

**Die genomweite Expressionsanalyse
von Deletionsmutanten der Gene NHP6A/B und CDC73
in der Hefe *S.cerevisiae***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Katja Kerkmann

aus

Rehren

Köln, 2000

Berichterstatter: Prof. Dr. B. Müller-Hill
Priv. Doz. Dr. Nils Johnsson

Tag der mündlichen Prüfung: 31.10.2000

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	
1.1. Das RNA-Polymerase II- Holoenzym	4
1.2. Promotorstrukturen	6
1.3. Aktivatoren und Mechanismen transkriptioneller Aktivierung	6
1.4. Repressoren und Mechanismen transkriptioneller Repression	7
1.5. Zusammenwirken von Aktivierung und Repression	8
1.6. Nhp6, ein HMG-Protein aus <i>S. cerevisiae</i>	9
1.7. Cdc73, Teil eines alternativen Holoenzym	11
1.8. Die genomweite Expressionsanalyse	11
1.8.1. Die Gen-Chips der Firma Affymetrix	12
1.8.2. Präparation der cRNA-Sonde, Hybridisierung und Analyse	14
1.8.3. Anwendung der genomweiten Expressionsanalyse	15
1.9. Ziel dieser Arbeit	16
2. Material und Methoden	
2.1. Abkürzungen und Akronyme	17
2.2. Material	18
2.3. Methoden	21
3. Ergebnisse	
3.1. Nhp6A/B	26
3.1.1. Genomweite Expressionsanalyse eines NHP6A/B Δ -Stammes	27
3.1.2. Charakterisierung der Regulation von MFA1 und HO durch Nhp6B	43
3.2.1. Genomweite Expressionsanalyse eine CDC73 Δ -Stammes	43
3.2.2. Cdc73 und Nhp6A/B sind gemeinsam an der Genregulation beteiligt	46
4. Diskussion	
4.1. Nhp6A/B	47
4.1.1. Genomweite Expressionsanalyse eines NHP6A/B Δ -Stammes	49
4.1.2. Nhp6B ist direkt an der Regulation des MFA1- und HO-Gens beteiligt	56
4.1.3. Eine Deletion von NHP6A/B beeinflusst das Kreuzungsverhalten	58
4.1.4. Zusammenfassung Nhp6A/B	59
4.2. Cdc73	61
4.2.1. Genomweite Expressionsanalyse eine CDC73 Δ -Stammes	61
4.2.2. Cdc73 und Nhp6A/B überlappen in der Transkriptionsregulation	65
4.2.3. Zusammenfassung Cdc73	65
5. Zusammenfassung der Arbeit	67
Literaturverzeichnis	68
Anhang	80
Abstract	115
Erklärung	116
Danksagung	117

1. Einleitung

Lebende Organismen sind in Ihrer Umwelt einer Vielzahl von Einflüssen ausgesetzt. Um ein Überleben zu gewährleisten, müssen die Organismen auf die Einflüsse reagieren und sich anpassen. Das geht fast immer mit einer Veränderung des Proteinhaushaltes der Organismen einher. Als erster Schritt der Proteinbiosynthese ist die Transkription und ihre Regulation deshalb von fundamentaler Bedeutung für die Anpassung eines Organismus an veränderte Umwelteinflüsse. Die Transkriptionskontrolle ist ausserdem für die Differenzierung und Erhaltung der verschiedenen Zelltypen vielzelliger Organismen essentiell. In dieser Arbeit wurde die Hefe *S. cerevisiae* als Modell-Organismus gewählt, um die Regulation der Transkription in einem eukaryontischen System zu untersuchen.

1.1. Das RNA-Polymerase II- Holoenzym

In den sechziger Jahren wurden drei unterschiedliche DNA-abhängige RNA-Polymerasen aus dem Nukleus isoliert, die in der Lage waren, eine RNA-Kopie von einer DNA-Vorlage zu synthetisieren (Roeder und Rutter, 1969). Das lieferte die Grundlage für Experimente, die dazu dienen sollten, eukaryontische Genexpression zu verstehen.

Die aufgereinigten RNA-Polymerasen waren jedoch *in vitro* nicht in der Lage, Transkription von Promotoren selektiv zu initiieren (Chambon, 1975; Sentenac, 1985). Durch die Fraktionierung von Zellextrakten wurden im Laufe der Zeit Faktoren isoliert, die dazu beitragen, dass RNA-Polymerase II (RNA-Pol II) in der Lage ist, Transkription selektiv zu initiieren. Diese Faktoren wurden als basale oder generelle Transkriptionsfaktoren (GTFs) bezeichnet (Conaway und Conaway, 1997; Hampsey, 1998; Orphanides et al., 1996).

Aufgereinigte RNA-Pol II und die GTFs waren jedoch *in vitro* allein nicht in der Lage, in gleicher Weise auf die Präsenz transkriptioneller Regulatoren zu reagieren, wie es *in vivo* beobachtet worden war. Es wurde nur ein Basalniveau der *in vitro* - Transkription erreicht, das durch die Zugabe von Aktivatoren nicht gesteigert werden konnte (Flanagan et al., 1991). Es deutete sich an, dass neben den GTFs noch

weitere Faktoren existieren müssen, die für die Genregulation im lebenden Organismus notwendig sind.

Durch die Isolierung des Holoenzym (Koleske und Young, 1994) wurden solche zusätzliche Faktoren gefunden. Das Holoenzym enthält neben RNA-Pol II und den GTFs weitere Subkomplexe, wie z.B. den Mediatorkomplex (Myer und Young, 1998). Der Mediatorkomplex setzt sich selbst wiederum aus Subkomplexen zusammen. Einer dieser Subkomplexe konnte *in vitro* aus den Srb-Proteinen Srb2, -4, -5 und -6, sowie Med6 wiederhergestellt werden (Koh et al., 1998). In einem zweiten Subkomplex des Mediators sind Gal11, Sin4, Med3 (Hrs1) und Rgr1 eng miteinander assoziiert (Li et al., 1995; Lee and Kim, 1998).

Das Holoenzym spielt bei der Transkriptionsinitiierung, die an den Promotoren stattfindet, eine wesentliche Rolle.

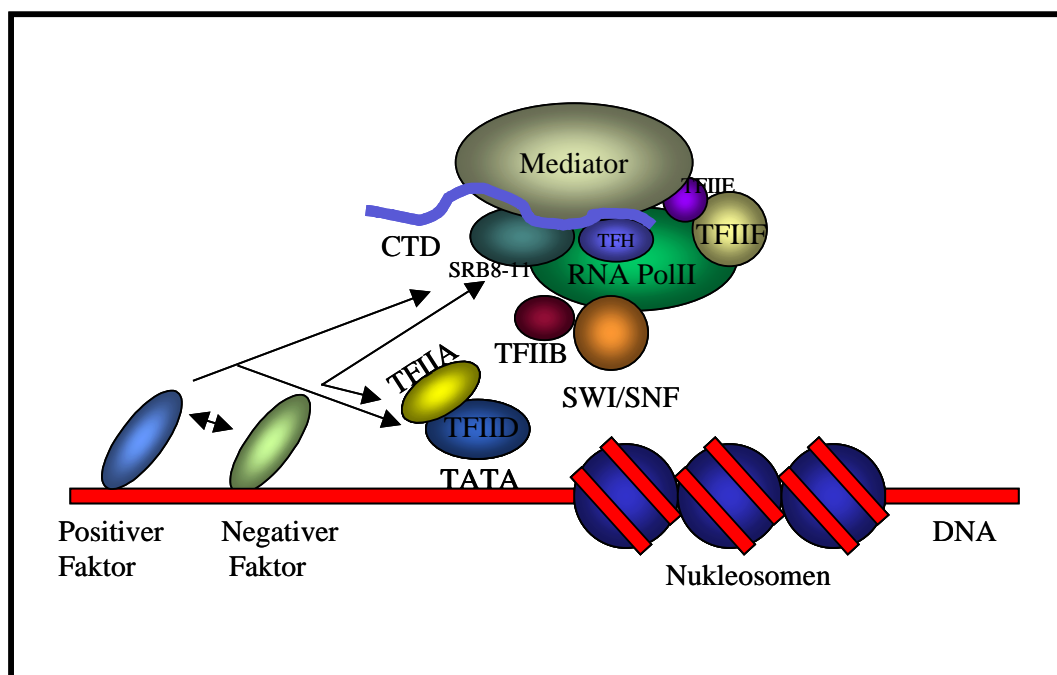


Abb.1.1.1.: Schematische Darstellung des RNA-Polymerase II Holoenzymkomplexes. Es werden das Holoenzym mit seinen Untereinheiten nach Myer and Young, 1998, DNA, Nucleosomen, sowie positive und negative Faktoren der Transkription dargestellt. Außerdem sind Wechselwirkungen zwischen dem Holoenzym und den Transkriptionsfaktoren angedeutet.

1.2. Promotorstrukturen

Es gibt wenigstens drei Charakteristika, die den meisten Promotoren gemeinsam sind. Dabei handelt es sich um den Transkriptionsstartpunkt, die TATA-Box und Sequenzen, die durch transkriptionelle Regulatoren erkannt und gebunden werden.

Es gibt jedoch auch Promotoren, die keine TATA-Box enthalten. In diesen Promotoren ist ein sogenanntes Initiator-Element für die Positionierung des Transkriptionsapparates an den Transkriptionsstartpunkt verantwortlich (Smale und Baltimore, 1989).

Der Transkriptionsstartpunkt und die TATA-Box werden als „Core Promoter“ bezeichnet. Er ist für die Initiation des Basalniveaus der Transkription (Novina und Roy, 1996) ausreichend. Transkriptionelle Regulatoren binden Sequenzen, die zusätzlich zum „Core Promoter“ vorhanden sind. Bei den Sequenzen, die durch die Regulatoren gebunden werden, wird zwischen „Enhancer“ und „Operator“-Sequenzen unterschieden. Ein Enhancer wird durch Aktivator-Proteine gebunden und führt zur Stimulation von Transkription. Es handelt sich dabei um DNA-Sequenzen, deren Orientierung relativ zum Transkriptionsstart nicht relevant ist, und die auch aus einer Distanz von bis zu 85kb Entfernung wirksam sein können (Blackwood und Kadonaga, 1998).

Operator-Sequenzen werden durch Repressoren gebunden, die an der Inhibierung von Transkription beteiligt sind (Struhl, 1999).

1.3. Aktivatoren und Mechanismen transkriptioneller Aktivierung

Da das Basalniveau der Transkription in Eukaryonten sehr gering ist, hat die Aktivierung der Genexpression eine zentrale Bedeutung. Die transkriptionelle Aktivierung von Genen erfolgt in der Regel durch Aktivatoren, die an Sequenzen im Promotor binden, welche oberhalb des „Core Promotors“ liegen und deshalb auch als „upstream activating sequence“ (UAS) bezeichnet werden. Aktivatoren bestehen normalerweise aus zwei Domänen, der DNA-bindenden Domäne und der aktivierenden Domäne, die an der Stimulation der Transkription beteiligt ist (Ptashne und Gann, 1997). Es ist noch nicht genau bekannt, nach welchem Mechanismus

Transkription durch Aktivatoren stimuliert wird. Es gibt jedoch experimentelle Beobachtungen, die verschiedene Modellvorstellungen zulassen.

Es deutet sich an, dass Aktivatoren durch die Rekrutierung von TFIID und des RNA-Pol II-Holoenzym an der Regulation der Genexpression beteiligt sind. So ist es möglich, Transkription durch die artifizielle Rekrutierung von Elementen des Transkriptionsapparates zu initiieren. Werden TBP (Chatterjee und Struhl, 1995; Klages und Strubin, 1995), TFIIB (Gonzales-Couto et al., 1997) oder ein Mediator-Protein (Barberis et al., 1995; Farrell et al., 1996) durch eine Fusion mit einer DNA-bindenden Domäne an einen Promotor gebracht, so wird die Transkription unabhängig von einem klassischen Aktivator stimuliert. Fusioniert man jedoch dagegen eine Aktivierungsdomäne ohne DNA-bindende Domäne an Komponenten des Holoenzym, so erfolgt keine Stimulation der Transkription (Keaveney und Struhl, 1998). Die Aktivierungsdomäne hat keine Wirkung, wenn die DNA des Promotors nicht gebunden wird und dadurch eine Rekrutierung des Holoenzym nicht stattfinden kann.

Die Rekrutierungshypothese wurde durch den Nachweis diverser Protein-Protein-Interaktionen zwischen Aktivatoren und GTFs bzw. Komponenten des RNA-Pol II-Holoenzym gestützt (Drysdale et al., 1998; Hengartner et al., 1995; Ingles et al., 1991; Melcher und Johnston, 1995; Koh et al., 1998).

Neben den GTFs und den Komponenten des RNA-Pol II-Holoenzym sind auch Komplexe, die an der Modifizierung von Chromatin beteiligt sind, potentielle Kandidaten für die Rekrutierung durch Aktivatoren. Es konnte *in vivo* gezeigt werden, dass der Swi/Snf-Komplex am Promotor des HO-Gens durch den transkriptionellen Aktivator Swi5 rekrutiert wird (Cosma et al., 1999). Der Swi/Snf-Komplex ist an der Transkriptionsregulierung durch Veränderung der Nukleosomenstruktur beteiligt. Es wurde nachgewiesen, dass der Swi/Snf-Komplex in der Lage ist, Repression durch eine Veränderung der Nukleosomenstruktur aufzuheben (Kingston und Narkilar, 1999).

1.4. Repressoren und Mechanismen transkriptioneller Repression

Die Repression von Genen ist in der Zelle von gleicher zentraler Bedeutung, wie die Aktivierung von Genen. So müssen für die korrekte Differenzierung von Zellen

Gene reprimiert werden, während andere Gene aktiv sind. In *S. cerevisiae* ist das für die Gene des „Mating-Type“ der Fall. So sind z.B. die α -spezifischen Gene aus *S. cerevisiae* in einer α - Zelle reprimiert, während die α -spezifischen Gene exprimiert werden (Herskowitz, 1988).

Bei den Repressoren unterscheidet man zwischen den generellen und den genspezifischen Repressoren. Viele der generellen Repressoren wirken durch eine Interaktion mit dem TATA-Box-bindenden Protein (TBP) (Lee und Young, 1998). Ein Beispiel für einen solchen Repressor ist Mot1, der einen Teil der durch RNA-Pol II transkribierten Gene durch eine Interaktion mit TBP reprimiert. Die Interaktion bewirkt eine ATP-abhängige Dissoziation von TBP und DNA (Auble et al., 1997), wodurch die Initiation der Transkription verhindert wird.

Die genspezifischen Repressoren wirken dagegen oftmals durch eine Interaktion mit Aktivatoren oder durch Belegen der Aktivator-Bindestellen im Promotor. So reprimiert der transkriptionelle Repressor Gal80 durch die Bindung eines Teils der Aktivierungsdomäne von Gal4 (Leuther und Johnston, 1992; Ma und Ptashne, 1987) und der Repressor Acr1 bindet Sequenzen, die mit den Sequenzen überlappen, die durch den Aktivator Atf/CREB gebunden werden (Vincent und Struhl, 1992).

Die Gruppe der genspezifischen Repressoren beinhaltet auch Co-Faktoren, wie den Tup1/Ssn6-Komplex, der durch DNA-bindende Faktoren an spezifische Promotoren rekrutiert wird. Der Tup1/Ssn6-Komplex reprimiert durch die Interaktion mit Komponenten des Transkriptionsapparates oder des Chromatins (Carlson, 1997).

1.5. Zusammenwirken von Aktivierung und Repression

Verschiedenen Experimente aus der Vergangenheit lassen die Hypothese zu, dass die koordinierte Genregulation ein Zusammenspiel von positiven und negativen Regulatoren bedeutet. Es konnte in genetischen „Screens“ gezeigt werden, dass der Funktionsverlust eines negativen Regulators für den Funktionsverlust eines positiven Regulators kompensieren kann. So konnte z.B. eine Mutation in SRB4, die einen temperatursensitiven Phänotyp zeigte, durch einen Funktionsverlust von Nc2 kompensiert werden (Lee et al., 1998). Srb4 ist eine essentielle Komponente des RNA-Pol II-Holoenzym und Interaktionspartner wenigstens eines transkriptionellen Aktivators (Koh et al., 1998). Nc2 ist ein genereller Repressor, der mit DNA-

gebundenem TBP interagiert und so RNA-Pol II oder den generellen Transkriptionsfaktor TFIIB an der Bildung eines Initiationskomplexes hindert (Goppelt et al., 1996; Kim et al., 1995).

1.6. Nhp6, ein HMG-Protein aus *S.cerevisiae*

Die „High Mobility Group“-Proteine (HMG-Proteine) sind neben den Histonen die am häufigsten vorkommenden Proteine, die mit Chromatin assoziiert sind (Read et al., 1995; Bustin und Reeves, 1996). Die Familie der HMG-Proteine kann in zwei Gruppen unterteilt werden, die durch ihre Aminosäuresequenz definiert sind (Bustin et al., 1990). Man unterscheidet die sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren, repräsentiert durch SRY (Goodfellow und Loevell-Badge, 1993; Haqq et al., 1994) und die nicht-sequenzspezifischen chromosomalen Proteine, repräsentiert durch HMG1/2 (Bianchi et al., 1992). Die beiden Gruppen haben gemeinsam, dass sie DNA durch die ca. 80AS umfassende HMG-Box binden. Darüber hinaus sind ihre Funktionen jedoch sehr unterschiedlich.

Die HMG-Transkriptionsfaktoren sind weniger häufig. Sie sind auf wenige Zelltypen beschränkt, enthalten normalerweise nur eine HMG-Box und funktionieren durch die sequenzspezifische Bindung von DNA in den Promotorregionen der regulierten Gene (Grosschedl et al., 1994).

Im Gegensatz dazu stehen die HMG1/2-Proteine, die meistens zwei oder mehrere HMG-Boxen enthalten und die DNA nicht sequenzspezifisch binden. Sie wirken daran mit, DNA-Rekombination oder die Aktivierung (Shykind et al., 1995), sowie die Repression (Ge und Roeder, 1994) von Transkription zu erleichtern. Sie interagieren direkt mit den Nukleosomen (Nightingale et al., 1996) und sind möglicherweise an der Veränderungen der Chromatin-Struktur beteiligt (Bustin und Reeves, 1996).

Das chromosomale Nicht-histon-Protein Nhp6 aus *S.cerevisiae* gehört ebenfalls zur Familie der HMG-Proteine. Es wurden zwei homologe Nhp6-Proteine aus Hefe isoliert, die als Nhp6A und Nhp6B bezeichnet wurden (Kolodrubetz und Burgum, 1990) und beide eine HMG-Box enthalten (Yen et al., 1998). Die Aminosäuresequenzen von Nhp6A und B sind zu 87% identisch. Daneben besitzt Nhp6B im Vergleich zu Nhp6A sechs zusätzliche Aminosäuren am Aminoterminal.

Die Größe des Proteins von Nhp6A und B beträgt ca. 11 kDa (Kolodrubetz und Burgum, 1990) und sie enthalten eine HMG-Box (Yen et al., 1998). Weder eine Deletion von NHP6A, noch eine Deletion von NHP6B zeigt eine Veränderung des Phänotyps. Es konnte gezeigt werden, dass Hefen mit einer Einzeldelation von NHP6A oder B normal wachsen. Sind jedoch die Gene für beide Proteine deletiert, so führt das zu einem verlangsamten Wachstum bei 30°C, bzw. Temperatursensitivität bei 36°C (Costigan et al., 1994).

Der aminoternale Teil von Nhp6A spielt eine wichtige Rolle für seine biologische Funktion. Wird der aminoternale Teil von Nhp6A deletiert, so kann der Wachstumsphänotyp einer NHP6-Doppeldelation nicht komplementiert werden, und es ist nicht mehr in der Lage, einen Komplex mit DNA zu bilden (Yen et al., 1998).

Für Nhp6A konnte gezeigt werden, dass es zusammen mit Msn1 an der Swi6-abhängigen Transkription des HO-Gens beteiligt ist (Sidorova und Breeden, 1999).

In weiteren Experimenten deutete sich an, dass die HMG-Proteine Nhp6A und B eine zentrale Bedeutung in der Transkriptionsaktivierung der Gene CUP1, CYC1, GAL1 und DDR2 haben (Paull et al., 1996). Es wurde beobachtet, dass die basale Expression der Gene in einem Stamm, der eine Doppeldelation für NHP6A und B trug, kaum verändert war. Im Gegensatz dazu war das Expressionsniveau der entsprechenden Promotor-Fusionen (CUP1-lacZ; CYC1-lacZ; GAL1-lacZ und PHO5-lacZ) unter induzierten Bedingungen wesentlich geringer. Es fand keine Aktivierung statt. Für eine GAL1-lacZ-Fusion wurde in einem NHP6-Doppeldelationsstamm eine 65-fach geringere Aktivierung beobachtet, als im WT (Paull et al., 1996).

In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass Nhp6B sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* mit Gal4 interagiert (Laser, 2000). Die Interaktion hat eine Relevanz für die Regulation des GAL1-Promotors. So ist die Interaktion zwischen der Aktivierungsdomäne von Gal4 und Nhp6B an der Aktivierung des GAL1-Promotors beteiligt, während Nhp6A/B neben Tup1 für die Repression von GAL1 nötig ist (Laser, 2000).

Die Beteiligung von Nhp6A/B an der Repression durch den generellen Repressor Tup1 ist jedoch promotorspezifisch und nicht generell. Nhp6A/B ist nicht an der Repression von MFA1, das in einem α -*S.cerevisiae*-Stamm durch Tup1 reprimiert wird (DeRisi et al., 1997), beteiligt (Laser, 2000).

Durch eine genomweite Expressionsanalyse eines NHP6A/B-Deletionsstammes sollte untersucht werden, welche Rolle Nhp6A/B in der Regulation des Genoms von *S. cerevisiae* spielt.

1.7. Cdc73, Teil eines alternativen Holoenzym

Cdc73 wurde als Teil eines RNA-Pol II -Komplexes beschrieben, der Cdc73, Paf1, Ccr4, Hpr1, Gal11, Sin4 und Rgr1 enthält. In diesem Komplex fehlen jedoch viele der Komponenten des Srb/Mediator-Komplexes, wie Srb2, -4, -5 oder -6 (Chang und Jaehning, 1997; Chang et al., 1999; Shi et al., 1997).

