B.D., Cheung, W.L., Davie, J.K., Dent, S.Y., Winston, F. and Allis, C.D. (2001) Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, **15**, 3286-3295.
- Bryk, M., Banerjee, M., Murphy, M., Knudsen, K.E., Garfinkel, D.J. and Curcio, M.J. (1997) Transcriptional silencing of Ty1 elements in the RDN1 locus of yeast. *Genes Dev*, **11**, 255-269.
- Bryk, M., Briggs, S.D., Strahl, B.D., Curcio, M.J., Allis, C.D. and Winston, F. (2002) Evidence that Set1, a factor required for methylation of histone H3, regulates rDNA silencing in *S. cerevisiae* by a Sir2-independent mechanism. *Curr Biol*, **12**, 165-170.
- Cadwell, C., Yoon, H.J., Zebarjadian, Y. and Carbon, J. (1997) The yeast nucleolar protein Cbf5p is involved in rRNA biosynthesis and interacts genetically with the RNA polymerase I transcription factor RRN3. *Mol Cell Biol*, **17**, 6175-6183.
- Carruthers, L.M., Bednar, J., Woodcock, C.L. and Hansen, J.C. (1998) Linker histones stabilize the intrinsic salt-dependent folding of nucleosomal arrays: mechanistic ramifications for higher-order chromatin folding. *Biochemistry*, **37**, 14776-14787.
- Cech, T. and Pardue, M.L. (1977) Cross-linking of DNA with trimethylpsoralen is a probe for chromatin structure. *Cell*, **11**, 631-640.
- Choe, S.Y., Schultz, M.C. and Reeder, R.H. (1992) In vitro definition of the yeast RNA polymerase I promoter. *Nucleic Acids Res*, **20**, 279-285.
- Chubb, J.R. and Bickmore, W.A. (2003) Considering nuclear compartmentalization in the light of nuclear dynamics. *Cell*, **112**, 403-406.
- Cioci, F., Vu, L., Eliason, K., Oakes, M., Siddiqi, I.N. and Nomura, M. (2003) Silencing in yeast rDNA chromatin: reciprocal relationship in gene expression between RNA polymerase I and II. *Mol Cell*, **12**, 135-145.

- Clark, D.J., O'Neill, L.P. and Turner, B.M. (1993) Selective use of H4 acetylation sites in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*, **294**, 557-561.
- Claypool, J.A., French, S.L., Johzuka, K., Eliason, K., Vu, L., Dodd, J.A., Beyer, A.L. and Nomura, M. (2004) Tor pathway regulates Rrn3p-dependent recruitment of yeast RNA polymerase I to the promoter but does not participate in alteration of the number of active genes. *Mol Biol Cell*, **15**, 946-956.
- Comai, L. (2004) Mechanism of RNA polymerase I transcription. *Adv Protein Chem*, **67**, 123-155.
- Conconi, A. (1987) Correlation between gene activity and chromatin structure in mouse erythroleukemia cells. *Swiss Federal Institute of Technology of Zürich, Zürich*.
- Conconi, A. (2005) The yeast rDNA locus: a model system to study DNA repair in chromatin. *DNA Repair (Amst)*, **4**, 897-908.
- Conconi, A., Losa, R., Koller, T. and Sogo, J.M. (1984) Psoralencrosslinking of soluble and of H1-depleted soluble rat liver chromatin. *J Mol Biol*, **178**, 920-928.
- Conconi, A., Widmer, R.M., Koller, T. and Sogo, J.M. (1989) Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. *Cell*, **57**, 753-761.
- Conrad-Webb, H. and Butow, R.A. (1995) A polymerase switch in the synthesis of rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **15**, 2420-2428.
- Crespo, J.L. and Hall, M.N. (2002) Elucidating TOR signaling and rapamycin action: Lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, **66**, 579-591.
- Dammann, R., Lucchini, R., Koller, T. and Sogo, J.M. (1993) Chromatin structures and transcription of rDNA in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **21**, 2331-2338.
- Dammann, R., Lucchini, R., Koller, T. and Sogo, J.M. (1995) Transcription in the yeast rRNA gene locus: distribution of the active gene copies and chromatin structure of their flanking regulatory sequences. *Mol Cell Biol*, **15**, 5294-5303.
- Dror, V. and Winston, F. (2004) The Swi/Snf chromatin remodeling complex is required for ribosomal DNA and telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **24**, 8227-8235.
- Elgin, S.C. and Weintraub, H. (1975) Chromosomal proteins and chromatin structure. *Annu Rev Biochem*, **44**.
- Fahy, D., Conconi, A. and Smerdon, M.J. (2005) Rapid changes in transcription and chromatin structure of ribosomal genes in yeast during growth phase transitions. *Exp Cell Res*, **305**, 365-373.
- Fath, S., Kobor, M.S., Philippi, A., Greenblatt, J. and Tschochner, H. (2004) Dephosphorylation of RNA polymerase I by Fcp1p is required for efficient rRNA synthesis. *J Biol Chem*, **279**, 25251-25259.
- Fath, S., Milkereit, P., Peyroche, G., Riva, M., Carles, C. and Tschochner, H. (2001) Differential roles of phosphorylation in the formation of transcriptional active RNA polymerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 14334-14339.
- Fischle, W., Wang, Y. and Allis, C.D. (2003) Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 172-183.
- Foe, V.E., Wilkinson, L.E. and Laird, C.D. (1976) Comparative organization of active transcription units in *Oncopeltus fasciatus*. *Cell*, **9**, 131-146.
- Franke, W.W., Scheer, U., Trendelenburg, M.F., Spring, H. and Zentgraf, H. (1976) Absence of nucleosomes in transcriptionally active chromatin. *Cytobiologie*, **13**, 401-434.
- French, S.L., Osheim, Y.N., Cioci, F., Nomura, M. and Beyer, A.L. (2003) In exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells, rRNA synthesis is determined by the summed RNA polymerase I loading rate rather than by the number of active genes. *Mol Cell Biol*, **23**, 1558-1568.
- Fritze, C.E., Verschuere, K., Strich, R. and Easton Esposito, R. (1997) Direct evidence for SIR2 modulation of chromatin structure in yeast rDNA. *Embo J*, **16**, 6495-6509.
- Fritze, C.E., Verschuere, K., Strich, R. and Esposito, R.E. (1997) Direct evidence for SIR2 modulation of chromatin structure in yeast rDNA. *Embo J*, **16**, 6495-6509.
- Gadal, O., Labarre, S., Boschiero, C. and Thuriaux, P. (2002) Hmo1, an HMG-box protein, belongs to the yeast ribosomal DNA transcription system. *Embo J*, **21**, 5498-5507.
- Gale, J.M. and Smerdon, M.J. (1988) UV-induced pyrimidine dimers and trimethylpsoralen crosslinks do not alter chromatin folding in vitro. *Biochemistry*, **27**, 7197-7205.
- Ganley, A.R., Hayashi, K., Horiuchi, T. and Kobayashi, T. (2005) Identifying gene-independent noncoding functional elements in the yeast ribosomal DNA by phylogenetic footprinting. *Proc Natl Acad Sci*, **102**, 11787-11792.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D. and Brown, P.O. (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell*, **11**, 4241-4257.
- Gietz, R.D. and Sugino, A. (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*, **74**, 527-534.
- Gorski, J.J., Pathak, S., Panov, K., Kasciukovic, T., Panova, T., Russell, J. and Zomerdijk, J.C. (2007) A novel TBP-associated factor of SL1 functions in RNA polymerase I transcription. *Embo J*.
- Gottesfeld, J.M., Bagi, G., Berg, B. and Bonner, J. (1976) Sequence composition of the template-active fraction of rat liver chromatin. *Biochemistry*, **15**, 2472-2483.

- Gottlieb, S. and Esposito, R.E. (1989) A new role for a yeast transcriptional silencer gene, SIR2, in regulation of recombination in ribosomal DNA. *Cell*, **56**, 771-776.
- Grewal, S.I. and Elgin, S.C. (2002) Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 178-187.
- Griesenbeck, J., Boeger, H., Strattan, J.S. and Kornberg, R.D. (2003) Affinity purification of specific chromatin segments from chromosomal loci in yeast. *Mol Cell Biol*, **23**, 9275-9282.
- Griesenbeck, J., Boeger, H., Strattan, J.S. and Kornberg, R.D. (2004) Purification of defined chromosomal domains. *Methods Enzymol*, **375**, 170-178.
- Grummt, I. (2003) Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes Dev*, **17**, 1691-1702.
- Grunstein, M. (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, **389**, 349-352.
- Hall, D.B., Wade, J.T. and Struhl, K. (2006) An HMG protein, Hmo1, associates with promoters of many ribosomal protein genes and throughout the rRNA gene locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **26**, 3672-3679.