Es wurde das Modell aufgestellt, dass der beschriebene Komplex eine alternative Form des RNA-Pol II-Holoenzym darstellt, der neben der vorher beschriebenen und wahrscheinlich häufiger vorkommende Form des RNA-Pol II Holoenzym (Koleske und Young, 1994) existiert.

In diesem Modell soll das Srb/Mediator-enthaltende Holoenzym an der Initiation der Mehrheit der Gene beteiligt sein, während die alternative Form des Holoenzym für Transkription einer kleinen Fraktion von Genen verantwortlich sein soll, die mit der anderen Fraktion überlappen kann (Chang et al., 1999).

Die Transkription von 95% der Gene aus *S. cerevisiae* ist von einem RNA-Pol II-Holoenzym abhängig, das SRB4 enthält (Holstege et al., 1998).

Es war deshalb von großem Interesse, eine genomweite Analyse der Genexpression in einem CDC73 Δ -Stamm durchzuführen, die einen Einblick in die Beteiligung von Cdc73 an der Regulation des Genoms von *S. cerevisiae* gewähren sollte.

1.8. Die genomweite Expressionsanalyse

Nach der Sequenzierung des Genoms von *S. cerevisiae* ist der nächste Schritt die Charakterisierung der biologischen Rolle der Gene und der Art und Weise, wie die kodierten Proteine an zellulären Prozessen mitwirken. Dazu ist es zunächst notwendig, die Möglichkeit zu haben, das Expressionsniveau einer großen Zahl von Genen zu untersuchen.

Es wurden für *S. cerevisiae* verschiedene Methoden veröffentlicht, die es erlauben, die Genexpression einer Vielzahl von Genen gleichzeitig zu untersuchen (Burns et al., 1994; Shevchenko et al., 1996; Richard et al., 1997 und Lashkari et al., 1997). In dieser Arbeit wurde die Methode der Firma Affymetrix benutzt, um eine genomweite Expressionsanalyse in *S. cerevisiae* durchzuführen.

1.8.1. Die Gen-Chips der Firma Affymetrix

Die Methode der Firma Affymetrix bestimmt das mRNA-Niveau durch die Hybridisierung einer kompletten mRNA-Population aus Hefe mit Gruppen von Oligonukleotiden, die jedes offene Leseraster aus Hefe repräsentieren. Das Genom von *S. cerevisiae* ist dabei auf vier Chips aufgeteilt.

Im Gegensatz zu den Methoden bei denen DNA auf eine Chip-Grundlage getupft wird, werden die Oligonukleotide von Affymetrix auf der Chip-Grundlage synthetisiert (Fodor et al., 1991; Pease et al., 1994 und Chee et al., 1996).

Die Oligo-Nukleotide werden in mehreren Zyklen synthetisiert (Abb. 1.8.1.1). Im ersten Schritt werden Linker auf die Chip-Grundlage aufgetragen, die eine Bindung mit Nukleotiden eingehen können, wenn sie mit ultraviolettem Licht bestrahlt werden. Die Linker werden im nächsten Schritt mit einer Maske abgedeckt, die nur an bestimmten Stellen lichtdurchlässig ist. Danach wird der Chip mit ultraviolettem Licht bestrahlt, wodurch die exponierten Linker aktiviert werden. Im Anschluss daran werden die ersten Nukleotide zugegeben, die an den bestrahlten Stellen eine Bindung mit den Linkern eingehen. Die Nukleotide können wiederum selbst nur nach einer Bestrahlung mit ultraviolettem Licht Bindungen mit weiteren Nukleotiden eingehen. Durch die Wiederholung des beschriebenen Ablaufs können die Nukleotide für die Synthetisierung verschiedener Oligonukleotide zugegeben werden (McGall et al., 1996).

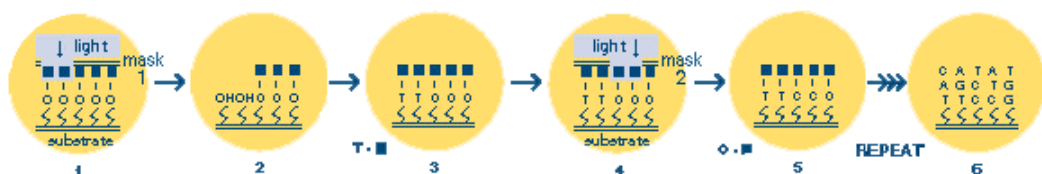


Abb.1.8.1.1.: Schematische Darstellung der Oligonukleotid-Synthese auf einer Chip-Grundlage nach Affymetrix Inc. (<http://www.affymetrix.com>).

Auf den DNA-Chips der Firma Affymetrix werden auf diese Weise Oligonukleotide hergestellt, die spezifisch für jedes Gen aus *S. cerevisiae* sind.

Das Genom von *S. cerevisiae* ist auf vier DNA-Chips mit einer Größe von 1,28x 1,28 cm² präsentiert.

Die Sequenzen-Informationen für die offenen Leseraster wurden der Saccharomyces Genome Database (<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>) entnommen. Jedes offene Leseraster ist durch 20 Oligonukleotide repräsentiert, die jeweils 25bp lang sind. Die Sequenzen wurden nach Kriterien ausgesucht, die sicherstellen, dass die Oligonukleotide spezifisch für das jeweilige offene Leseraster sind, und dass es keine Sequenzen sind, die einer Hybridisierung entgegenwirken, wie es z.B. für Haarnadelstrukturen der Fall ist. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind den ersten 1000bp vom 3'-Ende der offenen Leseraster komplementär. Ein Oligonukleotid wird als spezifisch bezeichnet, wenn von den 25bp nicht mehr als 21bp mit irgendeinem anderen Teil des Hefegenoms gleich sind.

Jedes offene Leseraster ist durch 20 Oligonukleotiden auf dem Chip repräsentiert (Abb.1.8.1.2). Es wird dadurch die Spezifität der Analyse gewährleistet. Die Effekte gelegentlicher Kreuzhybridisierungen zwischen mRNA und Oligonukleotiden unterschiedlicher Gene werden auf diese Weise gemildert. Des Weiteren ist für jedes spezifische Oligonukleotid („perfect match“(PM)) ein unspezifisches Oligonukleotid („mismatch“(MM)) auf dem Chip enthalten. Die beiden Oligonukleotide unterscheiden sich in einer Position in der Mitte ihrer Sequenz voneinander. Das unspezifische Oligonukleotid ist eine interne Kontrolle, die es erlaubt, Aussagen über die Qualität des Signals zu machen. So muss die Summe der Signale nach einer Hybridisierung mit cRNA für die spezifische Probe größer sein, als die Summe der Signale für die unspezifische Probe, wenn die Hybridisierung spezifisch sein und gewertet werden soll.

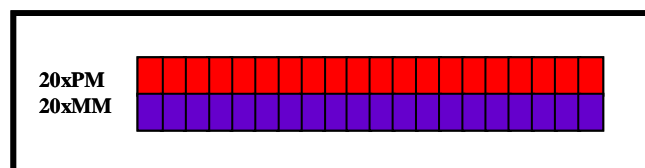


Abb.1.8.1.2.: Jedes offene Leseraster ist durch 20 spezifische Oligonukleotide (PM) und 20 unspezifische Oligonukleotide (MM) repräsentiert.

Die Verwendung kurzer Oligonukleotide erlaubt die Unterscheidung von Genen, die auf DNA-Ebene eine große Homologie zeigen, da die Hybridisierung mit kleinen Fragmenten der Gene stattfindet (Wodicka et al., 1997).

1.8.2. Präparation der cRNA-Sonde, Hybridisierung und Analyse

Für die genomweite Expressionsanalyse wird zelluläre mRNA isoliert, die zunächst in doppelsträngige cDNA umgewandelt wird, um dann in einer *in vitro*-Transkriptionsreaktion in komplementäre RNA (cRNA) umgeschrieben zu werden, die mit Biotin markiert ist.

Diese Vorgehensweise erlaubt die reproduzierbare Amplifikation der kompletten mRNA-Population. Dabei wird die mRNA in der *in vitro*-Transkriptionsreaktion ca. 20-200-fach amplifiziert.

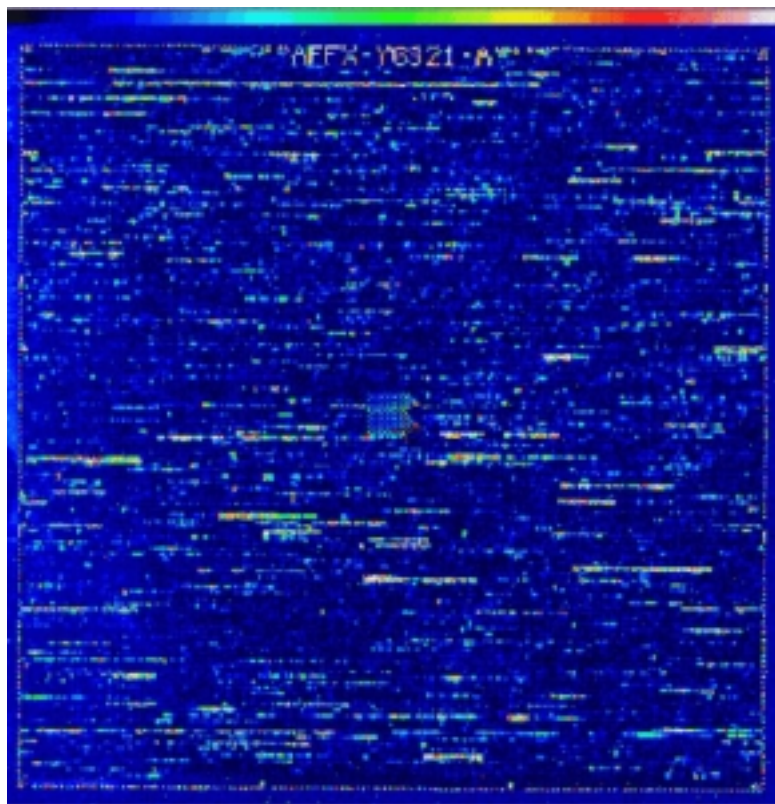


Abb.1.8.2.1.: Diese Abbildung zeigt einen hybridisierten und gefärbten Chip der Firma Affymetrix.

Wenn ausreichend Startmaterial vorhanden ist, kann die mRNA auch direkt für die Hybridisierung eingesetzt werden. Durch den Amplifikationsschritt ist es jedoch möglich, die Hybridisierung mit einer minimalen Ausgangsmenge an mRNA durchzuführen (Wodicka et al., 1997). Vor der Hybridisierung wird die cRNA fragmentiert, um die Effizienz und die Spezifität der Hybridisierung zu erhöhen, sowie zu verhindern, dass es durch die Bildung von Sekundärstrukturen der cRNA zu Problemen bei der Hybridisierung kommt.

Nach der Hybridisierung werden die DNA-Chips gewaschen, um nicht hybridisierte oder nur schwach hybridisierte mRNA zu entfernen. Die gebundene cRNA wird mit einem Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat gefärbt (Abb.1.8.2.1.) und die Signale werden mit einem Hewlett-Packard(HP) GeneArray™ Scanner bei einer Wellenlänge von 488nm gelesen (Affymetrix GeneChip Expression Analysis Manual, Affymetrix, St.Clara, CA).

Die Analyse der Werte für die Signale auf den Chips erfolgte mit Hilfe eines Programms aus einer Datenbank, die im Labor Young entwickelt wurde (<http://web.wi.mit.edu/young>).

1.8.3. Anwendung der genomweiten Expressionsanalyse

Eine genomweite Expressionsanalyse mit DNA-Chips der Firma Affymetrix, wie sie hier beschrieben wurden, kann für verschiedenste Zwecke angewendet werden. So kann mit Hilfe der genomweiten Expressionsanalyse eine Charakterisierung von Hefe durchgeführt werden, die unter verschiedenen Bedingungen, in der Gegenwart von Chemikalien, anderen Stressfaktoren oder mit Mutationen und Gen-Deletionen herangezogen wurden. Experimente dieser Art können *in vivo* einen umfassenden Einblick in Gen-Funktionen und Beziehungen zwischen Genen liefern.

1.9. Ziel dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel eine genomweite Expressionsanalyse von Deletionsmutanten der Gene NHP6A/B und CDC73 durchzuführen. Es sollte zum einen geklärt werden, welchen Einfluss eine Deletion von NHP6 und CDC73 auf die Genexpression von *S. cerevisiae* in Vollmedium hat und zum anderen sollte anhand von ausgesuchten Genen *in vivo* und *in vitro* untersucht werden, ob die Regulation der Gene durch Nhp6A/B oder Cdc73 direkt oder indirekt erfolgt.

2. Material und Methoden

2.1. Abkürzungen und Akronyme

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cRNA	komplementäre RNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FOA	5-Fluororotsäure
FS-DNA	“fish-sperm“ DNA
HA	Hämagglutinin
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N’- (2-ethansulfonsäure)
kb	Kilobasen
mat	“mating type“
min	Minute
MT	Mutante
mRNA	“messenger“-RNA
OD	Optische Dichte
ORF	“open reading frame“
PBS	“Phosphate buffered saline“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat

std	Stunden
TBP	„TATA binding protein“
TE	Tris/EDTA Lösung
Ü/N	Übernacht
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

2.2. Material

Methoden, die aus einschlägigen Laborbüchern (Ausubel et al., 1998; Sambrook et al., 1989) oder zitierten Referenzen unverändert übernommen wurden, werden hier nicht im Detail beschrieben. Im Folgenden werden die Methoden kurz beschrieben.

2.2.1. Chemikalien, Nährmedien , Enzyme, Kits und Radioisotope

Chemikalien und Kits:

Im Labor Lehming stammten Chemikalien und Kits von folgenden Firmen: Amersham, Braunschweig; BIOMOL Feinchemikalien GmbH, Hamburg; Boehringer GmbH, Mannheim; Life Technologies GmbH, Eggenstein; Merck KGaA, Darmstadt; Pharmacia, Freiburg; Promega GmbH, Mannheim; Qiagen GmbH, Hilden; Roche, Mannheim; Roth GmbH, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma, Deisenhofen; Wak-Chemie, Bad Homburg.

Im Labor Young stammten Chemikalien und Kits von folgenden Firmen: Ambion Inc., Austin, Texas; Boehringer, Mannheim; Dynal, Great Neck, New York; ENZO Diagnostics Inc., Farmingdale; Life Technologies GmbH, Eggenstein; Qiagen, Valencia, Kalifornien; Sigma, Saint Louis, Missouri.

Enzyme:

Im Labor Lehming wurden die verwendeten Enzyme von folgenden Firmen bezogen: Boehringer GmbH, Mannheim; Life Technologies, Eggenstein; MBI Fermentas, St.-Leon-Rot; New England Biolabs, Schwalbach; Promega GmbH, Mannheim.

Im Labor Young wurden die verwendeten Enzyme von folgenden Firmen bezogen: Ambion Inc., Austin, Texas; Boehringer, Mannheim; Life Technologies GmbH, Eggenstein;

Komponenten der Nährmedien:

Die Komponenten der Nährmedien wurden von den Firmen GIBCO BRL (Neu Isenburg) und DIFCO (Detroit, USA) bezogen.

2.2.2. Oligonukleotide

Oligonukleotide für PCR-Reaktionen wurden von den Firmen Metabion, München und Life Technologies, Eggenstein bezogen.

2.2.3. Radioisotope

Die ³²P markierten Radioisotope wurden von Amersham Buchler, Braunschweig geliefert.

2.2.4. Medien und Platten

Es wurden Standard-Platten und -Medien verwendet:

LB-Medium (Ausubel et al., 1998), ggf. mit Zusatz von 200mg/l Ampicillin.

YPD-Medium (Sherman, 1991), ggf. mit Zusatz von 2% [w/v] Galaktose anstatt Glukose.

Dropout-Medium (Sherman, 1991), ggf. mit Zusatz von separat gelöstem und sterilfiltriertem FOA zu einer Endkonzentration von 0,5g/l (Boeke et al., 1987).

2.2.5. Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen wurden wie in den Referenzen zu den jeweiligen Methoden angegeben, hergestellt. Besonderheiten und Abweichungen sind an entsprechender Stelle vermerkt.

2.2.6. Bakterien- und Hefestämme

Es wurden folgende Bakterienstämme verwendet:

E. coli MM294: F⁻ *hsdr17*(r_k⁻m_k⁻)*supE44 thi-1 relA1? rfbD1? spoT1?* für Klonierungen und DNA Präparationen.

E. coli DH5 α (Clontech): *deoR, endA1, gyrA96, hasdR17*(r_k⁻m_k⁺), *recA1, relA1 supE44, thi-1, Δ (lacZYA-argRV169), f801lacZ Δ M15, F⁻*

DH5 α ist ein rekombinationsdefizienter Bakterienstamm, der vor allem für die Klonierung und Amplifizierung von DNA benutzt wurde.

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

Es wurden folgende Hefestämme verwendet:

S. cerevisiae JD52 und JD53 (Dohmen et al., 1995): *mata* bzw. *mat α ura3-52, leu2-3,-112his3, Δ 200lys2-801, trp1 Δ 63*

S. cerevisiae JD52 und JD53 Δ NHP6 (N.Lehming): *mata* bzw. *mat α ura3-52 leu2-3,-112his3, Δ 200lys2-801, trp1 Δ 63, NHP6::*hisG*, sowie Derivate in deren MFA1-Lokus eine MFA1-LacZ-Fusion integriert wurde.*

S. cerevisiae JD52 Δ CDC73 (N.Lehming): *mata ura3-52 leu2-3,-112his3, Δ 200lys2-801, trp1 Δ 63, CDC73::*hisG**

2.3. Methoden

2.3.1. Transformationen

Bakterientransformationen:

Die Transformation von DNA in *E. coli* erfolgte nach der Methode der Hitzeinduktion (Hanahan, 1983) oder durch Elektroporation (Taketo, 1988).

Hefetransformationen:

Die Transformation von Hefe erfolgte nach der Lithium-Acetat-Methode (Gietz et al., 1992).

2.3.2. DNA- Isolation

Plasmid-DNA aus *E.coli* wurde im Mini-Präparations-Maßstab mit den Lösungen aus dem WizardTM Minipreps DNA Purification System (Serva, Heidelberg) isoliert. 1,5ml-Kulturen der transformierten *E. coli*-Zellen wurden entsprechend dem Protokoll *Production of a Cleared Lysate* des Herstellers behandelt, dann aber mit Isopropanol gefällt, das Sediment mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in Wasser aufgenommen. In größeren Mengen durch Reinigung über einen CsCl Dichtegradienten (Bauer und Vinograd, 1968) gewonnen.

2.3.3 Genomweite Expressionsanalyse

Hefestämme, Medien und Kulturbedingungen:

S. cerevisiae JD52, JD52 Δ NHP6 und JD52 Δ CDC73 wurden über Nacht in Galaktose-Medium (YP-Galaktose) kultiviert und danach vier Stunden in 200 ml YPD-Medium bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 herangezogen.

Herstellung der cRNA-Sonde, Hybridisierung und Analyse der Signale:

Aus der Hefe wurde biotin-markierte cRNA als Sonde für die Hybridisierung der DNA-Chips (Ye6100Set, Affymetrix, Santa Clara, Kalifornien) hergestellt (Holstege et al., 1998). Dafür wurde zunächst Gesamt-RNA mittels der „Hot Phenol-Method“ (Schmitt et al., 1990) aus den Hefezellen präpariert. Im Anschluss daran wurde mit Hilfe des Oligotex mRNA-Kits (Qiagen, Valencia, Kalifornien) mRNA isoliert. Die mRNA wurde in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde das Superscript Choice System (Gibco BRL, Life Technologies; Eggenstein) benutzt. Im nächsten Schritt wurde eine *in vitro* Transkription mit Hilfe des Ambion MEGA Script Systems (Ambion Inc., Austin, Texas) durchgeführt, wobei biotin-markierte cRNA hergestellt wurde. Für die Biotinmarkierung wurde Bio-11-CTP und Bio-16-UTP (Enzo Diagnostics Inc., Farmingdale) verwendet.

Für die Hybridisierung wurde die biotinmarkierte cRNA in kleinere Fragmente zerteilt. Die Fragmentierung wurde in einem Fragmentierungspuffer (40mM Tris-Acetat pH8,1, 100mM KOAc, 30mM MgOAc) durchgeführt. Es wurde 35 min bei 95°C inkubiert. Die Hybridisierung erfolgte im Hybridisierungspuffer (0,1µg/µl Heringsperma-DNA (Promega), 0,045µM Kontroll-RNA (Gene-Chip Expression Analysis Overview, Kapitel 4) 0,5µg/µl acetyliertes BSA, 1x STT Puffer (1M NaCl, 10mM Tris pH7,6, 0,005% TritonX-100)) und wurde 16 Std. bei 45°C durchgeführt. Direkt im Anschluss auf die Hybridisierung folgten automatisierte Waschschritte in den „Fluidics Stations“ der Fima Affymetrix. Es wurde mit stringentem Waschpuffer (100mM MES, 0,1M [Na⁺], 0,01% Tween 20) und nicht-stringentem Waschpuffer (6x SSPE (20xSSPE: 3M NaCl, 0,2M NaH₂PO₄, 0,02M EDTA) , 0,01% Tween 20, 0,005% Anti-Schaum) gewaschen. Nach den Waschgängen wurde die hybridisierte RNA auf den Chips gefärbt. Der Färbeschritt erfolgte im Färbepuffer (100mM MES, 1M [Na⁺], 0,05% Tween 20, 0,005% Anti-Schaum), in Gegenwart von 2mg/ml acetyliertem BSA und 10µg/ml des Farbstoffs Streptavidin phycoerythrin (SAPE).

Nach dem Färben wurde die Intensität der Signale auf den Chips mit Hilfe eines Scanners gemessen (Wodicka et al., 1997). Dazu wurde die „GenChip“-Software der Firma Affymetrix benutzt, das für jedes Gen aus der Intensität der Signale einen einzelnen Wert berechnet. Die Werte wurden mit Hilfe einer Datenbank ausgewertet, die im Labor Young entwickelt wurde (<http://web.wi.mit.edu/young>).

Datenanalyse:

Die Werte von den Chips wurden normalisiert und korrigiert (Holstege et al., 1998). Damit ein Ergebnis als signifikant bezeichnet wurde, mussten folgende Bedingungen erfüllt sein:

1. Entweder konnte das Gen in allen vier Genomen untersucht werden, oder die Ergebnisse beider Experiment-Duplikate waren gleich.
2. Die Differenz der gemessenen absoluten Werte der Signale auf den Chips zwischen WT und MT musste größer als $OD_{488} 10$ sein.
3. Die Verhältnis der Veränderung der Genexpression zwischen WT und MT musste für beide Experiment-Duplikate größer als zweifach sein.

2.3.4. Chromatin-Immunopräzipitation

Die Chromatin-Immunopräzipitation wurde nach (Cosma et al., 1999) durchgeführt. Die Immunopräzipitation erfolgte mit einem HA-Antikörper.

Verwendete Stämme

S. cerevisiae JD52 (Dohmen et al., 1995);

S. cerevisiae JD52 Δ NHP6::YIplac128-HA-NHP6B+/-0,5 (N.Lehming);

S. cerevisiae JD52 Δ CDC73::YIplac128-HA-CDC73+/-0,5 (N.Lehming).

Anzucht der Zellen und Immunopräzipitation

Die Zellen wurden bei 30°C bis zu einer OD_{600} von 0,6-0,8 herangezogen. Dann wurden die Bindungen zwischen Proteinen und DNA durch die Zugabe von 1% Formaldehyd fixiert. Es folgten drei Waschschriffe mit TBS-Puffer (20mM TrisHCl pH7, 150mM NaCl) und im Anschluss daran wurden die Zellen mit Hilfe von Glaskugeln in einem Lyse-Puffer (50mM HEPES-KOH pH7,5, 140mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,1% Na-deoxycholat, 1mM PMSF, 1mM Benzamidin, 10 μ g/ml Aprotinin, 1 μ g/ml Leupeptin, 1 μ g/ml Pepstatin) aufgebrochen. Das Lysat wurde durch eine Ultraschallbehandlung in ca. 400bp lange Fragmente zerbrochen. Auf die Ultraschallbehandlung folgte die Immunopräzipitation der DNA, die an das HA-Hybridprotein gebunden hatte. Dazu wurden magnetischen Kügelchen (Dynal)

benutzt, die mit einem HA-Antikörper beschichtet waren. Die DNA wurde zusammen mit den magnetischen Kügelchen Ü/N bei 4°C inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Kügelchen mit Lyse-Puffer, Lyse-Puffer+360mM NaCl, Waschpuffer (10mM Tris/HCl pH8,0, 250mM LiCl, 0,5% NP40, 0,5% Nadeoxycholat, 1mM EDTA) und mit TE (10mM Tris/HCl pH 8,0, 1mM EDTA) gewaschen.

Isolierung der immunopräzipitierten DNA

Die DNA wurde durch eine Inkubation von 10 min bei 65°C in Elutionspuffer (50mM TrisHCl pH 8,0, 10mM EDTA, 1% SDS von den magnetischen Kügelchen getrennt. Im Anschluss daran folgte die Trennung von Proteinen und DNA durch Zugabe von TE/SDS (10mM Tris/HCl pH 8,0, 1mM EDTA, 1% SDS) und einer Inkubation Ü/N bei 65°C. Danach wurden die Proteine durch eine 2 std Inkubation bei 37°C in einem „Proteinase K-Mix“ (1µg/µl Proteinase K in TE) verdaut. Die DNA wurde daraufhin mit einem zweifachen Volumen Ethanol gefällt und mit 70% Ethanol gewaschen. Es folgte eine einstündige RNase A-Behandlung in TE (0,33µg/µl RNase A) bei 37°C.

2.3.5. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR erfolgte nach (Mullis, 1986) mit Hilfe des Expand High Fidelity PCR Systems (Boehringer GmbH, Mannheim), das nach dem Protokoll des Herstellers verwendet wurde.

2.3.6. Ermittlung der β-Galaktosidase-Aktivität aus *S.cerevisiae*

Für die Ermittlung der β-Galaktosidase-Aktivität wurden Hefekulturen bei 30°C in Flüssigmedium bis zu einer OD₆₀₀ herangezogen. Anschließend wurde die β-Galaktosidase-Aktivität bestimmt (Ausubel et al., 1998).

Die Enzymaktivität ergibt sich aus:

$$U = 10^4 \times \frac{OD_{420} \times \mu\text{l}_{\text{Protein}}}{\Delta t(\text{min}) \times OD_{595} \times \mu\text{l}_{\beta\text{-GAL}}}$$

Die in der Arbeit angegebenen Werte wurden aus mindestens drei unabhängigen Messungen gemittelt.

2.3.7. Elektromobilitäts-Bindungs-Assay (EMSA)

Zur Analyse der DNA-Bindungen von NHP6B wurde ein EMSA durchgeführt (Sidorova und Breeden, 1993). Die Bindereaktionen wurden in 20µl Bindungspuffer (25mM Tris/HCl pH8,0), 10% Glycerin, 50mM NaCl, 3mM MgCl₂) durchgeführt. Es wurde aufgereinigtes Protein für die Bindereaktion verwendet.

2.3.8. Protein-Präparation

Das entsprechende Gen wurde im Leseraster in den Expressionsvektor pGEX5X-1 (Pharmacia, Freiburg) kloniert und im Bakterienstamm BL21 (DE3) LysS exprimiert. Die Reinigung des GST-Fusionsproteins erfolgte mit Hilfe der Gluthathion-Sepharose nach Protokoll des Herstellers (Pharmacia, Freiburg).

2.3.9. Kreuzungsexperiment mit *S. cerevisiae*

Es wurde eine Ü/N-Kultur eines a-Stammes, der einen Leu-Marker trug und eine Ü/N-Kultur eines α-Stammes, der einen Trp-Marker trug, in YPDA bei 30°C herangezogen. Im Anschluss daran wurden die beiden Stämme gemischt und Ü/N bei 30°C inkubiert. Danach wurden verschiedene Verdünnungen auf eine Trp⁻, Leu⁻- und eine Trp⁺/ Leu⁻-Platte aufgetragen. Wenn die Zellen auf allen drei Platten wuchsen, so hatte eine Kreuzung der beiden Stämme stattgefunden.

3. Ergebnisse

Diese Arbeit baut auf vorangegangenen Arbeiten auf, in denen nach Interaktionspartnern des Aktivators Gal4 und des Repressors Tup1 aus *S. cerevisiae* gesucht wurde, die eine funktionelle Relevanz in der Transkriptionsregulation haben. Dazu wurde jeweils ein „Split-Ubiquitin-Screen“ mit den beiden Transkriptionsfaktoren durchgeführt. Nhp6B wurde dabei als Faktor gefunden, der *in vivo* und *in vitro* mit Gal4 interagieren kann (Laser, 2000) und Cdc73 wurde als Interaktionspartner von Tup1 identifiziert (persönliche Mitteilung, N. Lehming;). Nhp6B ist in der Lage, neben Gal4 auch Tup1 *in vivo* und *in vitro* zu binden (Laser, 2000).

Diese Doktorarbeit hatte zum Ziel mittels einer genomweiten Expressionsanalyse in einem NHP6A/B- und einem CDC73-Deletionsstamm einen Überblick über die genomweite Relevanz der beiden Proteine in der Transkriptionsregulation zu erlangen. Ferner sollte anhand von einzelnen Beispiel-Genen geklärt werden, ob ihre Regulation durch Cdc73 und Nhp6A/B einen direkten oder einen indirekten Charakter hat.

3.1 Nhp6A/B

Das Hefeprotein Nhp6, von dem die zwei homologen Formen Nhp6A und Nhp6B existieren, gehört zur Gruppe der „High Mobility Group“-Proteine (HMG-Proteine). Für diese Proteine konnte gezeigt werden, dass sie an der Regulation von Genen, die durch RNA-Polymerase II und III transkribiert werden, beteiligt sind (Tremethick und Molloy, 1988). In der Vergangenheit ließen verschiedene Arbeiten darauf schließen, dass Nhp6A/B ebenfalls eine Rolle in der Transkriptionsregulation spielt. So konnte z.B. gezeigt werden, dass Nhp6A zusammen mit Msn1 an der Swi6-abhängigen Transkription des HO-Gens beteiligt ist (Sidorova und Breeden, 1999). Des Weiteren wurde *in vivo* und *in vitro* eine Interaktion von Nhp6B mit dem transkriptionellen Regulatoren Gal4 gefunden, die für die Regulation des Gal1-Promotors relevant ist (Laser, 2000).

In den zitierten Arbeiten wurde die Beteiligung von Nhp6A/B an der transkriptionellen Regulation einzelner Gene untersucht. Um einen Überblick über die Beteiligung von Nhp6A/B an der Regulation des Hefegenoms zu bekommen, wurde eine genomweite Analyse der Transkription in einem Hefestamm durchgeführt, der eine Deletion für NHP6A und B enthielt.

3.1.1 Genomweite Expressionsanalyse eines NHP6 Δ -Stammes

Für die genomweite Analyse der Transkription im NHP6A/B-Deletionsstamm wurde mRNA aus Hefe der Stämme JD52-Wildtyp (WT) und JD52- Δ NHP6A/B (NHP6 Δ) isoliert, die nach einer Vorkultur in Galaktose-Medium vier Stunden in Glukose-Medium kultiviert wurden. Das Experiment wurde parallel zweifach durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Aus der mRNA wurde biotinmarkierte cRNA hergestellt, die auf „Chips“ hybridisiert wurde. Die „Chips“ enthielten DNA-Oligos, welche das ca. 6000 Gene umfassende Hefegenom repräsentierten. Nach der Hybridisierung wurde die cRNA angefärbt und die Signale mit einem Scanner gelesen.

Die absoluten Werte der Signale auf den Chips mit WT-cRNA und NHP6 Δ -cRNA wurden mit Hilfe eines Programms einer Datenbank (<http://web.wi.mit.edu/young>), die im Labor Young entwickelt wurde, miteinander verglichen. Die Grundlage zu diesem Programm ist im Anhang in Form eines Excel-Arbeitsblattes dargestellt. Eine Veränderung der Genexpression im NHP6 Δ -Stamm wurde als x-fache Veränderung im Vergleich zum WT-Stamm dargestellt. Auf den Chips des NHP6 Δ -Experiments waren 4683 Gene aus dem Hefegenom präsent. Die Zahl der Gene, die auf den Chips der Firma Affymetrix enthalten sind, kann auf Grund von Qualitätsunterschieden vom insgesamt 6000 Gene umfassenden Hefegenom abweichen.

Die Auswertung der Signale auf den Chips ergab, dass von den 4683 Genen, die untersucht werden konnten, die Expression von 206 Genen im NHP6 Δ -Stamm mehr als zweifach hochreguliert war, während sie von 279 Genen mehr als zweifach herunterreguliert war (3.1.1.1 und Anhang). Das heißt, insgesamt ist die Expression von ca. 10% der untersuchten Gene im NHP6 Δ -Stamm verändert. Dabei werden ca. 4% der Gene negativ und ca. 6% der Gene positiv durch Nhp6A/B beeinflusst.

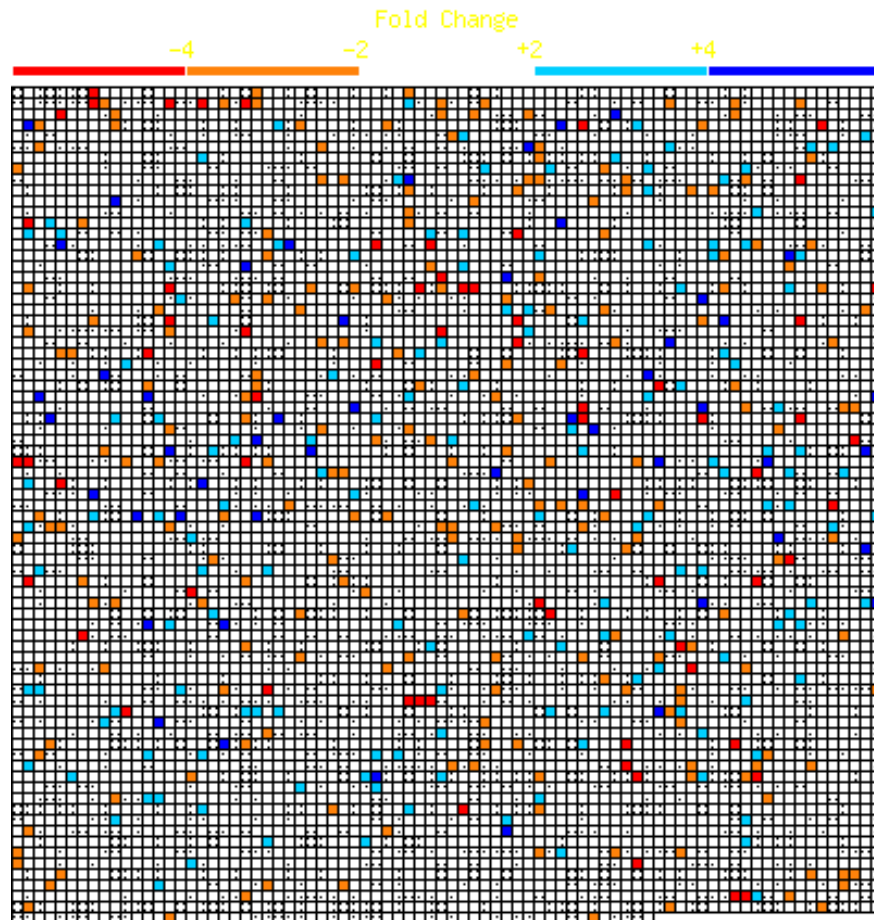


Abb.3.1.1.1.: Nhp6A/B reguliert ca.10% der Gene aus *S. cerevisiae*. Die einzelnen Gene sind durch Quadrate dargestellt. Dabei sind Gene, die zwei- bis vierfach herunterreguliert sind, in orange; Gene die mehr als vierfach herunterreguliert sind, in rot; Gene, die zwei- bis vierfach hochreguliert sind, in hellblau und Gene, die mehr als vierfach hochreguliert sind, in dunkelblau dargestellt. Weiße Quadrate sind Gene die durch eine Deletion von NHP6A/B unbeeinflusst bleiben.

Chromosomenlokalisierung

Mit Hilfe eines Programms, das im Labor Young entwickelt wurde, konnten die durch Nhp6A/B regulierten Gene ihrem Locus auf den Chromosomen zugewiesen werden. So konnte untersucht werden, ob es Stellen im Genom von *S. cerevisiae* gibt, die bevorzugt von Nhp6A/B reguliert werden.

In Abb.3.1.1.2. ist zu sehen, dass die durch Nhp6A/B regulierten Gene zufällig über das gesamte Genom verteilt sind. Es gibt keine Stellen, an denen besonders viele Gene durch Nhp6A/B reguliert sind, wie es z.B. für Sir-Proteine Sir2 und -3 der Fall ist (Wyrick et al., 1999), die bevorzugt im Bereich der Telomere wirken.

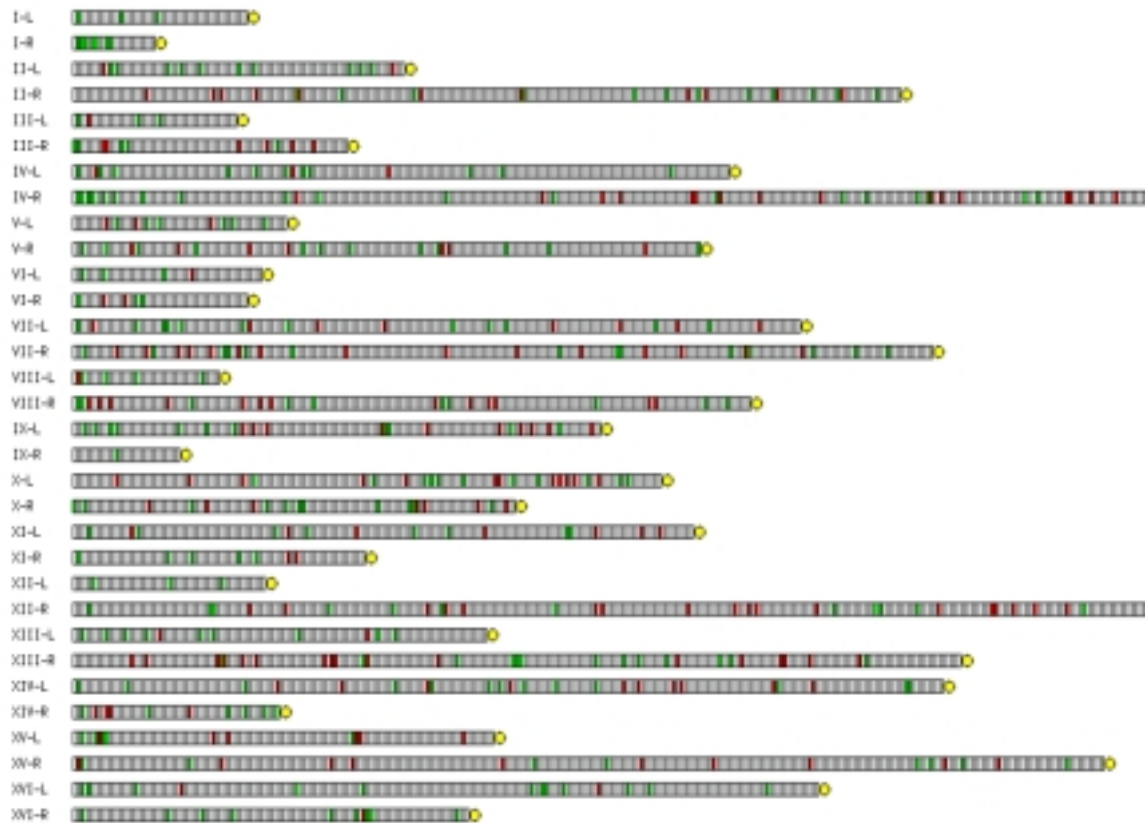


Abb. 3.1.1.2.: Gene, die durch Nhp6A/B reguliert werden, sind zufällig über die Chromosomen von *S. cerevisiae* verteilt. Die Abbildung zeigt jeweils den linken und den rechten Arm der 16 Chromosomen von *S. cerevisiae*. Die einzelnen Gene sind als Rechtecke dargestellt. Im Falle eines Gens das im NHP6 Δ -Stamm herunterreguliert wurde, ist das Rechteck grün gefärbt. Die roten Rechtecke repräsentieren Gene, die im NHP6 Δ -Stamm hochreguliert sind. Centromere sind durch gelbe Kreise dargestellt. Der rechte Arm von Chromosom V und XII musste zu Gunsten der Größe der Abbildung abgeschnitten werden. Die vollständige Abbildung ist im Anhang dargestellt.

Promotoranalyse

Es werden ca. 10% der Gene von *S. cerevisiae* durch Nhp6A/B reguliert. Neben möglichen funktionellen Gemeinsamkeiten ist es wahrscheinlich, dass diese Gene eine gemeinsame Struktur im Promotor haben. Dazu wurde in den Promotoren von solchen Genen, deren Expressionsniveau sich im NHP6 Δ -Stamm um mehr als einen Faktor fünf von der Expression im WT-Stamm unterschied, nach Bindemotiven für Transkriptionsfaktoren gesucht. Es wurden jeweils die ersten 400bp der Promotoren für die Suche nach gemeinsamen Motiven verwendet. Die Sequenzen der Promotoren wurden aus dem Internet aus der Saccharomyces Genome Database (<http://genome-www.stanford.edu/saccharomyces>) heruntergeladen. Das Programm

Matinspector (<http://genomatix.gsf.de/cgi-bin/matinspector/matinspector.pl>), aus dem Internet, wurde dazu genutzt, in den Promotoren nach Bindestellen von Transkriptionsfaktoren zu suchen.

Insgesamt wurden 56 Promotoren untersucht, die durch Nhp6A/B reguliert wurden. Davon waren 35 Promotoren im NHP6 Δ -Stamm positiv reguliert, während 21 Promotoren negativ reguliert waren. Die Promotoren von TBP, STE2, PHO2, -4, -86 und ACT1, die nicht durch Nhp6A/B reguliert wurden, dienten als Negativkontrolle. In 18 der 35 positiv regulierten Promotoren und in 13 der 21 negativ regulierten Promotoren wurde ein Motiv gefunden, das in den sechs Negativkontrollen nicht enthalten war. Es handelte sich dabei um ein fünf Basenpaare umfassendes Motiv mit der Sequenz CATTC. Bei der Untersuchung eines Promotors nach Bindungsstellen, wurde neben der Sequenz CATTC auch nach der komplementären Sequenz GAATG gesucht. In den verbleibenden 25 Promotoren, die das Motiv CATTC oder GAATG nicht enthielten, wurde kein weiteres gemeinsames Motiv gefunden, das nicht auch in den Negativkontrollen zu finden war.

Nhp6A/B reguliert Gene aus bekannten Gen-Familien

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde untersucht, ob die durch Nhp6A/B regulierten Gene funktionelle Gemeinsamkeiten haben oder an gleichen Stoffwechselwegen beteiligt sind. Es stellte sich heraus, dass die Mitglieder von zwei Gen-Familien eine Veränderung der Transkriptionsrate im NHP6 Δ -Stamm zeigen. Dabei handelt es sich um Gene des Phosphatmetabolismus und um Gene, die an der Geschlechtsdifferenzierung beteiligt sind.

Nhp6A/B reguliert Gene des Phosphatmetabolismus

S. cerevisiae nutzt vorzugsweise anorganisches Phosphat als Phosphatquelle für den Stoffwechsel. Wenn in der Umgebung nicht genügend anorganisches Phosphat vorhanden ist, kann die Hefe Phosphat aus organischem Phosphat gewinnen. Dabei werden Phosphoester-Bindungen durch Phosphatasen gespalten (Vogel und Hinnen, 1990). Hefe enthält zwei verschiedene Arten von Phosphatasen zur Gewinnung von anorganischem Phosphat.

Zum einen die alkalischen Phosphatasen, mit einem pH-Optimum um pH 8, die in der Vakuole oder im Cytoplasma lokalisiert sind (Clark et al., 1982) und zum anderen die sauren Phosphatasen, die in der Zellwand oder im Periplasma zu finden sind (Lopandic et al., 1987). Die Transkription der Gene, die für die sauren Phosphatasen kodieren, wird in einer Umgebung mit niedrigem anorganischem Phosphatgehalt induziert, während sie in einer Umgebung, die ausreichend anorganisches Phosphat enthält, reprimiert ist (Johnston und Carlson, 1992). Im NHP6 Δ -Stamm war die Transkriptionsrate von Genen herunterreguliert, die in Gegenwart von anorganischem Phosphat nicht aktiviert sind (Abb.3.1.1.3). Es handelt sich dabei um die Gene der sauren Phosphatasen (PHO5, PHO11 und PHO12), sowie um eine Phosphat-Permease (PHO84). Die Transkriptionsraten der genannten Gene sind im Nhp6 Δ -Stamm 3 bis 13-fach geringer, als im entsprechenden WT-Stamm.