- Hanada, K., Song, C.Z., Yamamoto, K., Yano, K., Maeda, Y., Yamaguchi, K. and Muramatsu, M. (1996) RNA polymerase I associated factor 53 binds to the nucleolar transcription factor UBF and functions in specific rDNA transcription. *Embo J*, **15**, 2217-2226.
- Hasan, S. and Hottiger, M.O. (2002) Histone acetyl transferases: a role in DNA repair and DNA replication. *J Mol Med*, **80**, 463-474.
- Haswell, E.S. and O'Shea, E.K. (1999) An in vitro system recapitulates chromatin remodeling at the PHO5 promoter. *Mol Cell Biol*, **19**, 2817-2827.
- Heix, J., Vente, A., Voit, R., Budde, A., Michaelidis, T.M. and Grummt, I. (1998) Mitotic silencing of human rRNA synthesis: Inactivation of the promoter selectivity factor SL1 by cdc2/cyclin B-mediated phosphorylation. *Embo J*, **17**, 7373-7381.
- Henikoff, S., Furuyama, T. and Ahmad, K. (2004) Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance. *Trends Genet*, **20**, 320-326.
- Higashinakagawa, T., Wahn, H. and Reeder, R.H. (1977) Isolation of ribosomal gene chromatin. *Dev Biol*, **55**, 375-386.
- Hirschler-Laszkiewicz, I., Cavanaugh, A., Hu, Q., Catania, J., Avantiaggiati, M.L. and Rothblum, L.I. (2001) The role of acetylation in rDNA transcription. *Nucleic Acids Res*, **29**, 4114-4124.
- Hsu, J.Y., Sun, Z.W., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D.K., Grushcow, J.M., Brame, C.J., Caldwell, J.A., Hunt, D.F., Lin, R., Smith, M.M. and Allis, C.D. (2000) Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell*, **102**, 279-291.
- Huang, J. and Moazed, D. (2003) Association of the RENT complex with nontranscribed and coding regions of rDNA and a regional requirement for the replication fork block protein Fob1 in rDNA silencing. *Genes Dev*, **17**, 2162-2176.
- Imai, S., Armstrong, C.M., Kaerberlein, M. and Guarente, L. (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*.
- Jackson, D.A., Iborra, F.J., Manders, E.M. and Cook, P.R. (1998) Numbers and organization of RNA polymerases, nascent transcripts, and transcription units in HeLa nuclei. *Mol Biol Cell*, **9**, 1523-1536.
- Jansa, P. and Grummt, I. (1999) Mechanism of transcription termination: PTRF interacts with the largest subunit of RNA polymerase I and dissociates paused transcription complexes from yeast and mouse. *Mol Gen Genet*, **262**, 508-514.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D. (2001) Translating the histone code. *Science*, **293**, 1074-1080.
- Jones, H.S., Kawauchi, J., Braglia, P., Alen, C.M., Kent, N.A. and Proudfoot, N.J. (2007) RNA polymerase I in yeast transcribes dynamic nucleosomal rDNA. *Nat Struct Mol Biol*, **14**, 123-130.
- Jorgensen, P., Rupes, I., Sharom, J.R., Schneper, L., Broach, J.R. and Tyers, M. (2004) A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes Dev*, **18**, 2491-2505.
- Ju, Q. and Warner, J.R. (1994) Ribosome synthesis during the growth cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **10**, 151-157.
- Katan-Khaykovich, Y. and Struhl, K. (2002) Dynamics of global histone acetylation and deacetylation in vivo: rapid restoration of normal histone acetylation status upon removal of activators and repressors. *Genes Dev*, **16**, 743-752.
- Keener, J., Dodd, J.A., Lalo, D. and Nomura, M. (1997) Histones H3 and H4 are components of upstream activation factor required for the high-level transcription of yeast rDNA by RNA polymerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 13458-13462.
- Kempers-Veenstra, A.E., Oliemans, J., Offenbergh, H., Dekker, A.F., Piper, P.W., Planta, R.J. and Klootwijk, J. (1986) 3'-End formation of transcripts from the yeast rRNA operon. *Embo J*, **5**, 2703-2710.

- Keys, D.A., Lee, B.S., Dodd, J.A., Nguyen, T.T., Vu, L., Fantino, E., Burson, L.M., Nogi, Y. and Nomura, M. (1996) Multiprotein transcription factor UAF interacts with the upstream element of the yeast RNA polymerase I promoter and forms a stable preinitiation complex. *Genes Dev*, **10**, 887-903.
- Keys, D.A., Vu, L., Steffan, J.S., Dodd, J.A., Yamamoto, R.T., Nogi, Y. and Nomura, M. (1994) RRN6 and RRN7 encode subunits of a multiprotein complex essential for the initiation of rDNA transcription by RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, **8**, 2349-2362.
- Kleinschmidt, J.A., Seiter, A. and Zentgraf, H. (1990) Nucleosome assembly in vitro: separate histone transfer and synergistic interaction of native histone complexes purified from nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *EMBO J*, **9**, 1309-1318.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K. and Schiebel, E. (1999) Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast*, **15**, 963-972.
- Kobayashi, T. and Ganley, A.R. (2005) Recombination regulation by transcription-induced cohesin dissociation in rDNA repeats. *Science*, **309**, 1581-1584.
- Kobayashi, T., Heck, D.J., Nomura, M. and Horiuchi, T. (1998) Expansion and contraction of ribosomal DNA repeats in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement of replication fork blocking (Fob1) protein and the role of RNA polymerase I. *Genes Dev*, **12**, 3821-3830.
- Kobayashi, T. and Horiuchi, T. (1996) A yeast gene product, Fob1 protein, required for both replication fork blocking and recombinational hotspot activities. *Genes Cells*, **1**, 465-474.
- Kornberg, R.D. (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*, **184**, 868-871.
- Kraus, W.L. and Lis, J.T. (2003) PARP goes transcription. *Cell*, **113**, 667-683.
- Krishnamoorthy, T., Chen, X., Govin, J., Cheung, W.L., Dorsey, J., Schindler, K., Winter, E., Allis, C.D., Guacci, V., Khochbin, S., Fuller, M.T. and Berger, S.L. (2006) Phosphorylation of histone H4 Ser1 regulates sporulation in yeast and is conserved in fly and mouse spermatogenesis. *Genes Dev*, **20**, 2580-2592.
- Kulkens, T., Riggs, D.L., Heck, J.D., Planta, R.J. and Nomura, M. (1991) The yeast RNA polymerase I promoter: ribosomal DNA sequences involved in transcription initiation and complex formation in vitro. *Nucleic Acids Res*, **19**, 5363-5370.
- Kulkens, T., van der Sande, C.A., Dekker, A.F., van Heerikhuizen, H. and Planta, R.J. (1992) A system to study transcription by yeast RNA polymerase I within the chromosomal context: functional analysis of the ribosomal DNA enhancer and the RBP1/REB1 binding sites. *Embo J*, **11**, 4665-4674.
- Kurdistani, S.K. and Grunstein, M. (2003) Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 276-284.
- Labhart, P. and Koller, T. (1982) Structure of the active nucleolar chromatin of *Xenopus laevis* oocytes. *Cell*, **28**, 279-292.
- Lachner, M. and Jenuwein, T. (2002) The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 286-298.
- Lachner, M., O'Sullivan, R.J. and Jenuwein, T. (2003) An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J Cell Sci*, **116**, 2117-2124.
- Laferte, A., Favry, E., Sentenac, A., Riva, M., Carles, C. and Chedin, S. (2006) The transcriptional activity of RNA polymerase I is a key determinant for the level of all ribosome components. *Genes Dev*, **20**, 2030-2040.
- Laird, C.D., Wilkinson, L.E., Foe, V.E. and Chooi, W.Y. (1976) Analysis of chromatin-associated fiber arrays. *Chromosoma*, **58**, 169-190.
- Lang, W.H., Morrow, B.E., Ju, Q., Warner, J.R. and Reeder, R.H. (1994) A model for transcription termination by RNA polymerase I. *Cell*, **79**, 527-534.
- Lang, W.H. and Reeder, R.H. (1993) The REB1 site is an essential component of a terminator for RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **13**, 649-658.
- Längst, G., Blank, T.A., Becker, P.B. and Grummt, I. (1997) RNA polymerase I transcription on nucleosomal templates: the transcription termination factor TTF-I induces chromatin remodeling and relieves transcriptional repression. *Embo J*, **16**, 760-768.
- Lin, C.W., Moorefield, B., Payne, J., Aprikan, P., Mitomo, K. and Reeder, R.H. (1996) A novel 66-kilodalton protein complexes with Rrn6, Rrn7, and TATA-binding protein to promote polymerase I transcription initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **16**, 6436-6443.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell, J.E. (2001) *Molekulare Zellbiologie*, 4 Edition. Spektrum, Akad. Verlag, Heidelberg; Berlin.