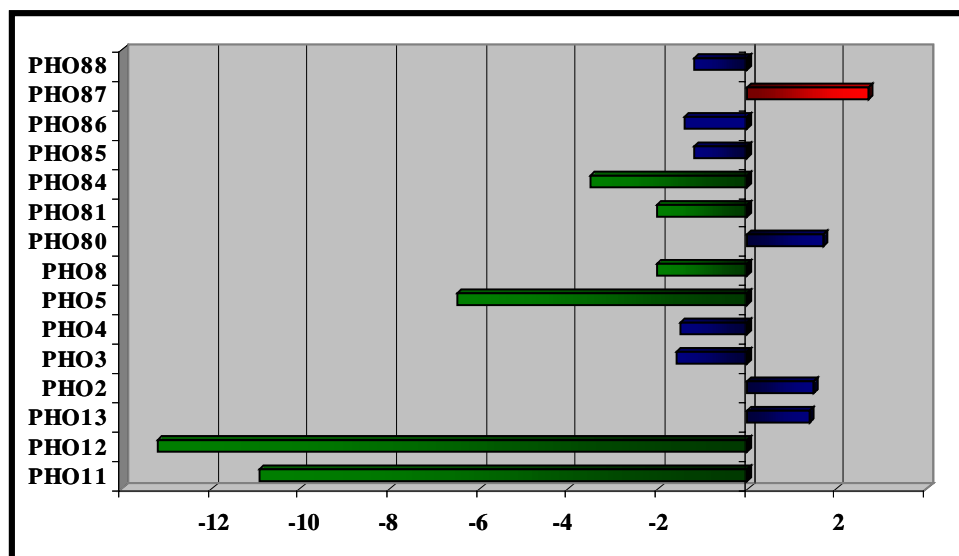


Abb. 3.1.1.3.: Nhp6A/B ist an der Basaltranskription von Genen aus der Familie der Gene des Phosphat-Metabolismus beteiligt. In Grün sind Gene dargestellt, die zwei- oder mehr als zweifach herunterreguliert sind. PHO8 und PHO81 sind im NHP6 Δ -Stamm zweifach herunterreguliert, während PHO5, -11, -12 und -84 mehr als zweifach herunterreguliert sind.

Die Hefe wurde für die Analyse der Genexpression in Vollmedium herangezogen, welches ausreichend Phosphat enthielt. In einem solchen Medium sind die sauren Phosphatasen nicht induziert. Bei den im NHP6 Δ -Stamm beobachteten Veränderungen der Transkriptionsrate handelt es sich deshalb um eine Veränderung der basalen Transkriptionsrate dieser Gene. Es besteht die Möglichkeit, dass es sich bei dem Effekt einer Deletion von NHP6A/B auf die Expression von PHO5, -11, -12 und -84 um einen indirekten Effekt handelt. Das Expressionsniveau ihrer transkriptionellen Aktivatoren, Pho2 und Pho4 bleibt zwar im NHP6 Δ -Stamm im Vergleich zum WT-Stamm unverändert, Nhp6A/B könnte jedoch an der Regulation eines anderen Transkriptionsfaktors beteiligt sein, der wiederum an der Regulation von PHO5, -11, -12 und -84 beteiligt ist. Ein solcher Transkriptionfaktor hätte Swi1 oder Snf2 sein können. Es wurde ein ähnlicher Effekt auf die basale Transkription der oben beschriebenen Gene für eine Deletion von SWI1 oder SNF2 beobachtet (Sudarsanam et al., 2000). Die Deletion jeweils eines der beiden Gene führt ebenfalls zu einer Reduzierung des Expressionsniveaus von PHO5, -11, -12 und PHO84, während das Expressionsniveau der transkriptionellen Aktivatoren Pho2 und Pho4 unbeeinträchtigt bleibt. Das Expressionsniveau von SWI1 ist im NHP6 Δ -Stamm nicht reduziert. Der Effekt einer Deletion von NHP6A/B auf die Expression der oben genannten PHO-Gene ist nicht auf ein vermindertes mRNA-Niveau von SWI1 zurückzuführen. Es konnte jedoch nicht geklärt werden, ob der Effekt auf ein vermindertes Transkriptionsniveau von SNF2 zurückzuführen ist, da SNF2 auf dem analysierten DNA-Chip nicht präsent war.

Nhp6A/B reguliert Gene der Geschlechtsdifferenzierung

Nhp6B interagiert mit dem generellen Repressor Tup1 aus *S. cerevisiae* (Laser, 2000), der an der Regulation der Geschlechtsdifferenzierung beteiligt ist. So führt eine Mutation in Tup1 zur starken konstitutiven Expression des α -spezifischen Gens MFA1 in einer α -Zelle (Keleher et al., 1992). Nhp6A/B ist an einigen Promotoren für die Repression durch Tup1 nötig (Laser, 2000). Die Deletion von NHP6A/B äußert sich in der Derepression des in Glukose-Medium durch Tup1 reprimierten Gal1-Promotors. Nhp6A/B ist jedoch nicht für die Repression des α -spezifischen Gens

MFA1 durch Tup1 in einer α -Zelle nötig. Das Expressionsniveau von MFA1 bleibt im NHP6 Δ -Stamm in der α -Zelle unverändert (Laser, 2000).

Für die Analyse der Genexpression im NHP6 Δ -Stamm wurden a-Zellen benutzt. A-Zellen unterscheiden sich von α -Zellen in der Hinsicht, dass die a-spezifischen Gene, die in α -Zellen reprimiert sind, exprimiert werden (Wilson und Herskowitz, 1984). Durch die genomweite Analyse der Genexpression in a-Zellen war es möglich, zu untersuchen, welchen Effekt eine Deletion von NHP6A/B auf die Expression der a-spezifischen Gene im a-Stamm hat. Es wurde die Expression von STE2, STE6, MFA1, MFA2 und BAR1 betrachtet. Dabei zeigte sich, dass die a-spezifischen Gene MFA1 und BAR1 im NHP6 Δ -Stamm mehr als zweifach herunterreguliert sind (Abb. 3.1.1.4).

Neben den genannten a-spezifischen Genen ist auch das haploidspezifische Gen HO im NHP6 Δ -Stamm herunterreguliert. Das HO-Gen kodiert für eine Endonuklease, die Doppelstrangbrüche in die DNA des „Mating Type Locus“ einfügt, wodurch der Wechsel vom a-Geschlechtstyp zum α -Geschlechtstyp und umgekehrt, eingeleitet wird (Oshima und Takano, 1971; Strathern et al., 1982). Der Zweck dieses Wechsels ist, aus einer einzelnen haploiden Spore Zellen zwei verschiedener Geschlechtstypen zu schaffen, die sich zu einer diploiden Zelle paaren können.

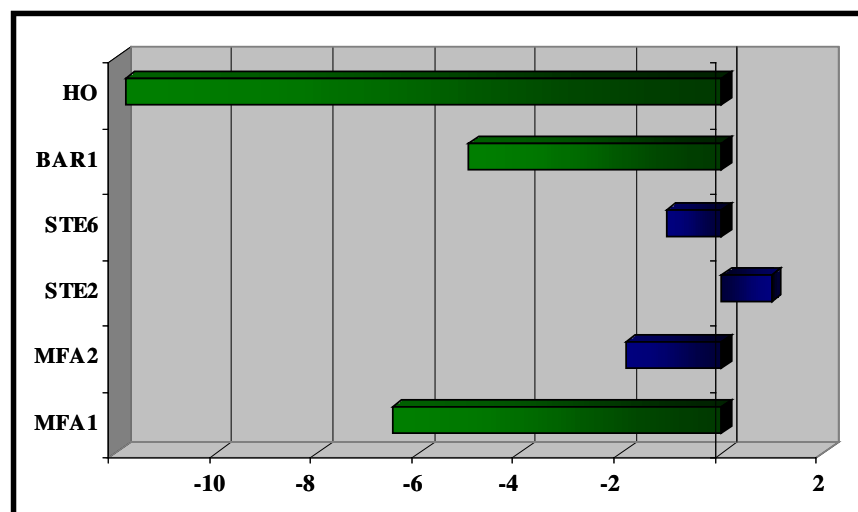


Abb. 3.1.1.4.: Nhp6A/B ist an der Regulation a-spezifischer Gene und des HO Gens aus *S. cerevisiae* beteiligt. Die in Grün dargestellten a-spezifischen Gene MFA1, BAR1 und das HO-Gen sind im NHP6 Δ -Stamm mehr als zweifach herunterreguliert.

Nhp6A/B ist ein positiver Faktor in der Regulation der geschlechtsspezifischen Gene. Möglicherweise ist die Interaktion zwischen Nhp6B und Tup1 im Falle des Promotors von MFA1 in α -Zellen für die Aktivierung des Gens nötig.

3.1.2 Charakterisierung der Regulation von MFA1 durch Nhp6B

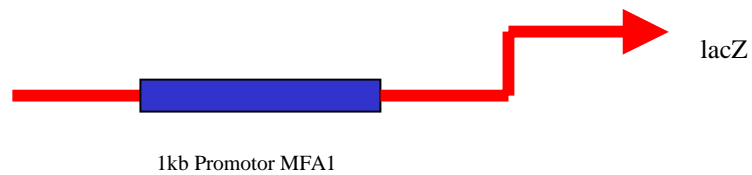
Reproduktion des Array-Ergebnisses mit Hilfe eines Reporterkonstrukts

Anhand des MFA1-Gens sollte geprüft werden, ob es möglich ist, ein Ergebnis aus der genomweiten Expressionsanalyse anhand einer anderen Technik zu reproduzieren. Als zweite Technik wurde ein β -Galaktosidase-Assay angewendet. Dazu wurde ein aus dem MFA1-Promotor und dem lacZ-Gen bestehendes Reporterkonstrukt in einen α -WT-Stamm, einen α -NHP6 Δ -Stamm, einen α -WT-Stamm, sowie einen α -NHP6 Δ -Stamm integriert. Die Integration erfolgte in den MFA1-Locus. Die Hefen wurden in URA⁻-Medium kultiviert. Im Anschluss daran wurde die β -Galaktosidase-Aktivität von jeweils drei unabhängigen Kolonien gemessen und der Mittelwert gebildet. Es konnte gezeigt werden, dass MFA1-lacZ nur im α -Stamm exprimiert wird. Im α -WT-Stamm ist das Reporterkonstrukt im Verhältnis zum α -WT-Stamm ca. 40-fach reprimiert. Dieses Ergebnis schließt sich der Literatur an (Wilson und Herskowitz, 1984). Ein Vergleich der Expression des MFA1-Reporterkonstrukts im α -WT-Stamm zur Expression im α -NHP6 Δ -Stamm zeigte, dass die Expression des Reporterkonstrukts im NHP6 Δ -Stamm um den Faktor zwei herunterreguliert ist. Dabei verringert sich der absolute Wert der β -Galaktosidase-Aktivität von 37 auf 18. Im α -NHP6 Δ -Stamm wird das MFA1-Reporterkonstrukt zweifach hochreguliert. Dabei verändert sich der absolute gemessene Wert der β -Galaktosidase-Aktivität von 1 auf 2 (Abb.3.1.2.1.).

Durch den β -Galaktosidase-Assay, in dem die β -Galaktosidase-Aktivität eines Reporterkonstrukts, bestehend aus dem MFA1-Promotor und dem lacZ-Gen, gemessen wurde, konnte ebenfalls gezeigt werden, dass MFA1 im α -NHP6 Δ -Stamm herunterreguliert ist. Der β -Galaktosidase-Assay hat nicht die gleiche Sensitivität, wie die genomweite Expressionsanalyse mit Hilfe eines DNA-Chips. Durch die genomweite Expressionsanalyse wurde gezeigt, dass MFA1 im α -NHP6 Δ -Stamm um

den Faktor 6,5 herunterreguliert wurde. Im β -Galaktosidase-Assay betrug der Faktor nur den Wert 2. Es zeigt sich jedoch in beiden Experimenten die gleiche Tendenz für die Expression von MFA1 im α -NHP6 Δ -Stamm. MFA1 wird im α -NHP6 Δ -Stamm herunterreguliert.

A.



B.

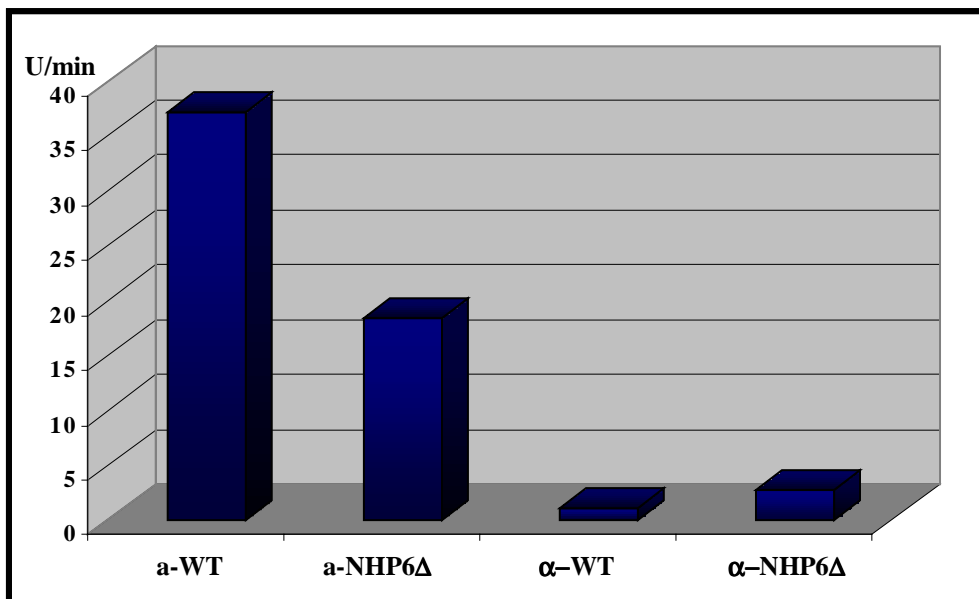


Abb. 3.1.2.1: Nhp6A/B ist ein positiver Faktor in der Regulation von MFA1 in α -Zellen. A.: Schema des Reporterkonstruktes bestehend aus 1kb des MFA1-Promotors und dem lacZ-Gen.

B.: Graphische Darstellung der Werte des β -Galaktosidase-Assays. Auf der X-Achse sind die Namen der Stämme und auf der Y-Achse die gemessenen β -Galaktosidase Einheiten pro Minute zu entnehmen. Es konnte gezeigt werden, dass ein MFA1-lacZ-Reporterkonstrukt im α -NHP6 Δ -Stamm herunterreguliert ist.

Eine Deletion von NHP6A/B beeinflusst das Kreuzungsverhalten von Hefe

Die Expressionsanalyse der Deletion von NHP6A/B wurde in einem a-Stamm durchgeführt. Dabei wurde eine reduzierte Expression von MFA1, dem Gen für den Vorläufer des a-Faktors beobachtet. Der a-Faktor ist ein Pheromon, das während einer Kreuzung für die Erkennung der a-Zelle durch die α -Zelle nötig ist (Johnson, 1995). Des Weiteren ist die mRNA von BAR1, das für eine Protease codiert, welche den α -Faktor spaltet (Sprague und Herskowitz, 1981), im NHP6 Δ -Stamm vermindert. Es sollte untersucht werden, ob die verminderte Expression von MFA1 und BAR1 im a-Stamm eine Wirkung auf die Kreuzungsfähigkeit von *S. cerevisiae* zur Folge hat.

Dazu wurden vier unterschiedliche Kreuzungen durchgeführt. Es wurde ein a-WT-Stamm mit einem α -WT-Stamm und ein a-NHP6 Δ -Stamm mit einem α -NHP6 Δ -Stamm gekreuzt. Daneben wurde getestet, ob eine Deletion von NHP6A/B in einem a-Stamm einen anderen Effekt auf die Kreuzungsfähigkeit hat, als eine Deletion von NHP6A/B in einem α -Stamm. Um diese Frage beantworten zu können, wurde ein a-WT-Stamm mit einem α -NHP6 Δ -Stamm und ein a-NHP6 Δ -Stamm mit einem α -WT-Stamm gekreuzt.

Die a-Stämme trugen einen Marker für das TRP-Gen und die α -Stämme trugen einen Marker für das LEU-Gen. Hatte eine erfolgreiche Kreuzung stattgefunden, so waren die Zellen fähig, auf Platten zu wachsen, die weder Tryptophan, noch Leucin enthielten. Die Zellen, die aus der Kreuzung der beiden WT-Stämme und die Zellen, die aus der Kreuzung des a-NHP6 Δ -Stammes mit dem α -WT-Stamm hervorgingen, waren in der Lage auf Platten ohne Tryptophan und Leucin zu wachsen. Es hatte eine Kreuzung stattgefunden. *S. cerevisiae* ist zu einer Kreuzung fähig, wenn NHP6A/B im a-Stamm deletiert ist. Im Gegensatz dazu konnte für die Zellen die aus der Kreuzung der beiden NHP6 Δ -Stämme und aus der Kreuzung des a-WT-Stammes mit dem α -NHP6 Δ -Stamm kein Wachstum auf den Platten ohne Tryptophan und Leucin beobachtet werden (Abb. 3.1.2.2.). Es hatte keine Kreuzung stattgefunden. Wenn NHP6A/B im α -Stamm deletiert ist, so ist *S. cerevisiae* nicht mehr zu einer Kreuzung fähig. Der Einfluss der Deletion von NHP6A/B auf die Kreuzungsfähigkeit wird auch durch das langsame Wachstum einer Deletion von NHP6A/B deutlich.

Auf der Platte ohne Tryptophan wuchsen nur die Zellen aus der Kreuzung der beiden NHP6 Δ -Stämme langsam.

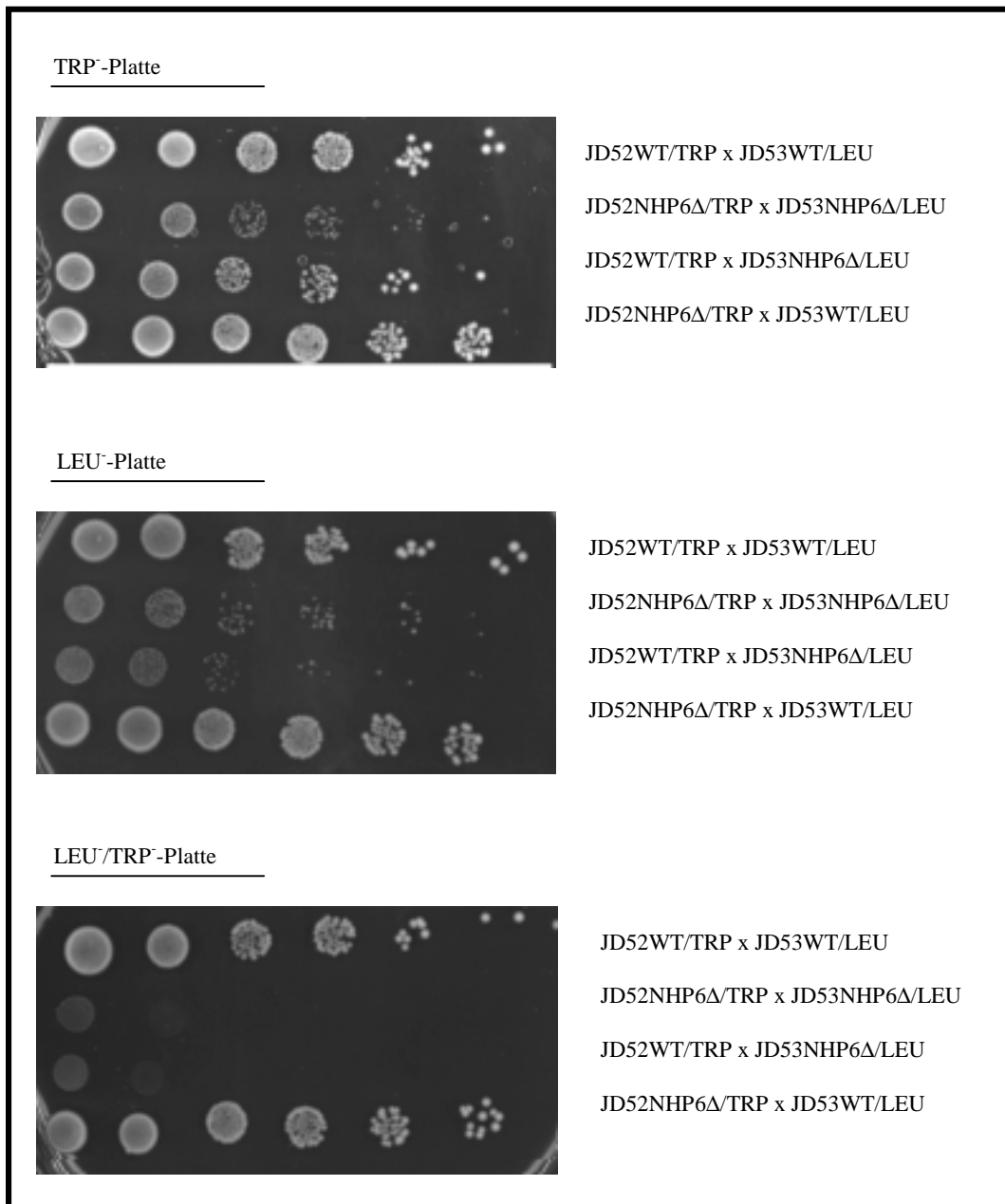


Abb.3.1.2.2.: Eine Deletion von Nhp6A/B in *S. cerevisiae* hat einen Einfluss auf das Kreuzungsverhalten, wenn sich die Deletion in einem α -Stamm befindet. Die Abbildung zeigt die verschiedenen Kreuzungen auf einer TRP⁻-Platte, auf einer LEU⁻-Platte und einer LEU⁻/TRP⁻-Platte. Wenn die Zellen auf der LEU⁻/TRP⁻-Platte nicht wachsen, so hat keine Kreuzung stattgefunden. Dies ist der Fall, wenn NHP6A/B in JD53, einem α -Stamm, deletiert ist. Befindet sich die Deletion in JD52, dem a-Stamm, so bleibt das Kreuzungsverhalten unbeeinflusst.

Die Zellen aus der Kreuzung des a-NHP Δ -Stammes mit dem α -WT-Stamm wuchsen nicht langsamer, als die Zellen aus der WT-Kreuzung. Die Zellen konnten sich kreuzen und sind diploid. Die diploiden Zellen nutzten das NHP6A/B-Allel aus dem α -WT-Stamm, das die Deletion von NHP6A/B im a-Stamm komplementiert. Auf der Platte ohne Leucin wuchsen jedoch neben den Zellen aus der Kreuzung der beiden NHP6 Δ -Stämme auch die Zellen aus der Kreuzung des a-WT-Stammes mit dem α -NHP6 Δ -Stamm langsam. Die α -NHP6 Δ -Zellen waren nicht in der Lage sich mit den a-WT-Zellen zu kreuzen. Sie blieben haploid und behielten den langsam wachsenden Phänotyp.

Durch das Kreuzungsexperiment wurde gezeigt, dass die Deletion von NHP6A/B nur dann einen Einfluss auf die Kreuzungsfähigkeit von *S. cerevisiae* hat, wenn die Deletion in einem α -Stamm durchgeführt wird. Eine Deletion von NHP6A/B in einem a-Stamm hat keinen Effekt auf die Kreuzungsfähigkeit. Obwohl das Transkriptionsniveau von zwei a-spezifischen Genen, die für die Kreuzung von Hefe nötig sind verringert ist, sind die Zellen in der Lage, sich zu kreuzen.

Untersuchung einer möglichen direkten Regulation von MFA1 durch Nhp6B

Wird eine genomweite Analyse der Genexpression eines Transkriptionsfaktors durchgeführt, so kann nicht zwischen den direkten Effekten des Faktors auf die Expression eines Gens und indirekten Effekten, die durch eine veränderte Expression anderer Transkriptionsfaktoren verursacht werden, unterschieden werden.

Es sollte deshalb mit Hilfe eines Chromatin-Imunopräzipitations-Experiments (CHIP) und eines Elektromobilitäts-Assays untersucht werden, ob Nhp6B direkt an der Regulation von MFA1 beteiligt ist.

Chromatin-Immunopräzipitation

Für das CHIP-Experiment wurden durch die Zugabe von Formaldehyd ins Medium die Bindungen von DNA und Proteinen fixiert. Die Zellen wurden geerntet und für die Isolation von Chromatin aufgebrochen. Mit Hilfe von Ultraschall entstanden aus dem Chromatin ca. 400 bp lange Fragmente. Anschließend wurden magnetische Kügelchen, die mit einem HA-Antikörper beschichtet waren, dazu benutzt, solche

DNA, die an ein HA-Hybridprotein gebunden war, von ungebundener DNA zu trennen. Danach wurde die DNA durch Zugabe von SDS von den Proteinen abgelöst. Von der so isolierten DNA wurde mit spezifischen Primern für ein Fragment aus dem Promotor, an den das HA-Hybridprotein binden sollte, eine radioaktive PCR gemacht. Wenn das HA-Fusionsprotein *in vivo* an den Promotor gebunden hatte, so konnte der Promotor nach der Immunopräzipitation mittels einer PCR nachgewiesen werden.

Es wurde DNA aus einem Stamm, der ein HA-Nhp6B-Protein enthielt und aus einem Stamm der nur Nhp6B enthielt, isoliert. Die Isolation der DNA aus einem Stamm mit Nhp6B, das nicht an HA fusioniert war, diente als Kontrolle für die Trennung der an HA-Nhp6B gebundenen DNA von ungebundener DNA.

Als Positivkontrolle für die Chromatin-Immunopräzipitation wurde der Promotor des HO-Gens benutzt. Es ist bekannt, dass Nhp6A direkt an diesen Promotor bindet (Sidorova und Breeden, 1999). Da Nhp6A und Nhp6B auf Proteinebene fast identisch sind (Kolodrubetz und Burgum, 1990) und eine Deletion von nur einem der beiden Gene keinen Phänotyp hat, war es wahrscheinlich, dass die beiden Proteine redundant sind und Nhp6B, wie Nhp6A, an den Promotor des HO-Gens bindet. Als Kontrolle für die PCR-Bedingungen wurde für die PCR unaufgereinigter Zellextrakt als Vorlage eingesetzt.

Nach einer PCR mit Primern, die ein Fragment der ersten 400bp des Promotors von MFA1 amplifizieren sollten, war weder im Ansatz mit DNA aus dem Nhp6B-Stamm, noch im Ansatz mit DNA aus dem Nhp6B-HA-Stamm ein PCR-Fragment zu detektieren. Die Kontroll-PCR mit den jeweiligen Zellextrakten zeigte jedoch ein PCR-Fragment. Nhp6B bindet unter den gewählten Bedingungen nicht an den Promotor von MFA1 (Abb.3.1.2.3.).

In einem anderen Experiment mit Primern, die ein Fragment der ersten 200 Basen aus dem Promotor von HO amplifizieren sollten, konnte gezeigt werden, dass die Chromatin-Immunopräzipitation von HA-Nhp6B erfolgreich durchgeführt wurde.

Nhp6B bindet *in vivo* an den Promotor des HO-Gens. Im PCR-Ansatz, der DNA aus dem Stamm mit WT-Nhp6B enthielt, war kein PCR-Fragment zu detektieren. Während im PCR-Ansatz mit der DNA aus dem Stamm mit HA-Nhp6B ein PCR-Fragment des HO-Promotors zu sehen war.

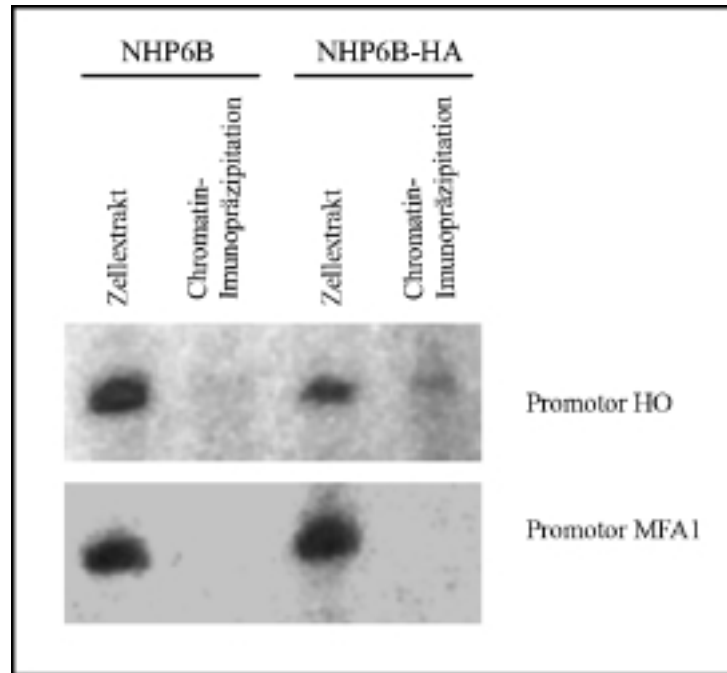


Abb. 3.1.2.3.: Nhp6B bindet *in vivo* an den Promotor des HO-Gens, nicht aber an den Promotor des MFA1-Gens.

Die Abbildung zeigt das Ergebnis einer PCR nach einer Chromatin-Immunopräzipitation mit einem HA-Antikörper in einem a-Stamm. Durch die PCR wurden Fragmente amplifiziert, die zusammen mit Nhp6B-HA durch den HA-Antikörper immunopräzipitiert wurden. Oberer Teil der Abbildung: Nhp6B-HA bindet *in vivo* an den Promotor des HO-Gens. Ein Fragment aus dem Promotor des HO-Gens konnte in der Chromatin-Immunopräzipitation von Nhp6B ohne HA nicht detektiert werden, während es in der Chromatin-Immunopräzipitation von Nhp6-HA nachzuweisen war. Die Amplifikation eines Fragments aus dem HO-Promotor aus den Zellextrakten vor der Chromatin-Immunopräzipitation dienten als Kontrolle für die PCR-Bedingungen.

Unterer Teil der Abbildung: Nhp6B bindet *in vivo* nicht an den Promotor des MFA1-Gens. Der Promotor des MFA1-Gens konnte nach der Chromatin-Immunopräzipitation nicht nachgewiesen werden, während er aus den Zellextrakten amplifiziert werden konnte.

Elektromobilitäts-Bindungs-Assay

Durch einen Chromation-Immunopräzipitation konnte gezeigt werden, dass Nhp6B unter den gewählten Bedingungen *in vivo* nicht an den Promotor des MFA1-Gens bindet, während eine Bindung an den Promotor des HO-Gens nachgewiesen werden konnte.

Diese Beobachtungen können auf zweierlei Weise erklärt werden. Zum einen ist es möglich, dass MFA1 indirekt durch NHP6B reguliert wird und deshalb keine Bindung an den Promotor von MFA1 gezeigt werden konnte. Zum anderen besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass Nhp6B nur temporär an den Promotor von MFA1

bindet. Es ist auch nicht auszuschließen, dass MFA1 durch Nhp6A reguliert wird und Nhp6A und B am Promotor von MFA1 nicht redundant sind.

Anhand eines Elektromobilitäts-Bindungs-Assays (EMSA) sollte untersucht werden, ob Nhp6B *in vitro* an den Promotor von MFA1 bindet, um einen Hinweis darauf zu bekommen, welche der beiden Hypothesen stimmen könnte. Als Positiv-Kontrolle für die DNA-Bindung wurde wiederum das HO-Gen benutzt.

Für den EMSA wurden zwei kleinere, 200bp lange, Fragmente aus den ersten 400bp des MFA1-Promotors verwendet (MFA1-PF1 und MFA1-PF2). MFA1-PF1 repräsentiert dabei die Basen 0 bis -200 und MFA1-PF2 die Basen -200 bis -400 des MFA1-Promotors. Nhp6B wurde als aufgereinigtes GST-Fusions-Protein (GST-Nhp6B) in den Konzentrationen 3µg/µl, 1,5µg/µl und 0,75µg/µl eingesetzt. In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass GST-Nhp6B die beiden Fragmente aus dem Promotor von MFA1 mit einer unterschiedlich starken Präferenz bindet, was insbesondere durch die unterschiedliche Präsenz der freien Bande deutlich wird (Abb.3.1.2.4.).

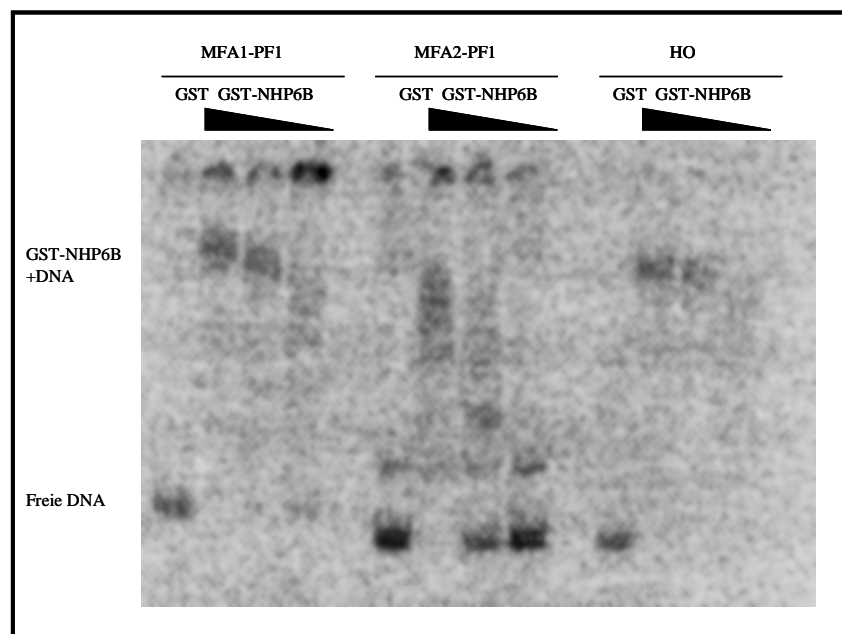


Abb. 3.1.2.4.: Nhp6B bindet DNA mit unterschiedlicher Präferenz. In einem Elektromobilitäts-Assay wurden zwei unterschiedliche, 200bp lange, DNA-Fragmente aus dem Promotor des MFA1-Gens und ein 200bp langes DNA-Fragment aus Promotor des HO-Gens eingesetzt. GST-Nhp6B wurde in den Konzentrationen 3µg/µl, 1,5µg/µl und 0,75µg/µl verwendet. GST-Nhp6B bindet die verschiedenen DNA-Fragmente mit unterschiedlicher Präferenz. GST allein bindet die DNA nicht.

Die Bande der gebundenen DNA wurde weiter nach oben verschoben, je mehr GST-Nhp6B im Ansatz enthalten war.

Wenn GST-Nhp6B im Bindungsexperiment mit einer Konzentration von 1,5µg/µl eingesetzt wurde, so war das Signal der gebundenen DNA von MFA1-PF1 3.77 mal so stark wie das Signal für die freie DNA. Für MFA1-PF2 ergab sich ein anderes Bild. Für das andere Fragment aus dem MFA1-Promotor waren die Signale für gebunden und freie DNA etwa gleich stark. Die Präferenz von Nhp6B für das Promotorfragment MFA1-PF1 war ca. 4 mal größer, als für das Promotorfragment MFA1-PF2. Wenn ein Fragment des HO-Promotors im Bindungsexperiment eingesetzt wurde so war das Signal für die gebundene DNA bei einer GST-Nhp6B-Konzentration von 1,5µg/µl 11,5 mal stärker, als das Signal für die freie DNA.

Für die Bindung der DNA-Fragmente durch GST-Nhp6B wurden die Dissoziationskonstanten (K_D -Werte) berechnet. Die Dissoziationskonstante K_D errechnet sich nach der folgenden Formel:

$$K_D = \frac{[\text{GST-Nhp6}] \times [\text{DNA}]}{[\text{GST-Nhp6/DNA}]}$$

Wenn 1,5µg/µl GST-Nhp6 im Bindungsexperiment eingesetzt wurden, so entsprach das einer Konzentration von 2×10^{-7} mol/l. Die Dissoziationskonstante betrug für MFA1-PF1 5×10^{-8} mol/l, für MFA1-PF2 2×10^{-7} mol/l und für HO $3,5 \times 10^{-9}$ mol/l. Durch diese Experimente wurde gezeigt, dass Nhp6B DNA mit unterschiedlichen Affinitäten bindet. Die Affinität für MFA-PF1, ein Fragment aus den ersten 200 bp des Promotors von MFA1, ist dabei ca. vier mal so groß, wie die Präferenz für MFA-PF2, das Fragment, welches aus den folgenden 200bp des Promotors von MFA1 besteht. Möglicherweise bindet Nhp6B zur Regulation von MFA1 an die ersten 200bp des MFA1-Promotors.

3.2. Cdc73

Cdc73 wurde ursprünglich als Teil eines RNA-PolymeraseII-Holoenzym isoliert, das keine Srb-Proteine enthält. Es soll an der Transkription einer kleinen Gruppe von Genen beteiligt sein, die unabhängig von Srb-Proteinen sind (Shi et al., 1997).

Cdc73 wurde des weiteren als Interaktionspartner von Tup1 identifiziert (persönliche Mitteilung, N. Lehming). In einer genomweiten Expressionsanalyse sollte untersucht werden, welche Wirkung eine Deletion von CDC73 auf die Genexpression von *S. cerevisiae* hat.

3.2.1. Genomweite Expressionsanalyse eines CDC73 Δ -Stammes

Für die genomweite Expressionsanalyse einer Deletion des CDC73-Gens in *S. cerevisiae* wurden die Zellen unter den gleichen Bedingungen herangezogen, wie für die Expressionsanalyse der Deletion von NHP6A/B. Es wurde mRNA aus Zellen isoliert, die zunächst über Nacht in galaktosehaltigem Medium gewachsen sind und danach 4 Stunden in glukosehaltigem Vollmedium inkubiert wurden. Die mRNA wurde in biotinylierte cRNA umgeschrieben und mit DNA-Chips der Firma Affymetrix hybridisiert.

Auf den Chips der Expressionsanalyse des CDC73 Δ -Stammes waren 4667 Gene präsent, die analysiert werden konnten. Davon waren 208 Gene im Deletionsstamm im Vergleich zum WT-Stamm mehr als zweifach hochreguliert. 198 Gene waren im Deletionsstamm im Vergleich zum WT-Stamm mehr als zweifach herunterreguliert (Abb.3.2.1.1 und Anhang). Dabei war die größte Veränderung der Genexpression im CDC73 Δ -Stamm im Vergleich zum WT-Stamm 70-fach. Cdc73 reguliert 8,6% der untersuchten Gene aus *S. cerevisiae*. Davon sind 4,5% der Gene negativ und 4,2% der Gene positiv reguliert.

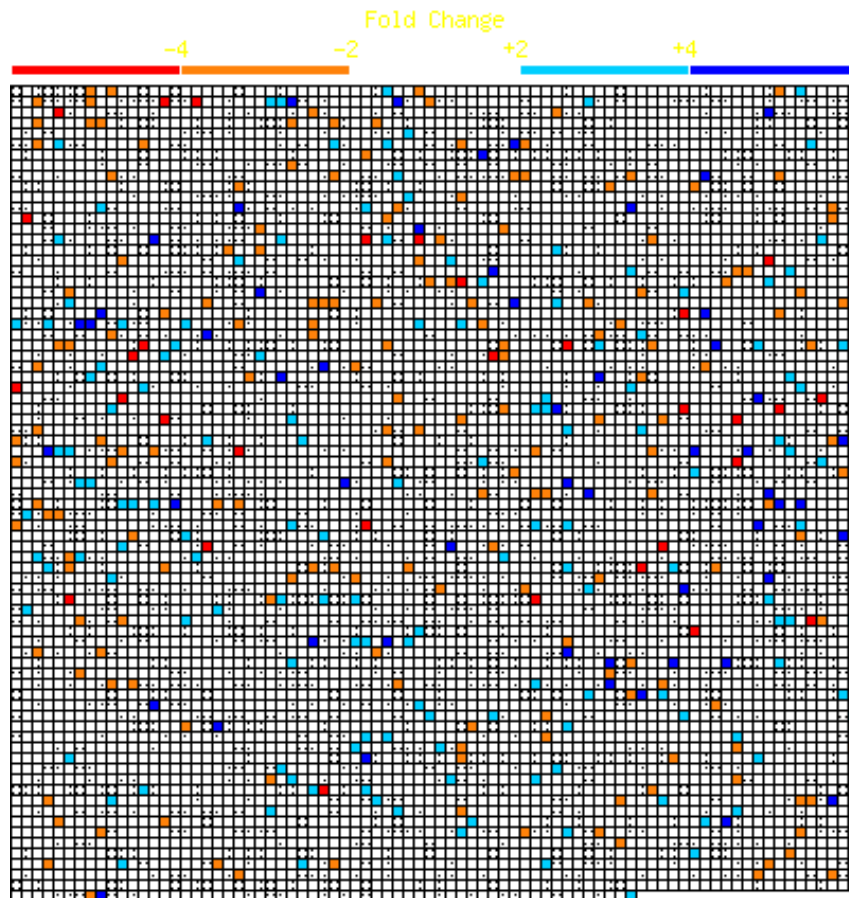


Abb.3.2.1.1.: Cdc73 reguliert ca. 8% der Gene aus *S. cerevisiae*. Die einzelnen Gene sind durch Quadrate dargestellt. Dabei sind Gene, die im CDC73 Δ -Stamm zwei- bis vierfach herunterreguliert sind, in orange; Gene die mehr als vierfach herunterreguliert sind, in rot; Gene, die zwei- bis vierfach hochreguliert sind, in hellblau und Gene, die mehr als vierfach hochreguliert sind, in dunkelblau dargestellt. Weiße Quadrate sind Gene, die durch eine Deletion von Cdc73 unbeeinflusst bleiben.

Chromosomenlokalisierung

Es wurde eine Lokalisation der durch Cdc73 regulierten Genen auf den Chromosomen des Genoms von *S. cerevisiae* durchgeführt. Es deutete sich dabei an, dass Cdc73 möglicherweise bevorzugt solche Gene negativ reguliert, die in der Nähe von den Telomeren liegen (Abb.3.2.1.2.).

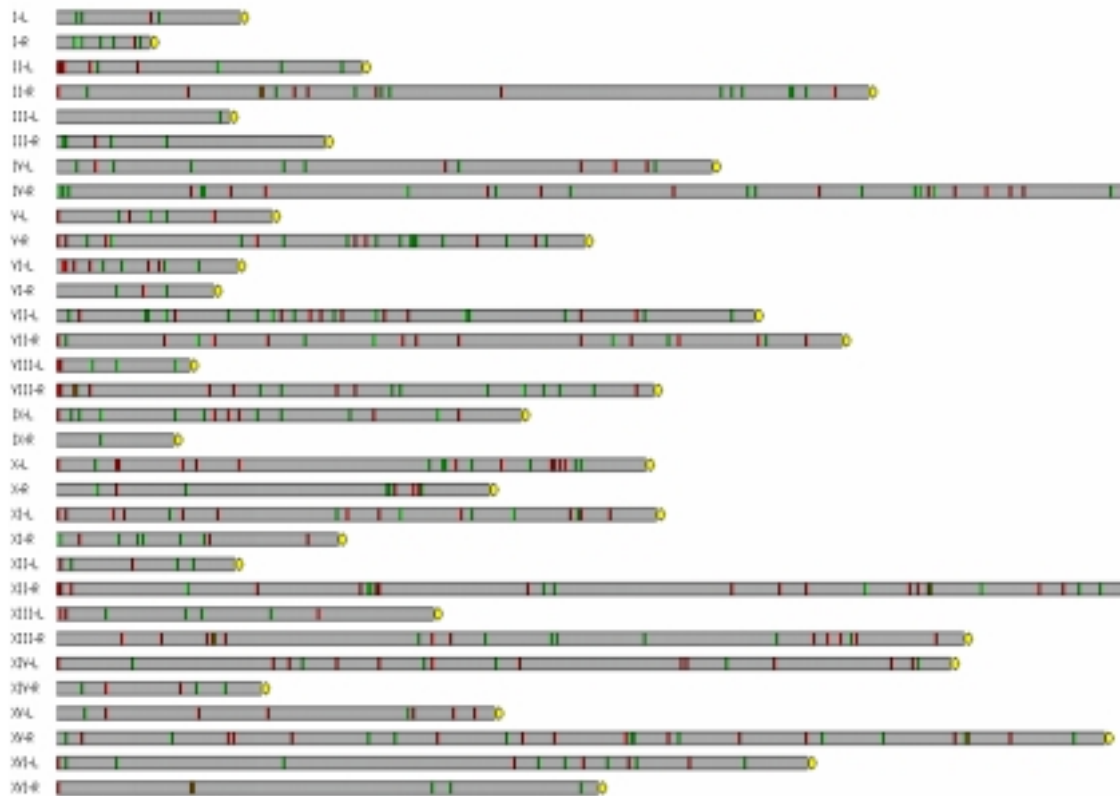


Abb.3.2.1.2: Cdc73 reguliert telomernahe Gene. Die Abbildung zeigt jeweils den linken und den rechten Arm der 16 Chromosomen von *S. cerevisiae*. Die einzelnen Gene sind als Rechtecke dargestellt. Im Falle eines Gens das im CDC73 Δ -Stamm herunterreguliert wurde, ist das Rechteck grün gefärbt. Die roten Rechtecke repräsentieren Gene, die im CDC73 Δ -Stamm hochreguliert sind. Centromere sind durch gelbe Kreise dargestellt. Der rechte Arm von Chromosom V und XII musste zu Gunsten der Größe der Abbildung abgeschnitten werden. Die vollständige Abbildung ist im Anhang dargestellt.