- Lohr, D. (1984) Organization of the *GALI-10* intergenic control region in chromatin. *Nucleic Acids Res*, **12**, 8457-8474.
- Lohr, D. and Hopper, J.E. (1985) The relationship of regulatory proteins and DNase I hypersensitive sites in the yeast *GALI-10* genes. *Nucleic Acids Res*, **13**, 8409-8423.
- Lucchini, R. and Sogo, J.M. (1994) Chromatin structure and transcriptional activity around the replication forks arrested at the 3' end of the yeast rRNA genes. *Mol Cell Biol*, **14**, 318-326.

- Lucchini, R. and Sogo, J.M. (1995) Replication of transcriptionally active chromatin. *Nature*, **374**, 276-280.
- Lucchini, R., Wellinger, R.E. and Sogo, J.M. (2001) Nucleosome positioning at the replication fork. *Embo J*, **20**, 7294-7302.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. and Richmond, T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, **389**, 251-260.
- Margueron, R., Trojer, P. and Reinberg, D. (2005) The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev*, **15**, 163-176.
- Martin, C. and Zhang, Y. (2005) The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 838-849.
- Martin, D.E., Soullard, A. and Hall, M.N. (2004) TOR regulates ribosomal protein gene expression via PKA and the Forkhead transcription factor FHL1. *Cell*, **119**, 969-979.
- Mathis, D.J. and Gorovsky, M.A. (1976) Subunit structure of rDNA-containing chromatin. *Biochemistry*, **15**, 750-755.
- Matsui, S. and Busch, H. (1977) Isolation and characterization of rDNA-containing chromatin from nucleoli. *Exp Cell Res*, **109**, 151-161.
- Meneghini, M.D., Wu, M. and Madhani, H.D. (2003) Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent chromatin. *Cell*, **112**, 725-736.
- Milkereit, P. and Tschöchner, H. (1998) A specialized form of RNA polymerase I, essential for initiation and growth-dependent regulation of rRNA synthesis, is disrupted during transcription. *Embo J*, **17**, 3692-3703.
- Miller, O.L., Jr. and Beatty, B.R. (1969) Visualization of nucleolar genes. *Science*, **164**, 955-957.
- Moorefield, B., Greene, E.A. and Reeder, R.H. (2000) RNA polymerase I transcription factor Rn3 is functionally conserved between yeast and human. *proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4724-4729.
- Morrow, B.E., Johnson, S.P. and Warner, J.R. (1989) Proteins that bind to the yeast rDNA enhancer. *J Biol Chem*, **264**, 9061-9068.
- Moss, T. (2004) At the crossroads of growth control; making ribosomal RNA. *Curr Opin Genet Dev*, **14**, 210-217.
- Moss, T., Langlois, F., Gagnon-Kugler, T. and Stefanovsky, V. (2007) A housekeeper with power of attorney: the rRNA genes in ribosome biogenesis. *Cell Mol Life Sci*, **63**, 29-49.
- Moss, T., Stefanovsky, V., Langlois, F. and Gagnon-Kugler, T. (2006) A new paradigm for the regulation of the mammalian ribosomal RNA genes. *Biochem Soc Trans*, **34**, 1079-1081.
- Muller, M., Lucchini, R. and Sogo, J.M. (2000) Replication of yeast rDNA initiates downstream of transcriptionally active genes. *Mol Cell*, **5**, 767-777.
- Muth, V., Nadaud, S., Grummt, I. and Voit, R. (2001) Acetylation of TAF(I)68, a subunit of TIF-IB/SL1, activates RNA polymerase I transcription. *Embo J*, **20**, 1353-1362.
- Ness, P.J., Labhart, P., Banz, E., Koller, T. and Parish, R.W. (1983) Chromatin structure along the ribosomal DNA of *Dictyostelium*. Regional differences and changes accompanying cell differentiation. *J Mol Biol*, **166**, 361-381.
- Nogi, Y., Vu, L. and Nomura, M. (1991) An approach for isolation of mutants defective in 35S ribosomal RNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 7026-7030.
- Nogi, Y., Yano, R. and Nomura, M. (1991) Synthesis of large rRNAs by RNA polymerase II in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in RNA polymerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 3962-3966.
- O'Sullivan, A.C., Sullivan, G.J. and McStay, B. (2002) UBF binding in vivo is not restricted to regulatory sequences within the vertebrate ribosomal DNA repeat. *Mol Cell Biol*, **22**, 657-668.
- Oakes, M., Siddiqi, I., Vu, L., Aris, J. and Nomura, M. (1999) Transcription factor UAF, expansion and contraction of ribosomal DNA (rDNA) repeats, and RNA polymerase switch in transcription of yeast rDNA. *Mol Cell Biol*, **19**, 8559-8569.
- Oakes, M.L., Johzuka, K., Vu, L., Eliason, K. and Nomura, M. (2006b) Expression of rRNA genes and nucleolus formation at ectopic chromosomal sites in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **26**, 6223-6238.
- Oakes, M.L., Siddiqi, I., French, S.L., Vu, L., Sato, M., Aris, J.P., Beyer, A.L. and Nomura, M. (2006a) Role of histone deacetylase Rpd3 in regulating rRNA gene transcription and nucleolar structure in yeast. *Mol Cell Biol*, **26**, 3889-3901.
- Olins, A.L. and Olins, D.E. (1974) Spheroid chromatin units (v bodies). *Science*, **183**, 330-332.
- Peyroche, G., Milkereit, P., Bischler, N., Tschöchner, H., Schultz, P., Sentenac, A., Carles, C. and Riva, M. (2000) The recruitment of RNA polymerase I on rDNA is mediated by the interaction of the A43 subunit with Rn3. *Embo J*, **19**, 5473-5482.
- Piper, P.W., Celis, J., Kalsoft, K., Leer, J.C., Nielsen, O.F. and Westergaard, O. (1976) *Tetrahymena* ribosomal RNA gene chromatin is digested by micrococcal nuclease at sites which have the same regular spacing on the DNA as corresponding sites in the bulk nuclear chromatin. *Nucleic Acids Res*, **3**, 493-505.
- Planta, R.J. (1997) Regulation of Ribosome Synthesis in Yeast. *Yeast*, **13**, 1505-1518.

- Powers, T. and Walter, P. (1999) Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **10**, 987-1000.
- Prescott, E.M., Osheim, Y.N., Jones, H.S., Alen, C.M., Roan, J.G., Reeder, R.H., Beyer, A.L. and Proudfoot, N.J. (2004) Transcriptional termination by RNA polymerase I requires the small subunit Rpl2p. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 6068-6073.
- Prior, C.P., Cantor, C.R., Johnson, E.M., Littau, V.C. and Allfrey, V.G. (1983) Reversible changes in nucleosome structure and histone H3 accessibility in transcriptionally active and inactive states of rDNA chromatin. *Cell*, **34**, 1033-1042.
- Reeder, R.H. (1975) The structure of active ribosomal gene chromatin. *Cell Biol*, **62**, 357.
- Reeves, R. (1976) Ribosomal genes of *Xenopus laevis*: evidence of nucleosomes in transcriptionally active chromatin. *Science*, **194**, 529-532.
- Reeves, R. (1977) Analysis and reconstruction of *Xenopus* ribosomal chromatin nucleosomes. *Eur J Biochem*, **75**, 545-560.
- Reeves, R. (1978a) Structure of *Xenopus* ribosomal gene chromatin during changes in genomic transcription rates. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, **42**, 709-722.
- Reeves, R. (1978b) Nucleosome structure of *Xenopus* oocyte amplified ribosomal genes. *Biochemistry*, **17**, 4908-4916.
- Reeves, R. and Jones, A. (1976) Genomic transcriptional activity and the structure of chromatin. *Nature*, **260**, 495-500.
- Reuter, G. and Spierer, P. (1992) Position effect variegation and chromatin proteins. *Bioessays*, **14**, 605-612.
- Rudra, D. and Warner, J.R. (2004) What better measure than ribosome synthesis? *Genes Dev*, **18**, 2431-2436.
- Russell, J. and Zomerdijs, J.C. (2005) RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works. *Trends Biochem Sci*, **30**, 87-96.
- Sandmeier, J.J., French, S., Osheim, Y., Cheung, W.L., Gallo, C.M., Beyer, A.L. and Smith, J.S. (2002) RPD3 is required for the inactivation of yeast ribosomal DNA genes in stationary phase. *Embo J*, **21**, 4959-4968.
- Santoro, R., Li, J. and Grummt, I. (2002) The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. *Nature Genet*, **32**, 393-396.
- Schawaldner, S.B., Kabani, M., Howald, I., Choudhury, U., Werner, M. and Shore, D. (2004) Growth-regulated recruitment of the essential yeast ribosomal protein gene activator Ifh1. *Nature*, **432**, 1058-1061.