Eine Quantifizierung der Gene, die durch Cdc73 reguliert werden und die in der Nähe der Telomere lokalisiert sind, ergab, dass 12,3% der Gene im Bereich bis zu 10kb Entfernung von den Telomeren im CDC73 Δ -Stamm dereprimiert sind. Mit wachsender Entfernung von den Telomeren verringert sich die Zahl der durch Cdc73 reprimierten Gene. So sind nur 2,9% der Gene im Bereich von 10-20kb Entfernung von den Telomeren reprimiert. Im Bereich 20-30kb Entfernung nimmt sie auf 0,7% und im Bereich 30-40kb auf 1,4% ab (Tab.3.2.1.1.). Anhand eines χ^2 -Tests wurde die Signifikanz dieser Ergebnisse berechnet (Wyrick et al., 1999). Dadurch sollte ermittelt werden, ob die Zahl der im Bereich der Telomere reprimierten Gene signifikant größer ist, als die Zahl der im gesamten Genom reprimierten Gene.

Im Bereich von 0-10kb Entfernung von den Telomeren liegen 121 Gene. Wenn die Gene, die durch Cdc73 reprimiert werden, zufällig über das Genom verteilt wären, so wäre für diesen Bereich zu erwarten, dass im CDC73 Δ -Stamm 5 Gene dereprimiert wären. Die Expressionsanalyse hat zeigte jedoch, dass 15 Gene in diesem Bereich

Entfernung von den Telomeren	Zahl der dereprimierten Gene	X ²
0-10kb	12,3%	20
10-20kb	2,9%	0,3
20-30kb	0,7%	0,7
30-40kb	1,4%	0,3

Tab. 3.2.1.1.: Es wurde quantifiziert, welcher Anteil der im telomernahen Bereich liegenden Gene im CDC73-KO dereprimiert wurde. Des weiteren wurde zur Ermittlung der Signifikanz ein Wert für X² ermittelt.

dereprimiert sind. Wurde daraus ein X²-Wert gebildet, so ergab sich eine Zahl von 20. Ein Ergebnis ist per Definition signifikant, wenn der X²-Wert größer als 10 ist. Das heißt, im Bereich von 0-10kb sind signifikant mehr Gene im CDC73 Δ -Stamm dereprimiert, als im restlichen Genom von *S. cerevisiae*, damit wurde gezeigt, dass CDC73 ist an der Repression telomernaher Gene beteiligt ist.

3.2.2. Nhp6A/B und Cdc73 sind gemeinsam an der Genregulation beteiligt.

Nhp6A/B und Cdc73 haben einen ähnlichen Anteil an der Regulation des Genoms von *S. cerevisiae*. Das führte zu der Frage, ob es eine Gruppe von Genen gibt, deren Regulation sowohl von Nhp6A/B, als auch von Cdc73 abhängig ist.

Ein Vergleich der durch Nhp6A/B regulierten Gene mit den durch Cdc73 regulierten Genen konnte zeigen, dass es eine Gruppe von Genen gibt, die durch beide Gene reguliert werden. Insgesamt werden 159 Gene durch beide Faktoren reguliert. Dabei werden 93 Gene von beiden Faktoren positiv reguliert, während 66 Gene von beiden Faktoren negativ reguliert werden.

Das HO-Gen wird durch Nhp6A/B und Cdc73 reguliert

Eins der durch Nhp6A/B und Cdc73 regulierten Gene ist das HO-Gen. Es wird von beiden Faktoren positiv reguliert. Im NHP6 Δ -Stamm ist das HO-Gen im Vergleich zum WT-Stamm um den Faktor 11,8 herunterreguliert. Im CDC73 Δ -Stamm beträgt dieser Faktor 3,0.

Die Regulation des HO-Gens durch CDC73 ist möglicherweise indirekt

Es sollte anhand eines Chromatin-Immunopräzipitationsexperiments getestet werden, ob neben Nhp6B auch Cdc73 direkt an der Regulation des HO-Gens beteiligt ist.

Dazu wurde eine Chromatin-Immunopräzipitation eines Stammes durchgeführt, in dem Cdc73 an HA fusioniert war. Anschließend wurde eine PCR mit Primern durchgeführt, die ein 200 bp-Fragment aus den ersten 200 bp des HO-Promotors amplifizieren. Als Negativkontrolle für die Chromatin-Immunopräzipitation wurde ein Stamm benutzt, der WT-Cdc73 enthielt.

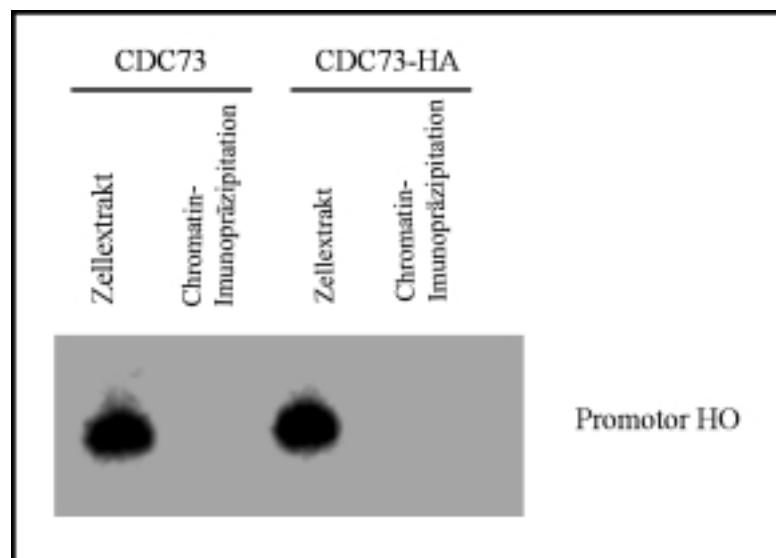


Abb. 3.2.2.1.: Cdc73 bindet *in vivo* nicht an den Promotor des HO-Gens. Der Promotor des HO-Gens konnte nach der Chromatin-Immunopräzipitation mit Cdc73-HA nicht nachgewiesen werden, während er aus den Zellextrakten amplifiziert werden konnte.

Eine Positivkontrolle für die Chromatin-Immunopräzipitation gab es nicht, da in der Literatur bisher kein Gen bekannt ist, das direkt durch Cdc73 reguliert wird. Als Positivkontrolle für die PCR-Bedingungen wurde jeweils nicht aufgereinigter Zellextrakt der für die Chromatin-Immunopräzipitation verwendeten Stämme benutzt.

Durch die PCR konnte das 200bp lange Fragment aus dem HO-Promotor amplifiziert werden, wenn Zellextrakt als Ausgangs-DNA verwendet wurde. Dadurch wurde gezeigt, dass die PCR-Bedingungen richtig waren. Es konnte jedoch kein Fragment amplifiziert werden, wenn die DNA aus der Chromatin-Immunopräzipitation verwendet wurde.

Cdc73 ist vermutlich indirekt an der Regulation des HO-Gens beteiligt, da *in vivo* keine Bindung von Cdc73 an den Promotor des HO-Gens gezeigt werden konnte.

4. Diskussion

4.1. Nhp6A/B

Nhp6A/B ist ein Protein aus *S. cerevisiae* mit einer Homologie zu HMG-Proteinen, denen eine Reihe von biologischen Funktionen zugewiesen wurden. HMG-Proteine sollen an der Organisation der Nukleosomen, an Aktivierung und Repression von Transkription und an der DNA-Rekombination und -Reparatur beteiligt sein (Bustin, 1999). In Hefe gibt es zwei homologe Formen von Nhp6, A und B, die fast identisch sind und sich in ihren Funktionen komplementieren (Costigan et al., 1994). In verschiedenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Nhp6A/B an der Regulation von Transkription in *S. cerevisiae* beteiligt ist (Yen et al., 1998).

In dieser Arbeit wurde eine genomweite Expressionsanalyse mit einer Chromatin-Immunopräzipitation und einem Elektromobilitäts-Assay, sowie Mitteln der Informationstechnologie verbunden, um einen Einblick in die Funktion von Nhp6 in der Regulation von Transkription zu erhalten.

4.1.1. Die genomweite Expressionsanalyse

Der Anteil der durch Nhp6A/B regulierten Gene im Hefegenom ist relativ klein

Es wurde eine genomweite Expressionsanalyse mit einem Hefestamm durchgeführt, der eine Deletion für NHP6A und B hatte. Die Hefe wurde dafür zunächst in galaktosehaltigem Vollmedium kultiviert und danach vier Stunden in glukosehaltigem Vollmedium inkubiert. Für die Analyse wurde genomweit das Expressionsniveau eines WT-Stammes mit dem Expressionsniveau des NHP6 Δ -Stammes verglichen. Unterschiede im Expressionsniveau wurden als x-fache Veränderung angegeben.

In dieser Arbeit konnte das Expressionsniveau von 4683 Genen untersucht werden. Im NHP6 Δ -Stamm waren im Vergleich zum WT-Stamm 475 Gene mehr als zweifach verändert. Davon waren 279 Gene mehr als zweifach herunterreguliert und 206 Gene waren mehr als zweifach hochreguliert. Das heißt, in *S. cerevisiae* sind in

glukosehaltigem Vollmedium ca. 10% der Gene durch NHP6A/B reguliert, wobei der Anteil der negativ regulierten Gene etwa die gleiche Größenordnung hat, wie der Anteil der positiv regulierten Gene.

Die Deletion von NHP6A/B in *S. cerevisiae* hat einen sehr ausgeprägten Phänotyp. Ein Deletionsstamm wächst bei 30°C sehr langsam, ist temperatursensitiv bei 36°C (Costigan et al., 1994) und ist nicht mehr kreuzungsfähig wenn, NHP6A/B im α -Stamm deletiert wird. Es war deshalb von Interesse, durch eine genomweite Expressionsanalyse zu erfahren, welchen Anteil Nhp6A/B an der Transkriptionsregulation hat und welche Gene durch eine Deletion von NHP6A/B beeinflusst werden.

Durch die genomweite Expressionsanalyse konnten *in vivo* Informationen über eine potentielle Rolle von Nhp6A/B an der Transkriptionsregulation gewonnen werden. Die Expressionsanalyse zeigt, dass der ausgeprägte Phänotyp nicht durch eine große Zahl von Genen, die durch Nhp6A/B reguliert werden, erklärt werden kann. Die in dieser Arbeit durchgeführte Expressionsanalyse hat gezeigt, dass Nhp6A/B an der Regulation eines Anteils von 10% des Hefegenoms beteiligt ist. Der Anteil der Gene, die durch einen Faktor der Transkriptionsregulation beeinflusst werden, ist je nach Faktor sehr unterschiedlich. So wurde gezeigt, dass durch eine temperatursensitive Mutation in *Srb4* die Expression von 95% des Genoms von *S. cerevisiae* betroffen ist (Holstege et al., 1998), während eine Deletion von *Tup1* nur ca. 3% des Genoms betrifft (De Risi et al., 1997). Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass der Anteil der durch Nhp6A/B regulierten Gene in Wirklichkeit größer ist. Eine Expressionsanalyse ist nur in der Lage die Genexpression eines fixen Zeitpunktes unter den gewählten Bedingungen zu erfassen. Es ist möglich, dass Nhp6A/B an der Aktivierung von Genen beteiligt ist, die unter den gewählten Bedingungen nicht exprimiert werden. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass andere Kulturbedingungen ein anderes Bild für die Beteiligung von Nhp6A/B an der Genregulation geben würden. Für einen umfassenden Eindruck der Beteiligung von Nhp6A/B an der Transkriptionsregulation müssten weitere Expressionsanalysen unter verschiedenen Bedingungen, wie z.B. in Galaktose-Medium statt Glukose-Medium oder unter Stressbedingungen durchgeführt werden.

Ein weiterer Kritikpunkt der Expressionsanalyse ist, dass durch sie das mRNA-Niveau zum fixen Zeitpunkt gemessen wird. Dabei wird außer acht gelassen, dass die Stabilität der mRNA unter verschiedenen Bedingungen variiert (Cereghino und

Scheffler, 1996) und der Schluss vom mRNA-Niveau auf die Transkriptionsrate deshalb nicht immer genau ist. Für einen Überblick über die Veränderungen des mRNA-Niveaus, das nur von der Veränderung der Transkriptionsrate abhängig ist, müssten die Expressionsanalysen in Stämmen durchgeführt werden, in denen Proteine, die einen Einfluss auf die mRNA-Stabilität haben, nicht mehr funktionell sind. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass solche Analysen nicht durchführbar sind, da die Hefen vermutlich ohne solche Proteine nicht lebensfähig sind. So war es z.B. nicht möglich, eine Doppeldeletion von REG1, das an der mRNA-Stabilität von glukosereprimierbaren Genen beteiligt ist (Cereghino und Scheffler, 1996) und NHP6A/B zu schaffen. Eine solche Doppeldeletion ist synthetisch letal (persönliche Mitteilung, N. Lehming).

Die durch Nhp6A/B regulierten Gene sind zufällig über das Genom verteilt

In Abb.3.1.1.2. wurden den durch Nhp6A/B regulierten Genen ihre Loci auf den Chromosomen zugewiesen. Dadurch wurde gezeigt, dass es keine Bereiche im Genom von *S. cerevisiae* gibt, die durch Nhp6A/B bevorzugt reguliert werden, wie es z.B. für die Sir-Proteine 2 und 3 der Fall ist (Wyrick et al., 1999). Die durch Nhp6A/B regulierten Gene sind gleichmäßig über das Genom von *S. cerevisiae* verteilt. Das Fehlen bevorzugter Bereiche der Regulation durch Nhp6A/B weist darauf hin, dass die Wirkungs- oder Funktionsweise von Nhp6A/B nicht von der Position des regulierten Gens auf den Chromosomen abhängig ist, sondern vermutlich promotorspezifisch ist.

Ein gemeinsames Promotor-Motiv der durch Nhp6A/B regulierten Gene

Mit Hilfe eines Programms aus dem Internet (<http://genomatix.gsf.de/cgi-bin/matinspector/matinspector.pl>) wurden die ersten 400bp aus Promotoren von Genen, deren Expressionsniveau im NHP6 Δ -Stamm mehr als fünffach vom Expressionsniveau im WT abwich, nach gemeinsamen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren untersucht. Es wurden 56 Promotoren, die eine unterschiedliche Expression zeigten und sechs Promotoren, von Genen untersucht, deren Expressionsniveau im NHP6 Δ -Stamm unverändert war. Davon wurden 35 Promotoren positiv und 21 Promotoren negativ durch Nhp6A/B reguliert.

Es wurde ein fünf Basenpaare umfassendes Motiv gefunden, das 31 Promotoren von Genen gemeinsam war, deren Expression im NHP Δ -Stamm verändert war. Das Motiv wurde sowohl in Promotoren von Genen gefunden, die durch Nhp6A/B positiv reguliert werden, als auch in solchen Promotoren, die negativ reguliert werden. Es fehlte jedoch in den Promotoren der Gene, deren Expression unverändert war.

Das Motiv hatte die Sequenz CATTC. Dieses Motiv konnte in 14 der 31 Promotoren auf TCATTC und in 11 der Promotoren auf ACATTC erweitert werden. In den 25 Promotoren, die das Motiv CATTC nicht enthielten, war kein weiteres gemeinsames Binde-Motiv zu finden, das nicht auch in den Negativkontrollen zu finden war. Möglicherweise enthalten diese Promotoren ein gemeinsames Bindemotiv, das nicht in der Datenbank des Programms Matinspector vermerkt war.

Der Transkriptionsfaktor AbaA, der an das Motiv CATTC bindet, stammt aus dem Pilz *Aspergillus nidulans*. Die Suche nach einem auf Proteinebene homologen Transkriptionsfaktor aus *S. cerevisiae* hat zu keinem signifikanten Ergebnis geführt. Es wäre jetzt von großem Interesse, mit diesem Motiv in einer Hefe-Expressionsbank nach einem Protein zu suchen, das dieses Motiv bindet. Möglicherweise wäre dieses potentielle Bindeprotein ein Interaktionspartner von Nhp6A/B, mit dem es zusammen an der Transkriptionsregulation beteiligt ist.

Es scheint jedoch nicht ungewöhnlich zu sein, dass für gemeinsam regulierte Gene mit den üblichen Computerprogrammen kein gemeinsames Promotorfragment gefunden wird. Eine Promotoranalyse von Genen die durch Snf2 und Swi1 reguliert werden, hat ebenfalls keine Gemeinsamkeiten der Promotoren identifizieren können (Sudarsanam et al., 2000).

Die Suche nach Bindungsstellen oder Gemeinsamkeiten in einer großen Zahl von Promotoren gestaltet sich derzeit noch als schwierig und sehr zeitaufwendig. Es stellt sich dabei das Problem, dass es nicht ausreichend ist, die Promotoren Base für Base miteinander zu vergleichen, da die Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren oft an verschiedenen Positionen des Promotors lokalisiert sind. Das Programm Matinspector sucht in den Sequenzen der Promotoren nach Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, die in der Datenbank des Programms vermerkt sind. Zur Zeit ist diese Datenbank nur sehr beschränkt, sie enthält nur wenige Sequenzen für Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren aus *S. cerevisiae*. Es wäre jedoch eine Datenbank nötig, die alle bekannten DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren aus *S.*

cerevisiae mit ihren DNA-Bindungsstellen enthalten würde, um ein umfassendes Bild der Bindestellen eines Promotors zu erhalten.

Nhp6A/B reguliert a-spezifische Gene und die Gene der sauren Phosphatasen

Im NHP6 Δ -Stamm zeigen die Mitglieder einer kleinen Zahl von Gen-Familien eine Veränderung ihres Expressionsniveaus. Zum einen handelt es sich dabei um die Gene der sauren Phosphatasen Pho5, -11 und -12 und der Phosphatpermease Pho84 und zum anderen die a-spezifischen Gene MFA1 und BAR1.

Regulation der sauren Phosphatasen

Die Transkription der sauren Phosphatasen PHO5,-11,-12 und die Phosphatpermease PHO84 wird in einer Umgebung mit niedrigem Phosphatgehalt induziert. Die Hefen wurden in glukosehaltigem Vollmedium herangezogen, das ausreichend anorganisches Phosphat für das Wachstum der Hefen enthält. Unter solchen Bedingungen sind die Gene der sauren Phosphatasen nicht induziert (Johnston und Carlson; 1992). Bei der Veränderung der Transkriptionsrate dieser Gene handelt es sich deshalb um eine Veränderung der basalen Transkriptionsrate. Nhp6A/B ist für die basale Transkription dieser Gene nötig. Eine Deletion von NHP6A/B hat jedoch nur einen schwachen Einfluss auf die aktivierte Transkription von PHO5 (Paull et al., 1996). In einer genomweiten Expressionsanalyse eines SNF2 Δ - und eines SWI1 Δ -Stammes wurde ein ähnlicher Effekt auf die Transkriptionsrate der sauren Phosphatasen beobachtet. In beiden Deletionsstämmen war die Rate der basalen Transkription der sauren Phosphatasen und der Phosphatpermease im Vergleich zum WT verringert, während kein Effekt auf die aktivierte Transkription von PHO5 zu verzeichnen war (Sudarsanam et al., 2000). Snf2 und Swi1 sind Teil des sogenannten Swi/Snf-Komplexes, der durch die Fähigkeit, die Chromatinstruktur zu verändern (Kingston und Narlikar, 1999) an der Transkriptionsregulation beteiligt sein soll. Das Transkriptionsniveau der Aktivatoren Pho2 und -4 ist im NHP6 Δ -Stamm wie im SNF2- und SWI1 Δ -Stamm (Sudarsanam et al., 2000) unverändert. Es konnte auch

ausgeschlossen werden, dass Nhp6A/B durch eine Regulation von Snf2 auf die sauren Phosphatasen wirkt. Das Expressionsniveau von SNF2 ist im NHP6 Δ -Stamm unverändert. Nicht ausgeschlossen werden konnte, ob Nhp6A/B durch SWI1 auf die Transkriptionsrate der sauren Phosphatasen wirkt, da SWI1 nicht unter den Genen war, deren Expression in dieser Arbeit untersucht werden konnte.

Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass der Effekt von Nhp6A/B und Snf2 auf die Transkriptionsrate der sauren Phosphatasen direkt sein könnte und dass Nhp6A/B und Snf2 zusammen in der Transkriptionsregulation wirken. Immunopräzipitationen oder Proteininteraktions-Assays könnten weiteren Aufschluss über ein Zusammenwirken von Nhp6A/B und dem Swi/Snf-Komplex geben.