- Schmid, M., Durussel, T. and Laemmli, U.K. (2004) ChIC and ChEC; genomic mapping of chromatin proteins. *Mol Cell*, **16**, 147-157.
- Schnapp, G., Schnapp, A., Rosenbauer, H. and Grummt, I. (1994) TIF-IC, a factor involved in both transcription initiation and elongation of RNA polymerase I. *Embo J*, **13**, 4028-4035.
- Schneider, D.A., French, S.L., Osheim, Y.N., Bailey, A.O., Vu, L., Dodd, J., Yates, J.R., Beyer, A.L. and Nomura, M. (2006) RNA polymerase II elongation factors Spt4p and Spt5p play roles in transcription elongation by RNA polymerase I and rRNA processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 12707-12712.
- Schneider, D.A. and Nomura, M. (2004) RNA polymerase I remains intact without subunit exchange through multiple rounds of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 15112-15117.
- Schotta, G., Ebert, A., Dorn, R. and Reuter, G. (2003) Position-effect variegation and the genetic dissection of chromatin regulation in *Drosophila*. *Semin Cell Dev Biol*, **14**, 67-75.
- Schotta, G., Ebert, A., Krauss, V., Fischer, A., Hoffmann, J., Rea, S., Jenuwein, T., Dorn, R. and Reuter, G. (2002) Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *Embo J*, **21**, 1121-1131.
- Seither, P., Zatzepina, P., Hoffmann, M. and Grummt, I. (1997) Constitutive and strong association of PAF53 with RNA polymerase I. *Chromosoma*, **106**, 216-225.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstone, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A. and Shi, Y. (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, **119**, 941-953.
- Shiio, Y. and Eisenman, R.N. (2003) Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 13225-13230.
- Siddiqi, I., Keener, J., Vu, L. and Nomura, M. (2001b) Role of TATA binding protein (TBP) in yeast ribosomal DNA transcription by RNA polymerase I: defects in the dual functions of transcription factor UAF cannot be suppressed by TBP. *Mol Cell Biol*, **21**, 2292-2297.
- Siddiqi, I.N., Dodd, J.A., Vu, L., Eliason, K., Oakes, M.L., Keener, J., Moore, R., Young, M.K. and Nomura, M. (2001a) Transcription of chromosomal rRNA genes by both RNA polymerase I and II in yeast uaf30 mutants lacking the 30 kDa subunit of transcription factor UAF. *Embo J*, **20**, 4512-4521.
- Smith, J.S. and Boeke, J.D. (1997) An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. *Genes Dev*, **11**, 241-254.
- Sogo, J.M., Ness, P.J., Widmer, R.M., Parish, R.W. and Koller, T. (1984) Psoralen-crosslinking of DNA as a probe for the structure of active nucleolar chromatin. *J Mol Biol*, **178**, 897-919.
- Stanley, C.M., Hymes, J. and Wolf, B. (2004) Identification of alternatively spliced human biotinidase mRNAs and putative localization of endogenous biotinidase. *Mol Genet Metab*, **81**, 300-312.

- Stefanovsky, V.Y., Langlois, F., Bazett-Jones, D., Pelletier, G. and Moss, T. (2006a) ERK modulates DNA bending and enhances some structure by phosphorylating HMG1-boxes 1 and 2 of the RNA polymerase I transcription factor UBF. *Biochemistry*, **45**, 3626-3634.
- Stefanovsky, V.Y., Langlois, F., Gagnon-Kugler, T., Rothblum, L.I. and T., M. (2006b) Growth factor signaling regulates elongation of RNA polymerase I transcription in mammals via UBF phosphorylation and chromatin remodeling. *Mol Cell*, **21**, 629-639.
- Stefanovsky, V.Y., Pelletier, G., Hannan, R., Gagnon-Kugler, T., Rothblum, L.I. and Moss, T. (2001) An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF. *Mol Cell*, **8**, 1063-1073.
- Steffan, J.S., Keys, D.A., Vu, L. and Nomura, M. (1998) Interaction of TATA-binding protein with upstream activation factor is required for activated transcription of ribosomal DNA by RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae* in vivo. *Mol Cell Biol*, **18**, 3752-3761.
- Strahl, B.D. and Allis, C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**, 41-45.
- Strohner, R., Németh, A., Nightingale, K.P., Grummt, I., Becker, P.B. and Längst, G. (2004) Recruitment of the nucleolar remodeling complex NoRC establishes ribosomal DNA silencing in chromatin. *Mol Cell Biol*, **24**, 1791-1798.
- Sun, Z.W. and Allis, C.D. (2002) Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature*, **418**, 104-108.
- Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G. and Nakatani, Y. (2004) Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell*, **116**, 51-61.
- Thevelein, J.M. and de Winde, J.H. (1999) Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, **33**, 904-918.
- Tongaonkar, P., French, S.L., Oakes, M.L., Vu, L., Schneider, D.A., Beyer, A.L. and Nomura, M. (2005) Histones are required for transcription of yeast rRNA genes by RNA polymerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 10129-10134.
- Toussaint, M., Lévassieur, G., Tremblay, M., Paquette, M. and Conconi, A. (2005) Psoralen photocrosslinking, a tool to study the chromatin structure of RNA polymerase I-transcribed ribosomal genes. *Biochem Cell Biol*, **83**, 449-459.
- Tuan, J.C., Zhai, W. and Comai, L. (1999) Recruitment of TATA-binding protein-TAFI complex SL1 to the human ribosomal DNA promoter is mediated by the carboxy-terminal activation domain of upstream binding factor (UBF) and is regulated by UBF phosphorylation. *Mol Cell Biol*, **19**, 2872-2879.
- Vogelauer, M., Cioci, F. and Camilloni, G. (1998) DNA protein-interactions at the *Saccharomyces cerevisiae* 35 S rRNA promoter and in its surrounding region. *J Mol Biol*, **275**, 197-209.
- Voit, R., Kuhn, A., Sander, E.E. and Grummt, I. (1995) Activation of mammalian ribosomal gene transcription requires phosphorylation of the nucleolar transcription factor UBF. *Nucleic Acids Res*, **23**, 2593-2599.
- Voit, R., Schnapp, A., Kuhn, A., Rosenbauer, H., Hirschmann, P., Stunnenberg, H.G. and Grummt, I. (1992) The nucleolar transcription factor mUBF is phosphorylated by casein kinase II in the C-terminal hyperacidic tail which is essential for transactivation. *Embo J*, **11**, 2211-2218.
- Vu, L., Siddiqi, I., Lee, B.S., Josaitis, C.A. and Nomura, M. (1999) RNA polymerase switch in transcription of yeast rDNA: role of transcription factor UAF (upstream activation factor) in silencing rDNA transcription by RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4390-4395.
- Wade, J.T., Hall, D.B. and Struhl, K. (2004) The transcription factor Ifh1 is a key regulator of yeast ribosomal protein genes. *Nature*, **432**, 1054-1058.
- Wahl, G.M., Berger, S.L. and Kimmel, A.R. (1987) Molecular hybridization of immobilized nucleic acids: theoretical concepts and practical considerations. *Methods Enzymol*, **152**, 399-407.
- Wai, H., Johzuka, K., Vu, L., Eliason, K., Kobayashi, T., Horiuchi, T. and Nomura, M. (2001) Yeast RNA polymerase I enhancer is dispensable for transcription of the chromosomal rRNA gene and cell growth, and its apparent transcription enhancement from ectopic promoters requires Fob1 protein. *Mol Cell Biol*, **21**, 5541-5553.
- Wai, H.H., Vu, L., Oakes, M. and Nomura, M. (2000) Complete deletion of yeast chromosomal rDNA repeats and integration of a new rDNA repeat: use of rDNA deletion strains for functional analysis of rDNA promoter elements in vivo. *Nucleic Acids Res*, **28**, 3524-3534.
- Warner, J.R. (1999) The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci*, **24**, 437-440.
- Weintraub, H. and Groudine, M. (1976) Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. *Science*, **193**, 848-856.
- Wellinger, R.E. and Sogo, J.M. (1998) In vivo mapping of nucleosomes using psoralen-DNA crosslinking and primer extension. *Nucleic Acids Res*, **26**, 1544-1545.
- Weth, F. (1993) Geruchsrezeptoren des Zebrafisch - Untersuchungen zur genomischen Repräsentation und Expression. *Universität Tübingen*.
- Yamamoto, R.T., Nogi, Y., Dodd, J.A. and Nomura, M. (1996) RRN3 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an essential RNA polymerase I transcription factor which interacts with the polymerase independently of DNA template. *EMBO J*, **15**, 3964-3973.

- Zaragoza, D., Ghavidel, A., Heitman, J. and Schultz, M.C. (1998) Rapamycin induces the G0 program of transcriptional repression in yeast by interfering with the TOR signaling pathway. *Mol Biol Cell*, **18**, 4463-4470.