Regulation der a-spezifischen Gene aus *S. cerevisiae*

Die a-spezifische Gene spielen bei der Geschlechtsdifferenzierung von Hefe eine Rolle. Als einfacher eukaryontischer Organismus liegt sie normalerweise als Einzeller vor. Trotzdem existieren jedoch drei verschiedene Zelltypen von *S. cerevisiae*, der a-, α - und der a/ α -Zelltyp. Die a und α -Zellen haploid und sie können zusammen eine diploide Zelle, eine a/ α -Zelle bilden. Die beiden Zelltypen unterscheiden sich unter anderem dadurch, dass sie jeweils ein charakteristisches Pheromon (a-Faktor bzw. den α -Faktor) und einen Pheromonrezeptor (Ste2 bzw. Ste3) sekretieren. Im Gegensatz dazu produziert die a/ α -Zelle keins dieser Proteine, ist aber in der Lage, zu sporulieren (Sprague et al., 1983). Die Differenzen zwischen diesen Zelltypen wird durch eine unterschiedliche Genexpression reflektiert. Es gibt vier verschiedene Klassen von Genen die an der Geschlechtsdifferenzierung beteiligt sind (Herskowitz, 1988)(Tab.4.1.1.).

Die genomweite Expressionsanalyse einer NHP6A/B-Deletion wurde in einem a-Stamm von *S. cerevisiae* durchgeführt. In a-Zellen werden die a-spezifischen Gene MFA1, MFA2, STE2 und STE6, sowie BAR1 exprimiert (Herskowitz, 1988). Im NHP6 Δ -Stamm ist das Expressionsniveau von MFA1 und BAR1 im Vergleich zur Expression im WT reduziert. Für MFA1 wurde die reduzierte Expression im NHP6 Δ -Stamm sowohl durch die genomweite Expressionsanalyse, als auch durch einen β -Galaktosidase-Assay gezeigt. Die β -Galaktosidase-Aktivität eines

Reporterkonstrukts aus dem MFA1-Promotor und dem lacZ-Gen hierzu beobachtet. Dabei wurde durch die Expressionsanalyse eine Reduktion des Expressionsniveaus um den Faktor 6,5 ermittelt, während sich für das Reporterkonstrukt nur einen Faktor 2 ergab. Der Effekt der Reduktion des Expressionsniveaus ist für die verschiedenen Techniken unterschiedlich stark, sie zeigen jedoch beide, dass Nhp6A/B an der positiven Regulation der a-spezifischen Gene beteiligt ist.

Gen-Klasse	Gene	Expression in Zelltyp
α -spezifische Gene	STE3, MF α 1 und MF α 2	α -Zellen
a-spezifische Gene	STE2, STE6, MFA1, MFA2 und BAR1	a-Zellen
Haploid-spezifische Gene	STE4, STE5, STE12, STE18, MAT α 1, MAT α 2, FUS1, SCG1, TY1 und RME1, sowie HO	a- und α -Zellen
Sporulations-spezifische Gene	SGA1, SPO11, SPO13, SPS1, SPS2, SPS3, SPS4 und SPS100	a/ α -Zellen

Tab.4.1.1.: Einteilung der in den verschiedenen Zelltypen von *S. cerevisiae* exprimierten Gene nach Herskowitz (1988).

Neben den a-spezifischen Genen ist auch die Expression des haploidspezifischen Gens HO im NHP6 Δ -Stamm reduziert. Das Expressionsniveau ist dabei im NHP6 Δ -Stamm ca. 12-fach herunterreguliert. In der Literatur wurde publiziert, dass ein Reporterkonstrukt aus dem HO-Promotor und dem lacZ-Gen im NHP6 Δ -Stamm ca. 2-fach herunterreguliert wurde (Sidorova und Breeden, 1999). Im Falle der Regulation des HO-Gens weicht der aus der Expressionsanalyse ermittelte Wert für die Reduktion der HO-Expression im NHP6 Δ -Stamm ebenfalls von dem Wert ab, der durch den β -Galaktosidase-Assay ermittelt wurde. Es scheint so zu sein, dass eine genomweite Expressionsanalyse sensitiver ist und deshalb stärkere Effekte produziert.

Die unterschiedlichen Werte können jedoch möglicherweise auch dadurch entstehen, dass es sich bei der Expressionsanalyse um eine Methode handelt, die das Expressionsniveau der Gene unter natürlichen Bedingungen ermittelt. Die Gene befinden sich an ihrem natürlichen Locus und die Stabilität der mRNA ist seinen natürlichen Regulationsmechanismen unterworfen. Im Gegensatz dazu wurde für den β -Galaktosidase-Assay ein Reporterkonstrukt verwendet, das in den natürlichen Locus des MFA1-Gens integriert wurde. Es besteht die Möglichkeit, dass die mRNA

des lacZ-Gens nicht den gleichen post-transkriptionellen Regulationsmechanismen unterworfen ist, wie die natürliche mRNA von MFA1. Außerdem wird im β -Galaktosidase-Assay eine Proteinaktivität gemessen, die möglicherweise nicht direkt das Expressionsniveau des Reporterkonstrukts widerspiegelt.

4.1.2. Nhp6B ist direkt an der Regulation des HO-und MFA1-Gens beteiligt

Die genomweite Expressionsanalyse ist nicht in der Lage, zwischen direkten und indirekten Effekten der transkriptionellen Regulation zu unterscheiden. Es wurde deshalb *in vivo* und *in vitro* untersucht, ob Nhp6B an der Regulation des HO-Gens und des MFA1-Gens beteiligt ist.

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal *in vivo* und *in vitro* gezeigt, dass NHP6B an den Promotor des HO-Gens bindet, während für NHP6A bereits vorher *in vitro* eine Bindung des HO-Promotors nachgewiesen werden konnte (Sidorova und Breeden, 1999). Somit lässt sich sagen, dass die beiden Proteine, Nhp6A und B, für die Regulation des HO-Promotors redundant sind.

Die Transkription des HO-Gens ist von der Präsenz des Swi/Snf-Komplexes abhängig (Nasmyth und Dirick, 1991). Damit ist das HO-Gen neben den sauren Phosphatase (Sudarsanam et al., 2000) ein weiteres Beispiel für ein mögliches Zusammenwirken des Swi/Snf-Komplexes mit NHP6A/B.

Im Elektromobilitäts-Assay wurde aufgereinigtes GST-Nhp6B-Fusionsprotein eingesetzt. Die Bande der durch GST-Nhp6B gebundenen DNA wandert unabhängig vom eingesetzten DNA-Fragment höher, je mehr GST-Nhp6B eingesetzt wird. Nhp6B interagiert mit sich selbst (persönliche Mitteilung, H. Laser) und es bildet sich deshalb vermutlich in Verbindung mit der DNA ein Komplex aus mehreren GST-Nhp6B-Molekülen, der umso größer ist, je mehr GST-Nhp6B eingesetzt wird.

Während durch eine Chromatin-Immunopräzipitation *in vivo* gezeigt werden konnte, dass der Promotor des HO-Gens direkt durch Nhp6B gebunden wird, war es nicht möglich, dies auch für den Promotor des MFA1-Gens zu zeigen. In einem Elektromobilitäts-Assay konnte jedoch gezeigt werden, dass Nhp6B *in vitro* im Gegensatz dazu beide Promotoren bindet. Durch die Berechnung der K_D -Werte wurde gezeigt, dass Nhp6B eine unterschiedliche Affinität für verschiedene DNA-Fragmente hat. Der K_D -Wert ist ein Maß für die Affinität mit der ein DNA-Fragment

durch ein Protein gebunden wird. Je kleiner der K_D -Wert ist, desto größer ist die Affinität des Proteins für das DNA-Fragment. Das Fragment MFA1-PF1, der Basen 0 bis -200 des MFA1-Promotors hat einen K_D -Wert von 5×10^{-8} mol/l, während er für MFA-PF2, dem Fragment aus den Basen -201 bis -400 des MFA1, 2×10^{-7} mol/l und für ein Fragment aus dem HO-Promotor 3.5×10^{-9} mol/l beträgt. Die Affinität von Nhp6B für die ersten 200bp des MFA1-Promotors ist größer, als die Affinität für die folgenden 200bp. Der Elektromobilitäts-Assay hat gezeigt, dass Nhp6B unterschiedliche Affinitäten für verschiedenen DNA-Fragmente hat, obwohl es jedes der Fragmente bindet. Es deutet sich an, dass Nhp6B möglicherweise an die ersten 200bp des Promotors von MFA1 bindet. Vermutlich sind jedoch weitere Faktoren nötig, die Nhp6B *in vivo* befähigen, DNA mit einer höheren Spezifität zu binden, als im Elektromobilitätsexperiment beobachtet wurde.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Nhp6B möglicherweise ebenso direkt an der Regulation des Promotors von MFA1, wie an der Regulation des Promotors von HO beteiligt ist.

Die Diskrepanz zwischen dem *in vivo*- und *in vitro*-Ergebnis für die Bindung des Promotors von MFA1 durch Nhp6B könnte dadurch erklärt werden, dass Nhp6B den MFA1-Promotor *in vivo* nur temporär bindet. Die Chromatin-Immunopräzipitation reflektiert ebenso wie die genomweite Expressionsanalyse nur den Zustand der Zelle während eines fixen Zeitpunktes und ist nicht in der Lage, dynamische Prozesse, wie sie unter natürlichen Bedingungen in der Zelle stattfinden, darzustellen. Möglicherweise bindet Nhp6B nur so lange an den Promotor von MFA1, bis die Aktivierung des Gens eingeleitet ist und ist nach erfolgter Aktivierung nicht mehr am Promotor präsent. Daraus würde sich im Falle des MFA1-Promotors ein Modell ableiten, in dem Nhp6B während der Umwandlung von der α -Zelle zur a-Zelle am Promotor von MFA1 präsent wäre. Da die Chromatin-Immunopräzipitation mit Zellen durchgeführt wurde, die bereits seit geraumer Zeit den Phänotyp einer a-Zelle hatten, wäre Nhp6B vermutlich nicht mehr am MFA1-Promotor präsent und könnte deshalb *in vivo* nicht detektiert werden.

4.1.3. Eine Deletion von NHP6A/B beeinflusst das Kreuzungsverhalten

Im NHP6 Δ -Stamm ist die Expression von Genen, die während des Kreuzens von *S. cerevisiae* eine Rolle spielen, reduziert. In einem Kreuzungsexperiment sollte untersucht werden, ob das geringere Expressionsniveau einen Einfluss auf das Kreuzungsverhalten von *S. cerevisiae* hat.

Das Experiment hat gezeigt, dass die Deletion von NHP6A/B nur dann einen Einfluss auf das Kreuzungsverhalten hat, wenn sich die Deletion in einem α -Stamm befindet. Ist NHP6A/B im α -Stamm deletiert, so ist die Hefe nicht mehr zu einer Kreuzung fähig. Dieser Phänotyp ähnelt dem Phänotyp einer Deletion von Tup1 in α -Zellen, die zu deren Sterilität führt (Lemontt, 1980; Smith und Johnson, 2000). Es wurde gezeigt, dass Nhp6B *in vivo* und *in vitro* mit Tup1 interagiert und dass es für die Glukose-Repression von GAL1 nötig ist (Laser, 2000). Nhp6A/B ist nicht für die Repression von MFA1 im α -Stamm notwendig. Es ist jedoch möglich, dass es durch eine Deletion von NHP6A/B zur Derepression anderer a-spezifischer Gen im α -Stamm kommt und die α -Zellen deshalb nicht mehr in der Lage sind, sich mit a-Zellen zu kreuzen. Eine genomweite Expressionsanalyse in einem α -Stamm der eine Deletion für NHP6A/B enthält, würde Aufschluss über die Frage geben, ob Nhp6A/B an der Repression von anderen a-spezifischen Genen beteiligt ist.

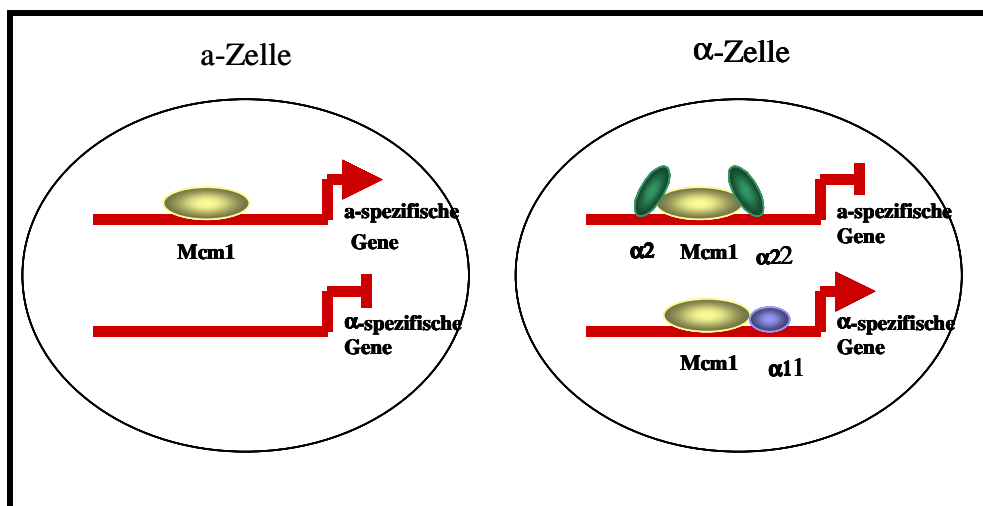


Abb.4.1.3.1.: Schematische Darstellung der dualen Funktion von Mcm1 in *S. cerevisiae*. In der a-Zelle ist Mcm1 an der Transkription von a-spezifischen Genen beteiligt, während es in der α -Zelle an der Repression der a-spezifischen Gene und an der Transkription der α -spezifischen Gene mitwirkt.

Möglicherweise hat Nhp6A/B, wie Mcm1 (Keleher, et al., 1989), sowohl eine positive, als auch eine negative Funktion in der Regulation der α -spezifischen Gene. In α -Zellen ist Mcm1 zusammen mit Mf α 2 an der Repression von α -spezifischen Genen beteiligt (Keleher et al., 1989). Im α -Stamm hingegen ist Mcm1 für die Expression einiger α -spezifischer Gene notwendig (Johnson, 1995) (Abb.4.1.3.1.).

Wenn die Deletion von NHP6A/B dagegen in einem α -Stamm durchgeführt wird, so ist das Kreuzungsverhalten unbeeinflusst. Obwohl im α -NHP6 Δ -Stamm das Transkriptionsniveau von zwei Genen, deren Genprodukte an der Kreuzung von *S. cerevisiae* beteiligt sind, im Vergleich zum WT herunterreguliert ist, sind die Zellen zu einer Kreuzung fähig. Eine Betrachtung der absoluten Werte nach der Hybridisierung zeigt, dass MFA1 im untersuchten Stamm zur Gruppe der stark exprimierten Gene gehört. Für die meisten Gene bewegt sich der absolute Wert der OD₄₈₈ für die Genexpression im WT-Stamm in einer Größenordnung von ca. 100-1000, während er für MFA1 ca. 2500 beträgt. Im NHP6 Δ -Stamm ist dieser Wert 6,5-fach reduziert und liegt damit im Bereich 400. Die Genexpression von MFA1 ist im NHP6 Δ -Stamm nicht komplett ausgeschaltet, es ist wahrscheinlich noch so viel mRNA vorhanden, dass eine Kreuzung der Hefe möglich ist.

4.1.4. Zusammenfassung Nhp6A/B

Eine genomweite Expressionsanalyse eines Stammes, der eine Deletion für Nhp6A und B hatte, zeigte, dass Nhp6A/B an der Regulation von ca. 10% der Gene aus *S. cerevisiae* beteiligt ist. Mit Hilfe eines Chromatin-Immunopräzipitationsexperiments und eines Elektromobilitäts-Assays konnte *in vitro* und *in vivo* die direkte Regulation des HO-Gens durch Nhp6B nachgewiesen werden. Für das α -spezifische Gen MFA1 deutet sich eine direkte Regulation durch einen EMSA an, die durch das Chromatin-Immunopräzipitationsexperiment nicht nachgewiesen werden konnte. Außerdem ist Nhp6A/B an der Regulation der Basaltranskription der sauren Phosphatasen beteiligt. Eine Deletion von Nhp6A/B hat einen ähnlichen Phänotyp, wie eine Deletion von SWI1 und SNF2 (Sudarsanam et al., 2000). Nhp6A/B reguliert Gene, deren Expression vom Swi/Snf-Komplex abhängig ist. Möglicherweise gibt es eine Interaktion von Nhp6A/B und dem Swi/Snf-Komplex.

Aus der Kombination der Ergebnisse dieser Arbeit und der Literatur ergeben sich vier Modelle (Abb.4.1.4.1.) für eine Beteiligung von Nhp6A/B an der Regulation des Genoms von *S. cerevisiae*.

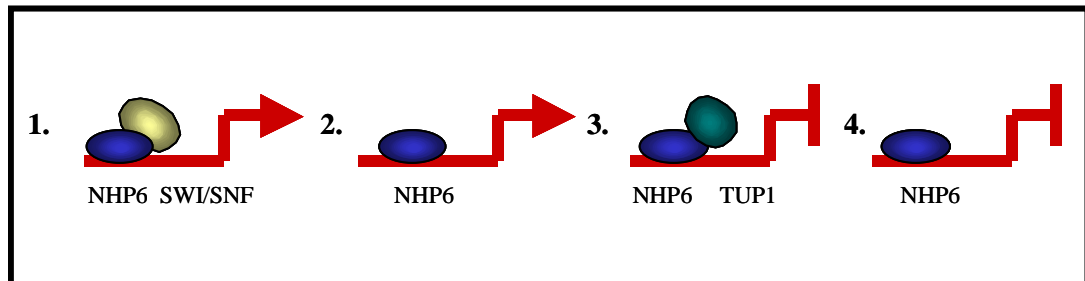


Abb.4.1.4.1.: Schema der möglichen Funktionsweisen von Nhp6A/B. 1. Nhp6A/B ist zusammen mit dem Swi/Snf-Komplex an der Expression von Genen beteiligt. 2. Nhp6A/B wirkt unabhängig vom Swi/Snf-Komplex an der Expression von Genen mit. 3. Die Repression der Gene ist von Nhp6A/B und Tup1 abhängig. 4. Nhp6A/B ist unabhängig von Tup1 an der Repression von Genen beteiligt.

Die erste Gruppe von Genen enthält Gene, deren Expression von NHP6A/B und dem Swi/Snf-Komplex abhängig ist. Dieser Gruppe gehören das HO-Gen (Cosma et al., 1999) und die Gene der sauren Phosphatasen an (Sudarsanam et al., 2000). Die nächste Gruppe repräsentiert Gene, deren Expression von Nhp6A/B, aber nicht vom Swi/Snf-Komplex abhängig ist. Zu dieser Gruppe von Genen gehört das aspezifische Gen MFA1, dessen Expression in der Deletion von NHP6A/B 6,5-fach reduziert ist, während sie in einer Deletion von SNF2 unverändert bleibt (Sudarsanam et al., 2000). Die dritte Gruppe von Genen beinhaltet solche Gene, die durch Tup1 und Nhp6A/B reprimiert werden. Dieser Gruppe gehört das GAL1-Gen (Laser, 2000) an. Der vierten Gruppe sind Gene zugeordnet, die durch Nhp6A/B unabhängig von Tup1 reprimiert werden.

Es ist nicht möglich, aus den Ergebnissen auf generelle Partner oder Funktionsmechanismen von Nhp6A/B zu schließen. Vielmehr scheint es so zu sein, dass Nhp6A/B ein genereller Faktor der Transkriptionsregulation ist, dessen Funktion von der Kombination mit anderen Faktoren der Transkriptionsregulation abhängig ist, wodurch vermutlich auch die Genspezifität von NHP6A/B entsteht.

4.2. Cdc73

CDC73 ist Teil eines RNA-Polymerase II-Holoenzym, das keine Srb-Proteine enthält. Es wurde postuliert, dass es eine kleine Gruppe von Genen gibt, deren Expression unabhängig von Srb-Proteinen sind. Des weiteren wurde Cdc73 als Interaktionspartner von Tup1 identifiziert (persönliche Mitteilung, N. Lehming). Es wurde eine genomweite Expressionsanalyse durchgeführt, die Aufschluss darüber geben sollte, welchen Einfluss eine Deletion von CDC73 auf die Genexpression von *S. cerevisiae* in Glukosemedium hat.

4.2.1. Genomweite Expressionsanalyse

Regulation durch CDC73

Es wurde eine genomweite Expressionsanalyse mit einem Hefestamm durchgeführt, der eine Deletion von CDC73 enthielt. Wie für die Expressionsanalyse von Nhp6A/B wurde der Stamm in glukosehaltigem Vollmedium herangezogen und für die Analyse wurde genomweit das Expressionsniveau eines WT-Stammes mit dem Expressionsniveau des CDC73 Δ -Stammes verglichen. Unterschiede im Expressionsniveau wurden als x-fache Veränderung angegeben.

In der genomweiten Expressionsanalyse des CDC73 Δ -Stammes konnte die Expression von 4667 Genen untersucht werden. Davon waren 208 Gene im Vergleich zum WT-Stamm mehr als zweifach hochreguliert und 198 Gene waren im Deletionsstamm mehr als zweifach herunterreguliert. In glukosehaltigem Vollmedium sind ca. 8% der Gene von Cdc73 reguliert. Wie für Nhp6A/B hat der Anteil der durch Cdc73 negativ regulierten Gene etwa die gleiche Größenordnung wie der Anteil der positiv regulierten Gene. Der Einfluss auf die Transkriptionsregulation von Cdc73 und Nhp6A/B ist mit 8-10% ebenfalls ähnlich groß. Im Gegensatz dazu steht der Einfluss essentieller Faktoren, wie z.B. Srb4. Durch eine genomweite Expressionsanalyse einer temperatursensitiven Mutante

dieses Faktors konnte gezeigt werden, dass die Expression von ca. 95% des Genoms von *S. cerevisiae* durch die Mutation beeinflusst ist (Holstege et al., 1998).

Cdc73 ist an der Repression von telomernahen Genen beteiligt

Die durch Cdc73 regulierten Gene wurden in Abb.3.2.1.2 ihren Loci auf den Chromosomen zugewiesen. Eine Betrachtung der Abbildung deutete an, dass im Bereich der Telomere mehr Gene durch eine Deletion von Cdc73 dereprimiert sind, als im übrigen Genom. Eine Quantifizierung der Gene, die in der Nähe der Telomere dereprimiert sind, konnte zeigen, dass bis zu einer Entfernung von 10kb 12,3% der Gene im CDC73 Δ -Stamm dereprimiert sind. Mit wachsender Entfernung nimmt der Anteil der dereprimierten Gene ab. Durch einen χ^2 -Test wurde gezeigt, dass diese Ergebnisse signifikant sind (Wyrick et al., 1999).

Es deutet sich an, dass Cdc73 eine Rolle im „Telomeric Silencing“ spielt. Die Sir-Proteine Sir2, -3, -4 und Rap4, denen ein wesentlicher Anteil am „Telomeric Silencing“ zugewiesen wurde (Aparicio et al., 1991), reprimieren 7-9% der Gene im Bereich von 20kb Entfernung von den Telomeren. Unter den durch die Sir-Proteine reprimierten Genen sind auch solche Gene, die durch M α 2 reprimiert werden (Wyrick et al., 1999). Tup1 ist neben den Sir-Proteinen ein weiterer Faktor, der an der Repression von telomernahen Genen beteiligt ist. So werden 13% der Gene im Bereich bis zu 20kb durch Tup1 reprimiert (De Risi et al., 1997).

In einem *in vivo*-Interaktionsexperiment konnte gezeigt werden, dass Cdc73 mit Tup1 interagiert (persönliche Mitteilung, N. Lehming). Es lag deshalb die Vermutung nahe, dass diese Interaktion eine Relevanz für die Repression von telomernahen Genen hat. Ein Vergleich der durch Tup1 reprimierten Gene (De Risi et al., 1997) mit den Genen, die durch Cdc73 reprimiert werden, sollte einen Hinweis darauf geben, ob die Vermutung richtig sein könnte. Der Vergleich wurde mittels eines Programms, das im Labor Young entwickelt wurde, durchgeführt. Der Vergleich konnte jedoch keine signifikante Überlappung der beiden Gen-Gruppen zeigen. Es wurden 6 Gene gefunden, die in den Deletionsstämmen von Tup1 und Cdc73 dereprimiert waren. Nur zwei dieser Gene lagen innerhalb eines Bereichs von 20kb Entfernung von den Telomeren. Die *in vivo* gefundene Interaktion von Cdc73

mit Tup1 hat wahrscheinlich keine Relevanz für die Repression von telomernahen Genen.

Der Vergleich der durch Cdc73 reprimierten Gene mit denen durch die Sir-Proteine regulierten Genen (Wyrick et al., 1999) konnte ebenfalls keine signifikante Überlappung zeigen. Die Vergleiche der dereprimierten Gene im CDC73 Δ -Stamm mit den dereprimierten Genen aus den SIR2,-3 und -4 Δ -Stämmen, sowie dem TUP1 Δ -Stamm deutet an, dass Cdc73 neben den Sir-Proteinen und dem Tup1/Ssn6 Repressorkomplex Teil eines neuen Repressorkomplexes von telomernahen Genen sein könnte. Da die Sir-Proteine nur für die Repression eines kleinen Teils der telomernahen Gene verantwortlich zeichnen (Wyrick et al., 1999) muss ein weiterer Repressorkomplex existieren, von dem Cdc73 eine Komponente sein könnte.

Stammunterschiede oder leichte Unterschiede der Kulturbedingungen können zu unterschiedlichen Ergebnissen von genomweiten Expressionsanalysen führen, deshalb ist Vorsicht bei der Interpretation von Vergleichen verschiedener Expressionsanalysen geboten. Ein solcher Vergleich ist nur dann wirklich aussagekräftig, wenn die verschiedenen Stämme parallel behandelt wurden und den gleichen Stammhintergrund haben, wie es für die Deletion von CDC73 und NHP6A/B der Fall war. Sind solche Voraussetzungen nicht gegeben, so können die Vergleiche nur eine Anregung für Modellvorstellungen geben, die durch weitere Experimente bestätigt werden müssen. Im Falle von Cdc73 würde das heißen, es müsste nach Interaktionspartnern gesucht werden, die ebenfalls an der Repression von telomernahen Genen beteiligt sind, um einen Repressorkomplex zu definieren. Ein möglicher Interaktionspartner könnte das Histon H4 sein, das an der Repression von 56% der Gene im Bereich bis zu einer Entfernung von 10kb von den Telomeren beteiligt ist (Wyrick et al., 1999).

Existenz eines alternativen Holoenzym

Cdc73 wurde als Teil eines RNA-PolIII-Komplexes identifiziert, der Cdc73, Paf1, Ccr4, Hpr1, Gal11, Sin4 und Rgr1 enthält, dem aber Srb-Proteine fehlen (Chang und Jaehning, 1997; Chang et al., 1999; Shi et al., 1997). Genomweite Expressionsanalysen einer temperatursensitiven Mutante von Srb4 haben gezeigt,

dass die Expression von 95% der Gene durch die Mutation verändert war (Holstege et al., 1998).

Es wurde postuliert, dass es eine kleine Gruppe von Genen gibt, deren Expression von einem RNA-PolIII-Holoenzym ist, das keine Srb-Proteine, dafür aber Cdc73 enthält. Die Frage, ob es tatsächlich eine kleine Gruppe von Genen gibt, deren Expression von Cdc73, nicht aber von einem der Srb-Proteine abhängig ist, konnte durch die genomweite Expressionsanalyse nicht beantwortet werden. Um diese Frage zu klären, wäre es nötig zu untersuchen, ob die Addition aller durch Srb-Proteine positiv regulierten Gene das gesamte Genom abdeckt. Wenn es eine Gruppe von Genen gegeben würde, deren Expression unabhängig von den Srb-Proteinen ist, so müsste geprüft werden, ob diese Gene von Cdc73 positiv reguliert werden.

Um die Frage zu klären müssten parallel genomweite Expressionsanalysen von Srb-Deletionen und einer Deletion von CDC73 durchgeführt werden, die miteinander verglichen werden könnten. Da es sich bei Srb4 und -7 jedoch um essentielle Proteine handelt, müssten anstatt von Deletionsmutanten jeweils temperatursensitive Mutanten der Proteine hergestellt und verglichen werden.

Repression durch Rekrutierung eines inaktiven Holoenzym?

Cdc73 ist als Teil eines RNA-PolIII-Holoenzym isoliert worden, das keine Srbs enthält (Chang et al., 1999).

Es konnte bisher nicht geklärt werden, ob es eine kleine Gruppe von Genen gibt, deren Expression nur von diesem alternativen Holoenzym abhängig ist und ob das alternative Holoenzym eine funktionelle Relevanz in der Transkription von Genen aus *S. cerevisiae* hat. CDC73 ist an der Repression von ca. 4,5% des Hefegenoms beteiligt, es ist jedoch nicht bekannt, in welcher Weise es reprimiert. Es besteht theoretisch die Möglichkeit, dass es sich bei dem alternativen Holoenzym um ein nicht funktionelles Holoenzym handelt, da es keine Srb-Proteine enthält und Srb4 für die Expression von 95% der Gene aus *S. cerevisiae* notwendig ist (Holstege et al., 1998). Die Rekrutierung eines nicht funktionellen Holoenzym durch CDC73 an einen Promotor würde zu einer Belegung des Transkriptionsstarts führen, ohne dass Transkription stattfinden würde. In diesem Modell würde das alternative Holoenzym

Teil eines Repressionsmechanismus sein, in dem CDC73 durch die Rekrutierung eines nicht funktionellen RNA-PolIII-Holoenzym reprimieren würde.

4.2.2. Nhp6A/B und Cdc73 überlappen in der Transkriptionsregulation

Cdc73 und Nhp6A/B haben einen ähnlichen Anteil an der Transkriptionsregulation. Es lag deshalb nahe, zu untersuchen, ob es unter den Genen, die durch Cdc73 und Nhp6A/B reguliert werden, eine Überlappung gibt. Insgesamt werden 159 Gene durch beide Faktoren reguliert. Davon werden 93 Gene von beiden Faktoren positiv und 66 Gene von beiden Faktoren negativ reguliert (Anhang). Das entspricht ca. 30% der durch das jeweilige Protein regulierten Gene. Möglicherweise haben Cdc73 und Nhp6A/B eine funktionelle Gemeinsamkeit.

Eins dieser Gene, die durch Cdc73 und Nhp6A/B reguliert werden, ist das HO-Gen, das im NHP6 Δ -Stamm 11,8-fach und im CDC73 Δ -Stamm 3,0-fach herunterreguliert wird. Für Nhp6B konnte *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden, dass es an den HO-Promotor bindet.

Eine Chromatin-Immunopräzipitation mit einem HA-Cdc73-Fusionsprotein sollte zeigen, ob Cdc73 *in vivo* ebenfalls an den HO-Promotor bindet. Dies konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Für dieses Ergebnis gibt es verschiedene Erklärungen. Zum einen konnte nicht geprüft werden, ob die Chromatin-Immunopräzipitation erfolgreich war, da in der Literatur bisher kein Gen bekannt ist, dass direkt durch Cdc73 reguliert wird und zum anderen besteht die Möglichkeit, dass CDC73 nicht direkt an der Regulation des HO-Gens beteiligt ist.

4.2.3. Zusammenfassung CDC73

Durch eine genomweite Expressionsanalyse der Genexpression eines Stammes, der eine Deletion für Cdc73 hatte, konnte gezeigt werden, dass Cdc73 an der Regulation von ca. 8% des Genoms von *S. cerevisiae* beteiligt ist.

Eine Chromosomenlokalisierung, in der die durch Cdc73 regulierten Gene ihren Loci auf den Chromosomen zugewiesen wurden, konnte zusammen mit einer statistischen Auswertung zeigen, dass Cdc73 signifikant an der Repression von telomernahen

Genen beteiligt ist. Der Vergleich von Genen, die durch Cdc73 reprimiert werden, mit Genen die durch die Sir-Proteine oder Tup1 reprimiert werden, deutet an, dass Cdc73 möglicherweise Teil eines neuen Repressorkomplexes telomernaher Gene sein könnte, da es keine signifikante Überlappung der durch Cdc73 reprimierten Gene mit den Genen gibt, die durch die Sir-Proteine oder Tup1 reprimiert werden.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine genomweite Expressionsanalyse einer Deletion von NHP6A und B, sowie einer Deletion von CDC73 durchgeführt.

Die Expressionsanalyse hat gezeigt, dass Nhp6A/B unter den gewählten Bedingungen an der Regulation von ca. 10% des Genoms von *S. cerevisiae* beteiligt ist. Es ist jedoch möglich, dass der Anteil der durch Nhp6A/B regulierten Gene unter anderen Bedingungen anders ausfällt. Nhp6A/B ist für die Basaltranskription der sauren Phosphatasen und an der Transkription der α -spezifischen Gene MFA1 und BAR1, sowie des HO-Gens notwendig. *In vitro* konnte durch einen Elektromobilitäts-Assay gezeigt werden, dass Nhp6B an den Promotor von MFA1 und HO bindet, wobei es eine unterschiedliche Präferenz für verschiedene DNA-Fragmente zeigt. *In vivo* konnte für das HO-Gen ebenfalls eine Bindung des Promotors durch Nhp6B gezeigt werden. Die Ergebnisse für die sauren Phosphatasen und das HO-Gen aus der Expressionsanalyse ähneln den Ergebnissen einer genomweiten Expressionsanalyse von Swi1 und Snf2-Deletionen, was auf eine mögliche gemeinsame Funktion von Nhp6 und dem Swi/Snf-Komplex hindeutet.

Für Cdc73 hat die genomweite Expressionsanalyse gezeigt, dass Cdc73 an der Regulation von ca. 8% des Hefegenoms mitwirkt. Eine Lokalisation der durch Cdc73 regulierten Gene ließ darauf schließen, dass Cdc73 an der Repression telomernaher Gene beteiligt ist. Es besteht die Möglichkeit, dass Cdc73 Teil eines neuen Repressorkomplexes ist, der neben den Sir-Proteinen wirkt.

Im Genom von *S. cerevisiae* gibt es eine Gruppe von Genen, deren Expression durch Nhp6A/B und Cdc73 reguliert wird. Nhp6A/B und Cdc73 sind möglicherweise Teil einer Gruppe von Faktoren, die durch die Kombination mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren an der Transkriptionsregulation beteiligt sind und ihnen Spezifität verleihen.

Literaturverzeichnis:

Aparicio, O.M., Billington, B.L., and Gottschling, D.E. (1991). Modifiers of position effects are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*. *Cell* 66, 780-793

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1998). *Current Protocols in Molecular Biology* (USA: Jon Wiley & Sons Inc.)

Auble, D.T., Wang, D, Post K.W., and Han, S. (1997). Molecular analysis of the SNF2/SWI2 protein family member MOT1, an ATP-driven enzyme that dissociates TATA-binding protein from DNA. *Mol Cell Biol* 17, 4842-4851

Bauer, W., and Vinograd, J. (1968). The interaction of closed circular DNA with intercalative dyes. I. The superhelix density of SV40 DNA in the presence and absence of dye. *J. Mol. Biol.* 33, 141-171

Barberis, A., Pearlberg, J., Simkovich, N., Farrell, S., Reinagel, P., Bamdad, C., Sigal, G., and Ptashne, M. (1995). Contact with a component of the polymerase II holoenzyme suffices for gene activation. *Cell* 81, 359-368

Bianchi, M.E., Falcicola, L., Ferrari, S., and Lilley, D.M.J. (1992). The DNA binding site of HMG1 protein is composed of 2 similar segments (HMG-boxes), both of which have counterparts in other eukaryotic regulatory proteins. *EMBO J* 11, 1055-1063

Blackwood, E. M., and Kadonaga, J.T. (1998). Going the distance: a current view of enhancer action. *Science* 281, 61-63

Boeke, J.D., Trueheart, J., Nasoulis, G., and Fink, G.R. (1987). 5-Fluororotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol* 154, 164-175

Bruhn, L., and Sprague, G.F. (1994). MCM1 point mutants deficient in expression of alpha-specific genes: residues important for interaction with alpha1. *Mol Cell Biol* *14*, 2534-2544

Burns, N., Grimwade, B., Ross-Macdonald, P.B., Choi, E.Y., Finberg, K., Roeder, G.S., and Snyder, M. (1994). Large-scale analysis of gene expression, protein localization, and gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* *8*, 1087-1105

Bustin, M., Lehn, D.A., and Landsman, D. (1990). Structural features of the HMG chromosomal proteins and their genes. *Biochim Biophys Acta* *1049*, 231-43

Bustin, M., and Reeves, R. (1996). High-mobility-group chromosomal proteins; architectural components that facilitate chromatin function. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* *54*, 35-100

Bustin, M. (1999). Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol Cell Biol* *19*, 5237-5346

Carlson, M. (1997). Genetics of transcriptional regulation in yeast: Connections to the RNA polymerase II CTD. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *13*, 1- 23

Cereghino, G.P., and Scheffler, I.E. (1996). Structural features of the HMG chromosomal proteins and their genes. *Biochim Biophys Acta* *1049*, 231-243

Chatterjee, S., and Struhl, K. (1995). Connecting a promoter-bound protein to TBP bypasses the need for a transcriptional activation domain. *Nature* *374*, 820-822

Chambon, P. (1975). Eukaryotic nuclear RNA polymerases. *Annu. Rev. Biochem.* *44*, 613-638

- Chang, M., French-Cornay, D., Fan, H., Klein, H., Denis, C., and Jaehning, J. (1999). A complex containing RNA polymerase II, Paf1p, Cdc73p, Hpr1p, and Ccr4p plays a role in protein kinase C signalling. *Mol Cell Biol* 19, 1056-1067
- Chang, M., and Jaehning, J. (1997). A multiplicity of mediators: alternative forms of transcription complexes communicate with transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res.* 25, 4861- 4865
- Chee, M.S., Huan, X., Yang, R., Hubbell, E., Berno, A., Sten, D., et al. (1996). Accessing genetic information with high-density DNA arrays. *Science* 274, 610-614
- Clark, D.W., Tkacz, J.S., and Lampen, J.O. (1982). Asparagine linked carbohydrate does not determine the cellular location of yeast vacuolar nonspecific alkaline phosphatase. *J. Bacteriol.* 152, 865- 873
- Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (1997). General transcription factors for RNA-polymerase II. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol.Biol.* 56, 327-46
- Cosma, P.M., Tanaka, T., and Nasmyth, K. (1999). Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell* 97, 299-311
- Costigan, C., Kolodrubetz, D., and Snyder, M. (1994). NHP6A and NHP6B, which encode HMG1-like proteins, are candidates for downstream components fo the yeast SKT2 mitogen-activated proein kinase pathway. *Mol Cell Biol* 14, 2391-2403
- DeRisi, J.L., Iyer V.R., and Brown, P.O. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278, 680-686
- Dohmen, R.J., Stappen, R., McGrath, J.P., Forrova, H., Kalarov, J., Goffeau, A., and Varshavsky, A. (1995). An essential yeast gene encoding a homolog of ubiquitin-activating enzyme. *J Biol Chem* 270, 18099-18109

- Drysdale, C.M., Jackson, B.M., McVeigh, R., Klebanow, E.R., Bai, Y., Kokubo, T., Swanson, M., Nakatani, Y., Weil, P.A., and Hinnebusch, A.G. (1998). The Gcn4p activation domain interacts specifically *in vitro* with RNA polymerase II holoenzyme, TFIID, and the Adap-Gcn5p coactivator complex. *Mol Cell Biol* *18*, 1711-1724
- Farrell, S., Simkovich, N., Wu, Y., Barberis, A., and Ptashne, M. (1996). Gene activation by recruitment of the RNA polymerase II holoenzyme. *Genes Dev* *10*, 2359-2367
- Flanagan, P.M., Keleher, R.J.D., Sayre, M.H., Tschochner, H., and Kornberg, R.D. (1991). A mediator required for activation of RNA polymerase II transcription *in vitro*. *Nature* *350*, 436-438
- Fodor, S.T.A., Read, J.L., Pirrun, M.C., Styer, L., Lu, A.T., and Solas, D. (1991). Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* *251*, 767-773
- Ge, H., and Roeder, R.G. (1994). The high mobility group protein HMG1 can reversibly inhibit class II gene transcription by interaction with the TATA-binding protein. *J Biol Chem* *269*, 17136-17140
- Gietz, R.D., and St. Jean, A., Woods, R.A., and Schiestl, R.H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* *20*, 1425.
- Gonzales-Couto, E., Klages, N., and Strubin, M. (1997). Synergistic and promotor-selective activation of transcription by recruitment of TFIID and TFIIB. *Proc Natl Acad Sci USA* *4*, 8036-8041
- Goodfellow, P.N., and Lovell-Badge, R. (1993). Sry and sex determination in mammals. *Annu. Rev. Genet.* *27*, 71-92

Goppelt A., Stelzer G., Lottspeich F., and Meisterernst M. (1996). A mechanism for repression of class II gene transcription through specific binding of NC2 to TBP-promoter complexes via heterodimeric histone fold domains. *EMBO J* 15, 3105-3116

Grosschedl, R., Giese, K., and Pagel, J. (1994). HMG domain-proteins-architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet.* 10, 94-100

Hampsey, M. (1998). Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 465-503

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580

Haqq, C.M., King, C.Y., Ukiyama, E., Falsafi, S., Haqq, T.N., Donahoe, P.K., and Weiss, M.A. (1994). Molecular basis of mammalian sexual determination: activation of Müllerian inhibiting substance gene expression by SRY. *Science* 266, 1494-1500

Hecht, A., Strahl-Bolsinger, S., and Grunstein, M. (1996). Spreading of transcriptional repressor SIR3 from telomeric heterochromatin. *Nature* 383, 92- 96

Hengartner, C.J., Thompson, C.M., Zhang, J., Chao, D.M., Liao, S.M., Koleske, A.J., Okamura, S., and Young R.A. (1995). Association of an activator with an RNA polymerase II holoenzyme. *Genes Dev* 9, 897-910

Herskowitz, I. (1988). Life Cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 52, 536- 553

Holstege, F.C.P., Jennings, E.G., Wyrick, J.J., Lee, T.I., Hengartner, C.J., Green, M.R., Golub, T.R., Lander, E.S., and Young, R.A; (1998). Dissecting the Regulatory Circuitry of a Eukaryotic Genome. *Cell* 95, 717-728

Ingels, C.J., Shales, M., Cress, W.D., Triezenberg, S.J., and Greenblatt, J. (1991). Reduced binding of TFIID to transcriptionally compromised mutants of VP16. *Nature* 351, 588-590

Johnston, M., and Carlson, M. (1992). in *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces*, eds. Jones, E.W., Pringle, J.R. and Broach J.R. (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY) 2, 193-282

Johnson, A.D. (1995). Molecular mechanisms of cell type determination in budding yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 552-558

Keleher, C.A., Passmore, S., and Johnson, A.D. (1989). Yeast repressor $\alpha 2$ binds to its operator cooperatively with yeast Mcm1. *Mol Cell Biol.* 9, 5228-5230

Keleher, C.A., Redd, M.J., Schultz, J., Carlson, M., and Johnson, A.D. (1992). Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. *Cell* 68, 709-719

Kim, T.K., Zhao, Y., Ge H., Bernstein, R., and Roeder, R.G. (1995). TATA-binding protein residues implicated in a functional interplay between negative cofactor NC2 (Dr1) and general factors TFIIA and TFIIB. *J Biol Chem* 270, 10976-10981

Kingston, R.E., and Narlikar, G.J. (1999). ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev* 13, 2339-2352

Klages, N., and Strubin, M. (1995). Stimulation of RNA polymerase II transcription initiation by recruitment of TBP *in vivo*. *Nature* 374, 822-823

Keaveney, M., and Struhl, K. (1998). Activator mediated recruitment of the RNA polymerase machinery is the predominant mechanism for transcriptional activation in yeast. *Mol. Cell* 1, 917-924

Koh, S.S., Ansari, A.Z., Ptashne, M., and Young, R.A. (1998). An activator target in the RNA polymeraseII holoenzyme. *Mol. Cell* 1, 895-904

Koleske, A.J., and Young, R.A. (1994). A RNA polymeraseII holoenzyme responsive to activators. *Nature* 368, 466-469

Kolodrubetz, D., and Burgum, A. (1990). Duplicated NHP6 genes of *Saccharomyces cerevisiae* encode proteins homologous to bovine high mobility group protein1. *J Biol Chem* 265, 3234-3239

Laser, H. (2000). Das HMG-Protein NHP6B aus *S. cerevisiae* als neues regulatorisches Protein des GAL1-Promotors. Inaugural-Dissertation der Universität zu Köln.

Lashkari, D., DeRisi, F., McCusker, J., Namath, A., Gentile, V., and Hwang, S.(1997). Yeast genome microarrays for parallel genetic and gene expression analysis of the yeast genome. *Proc Natl Acad Sci USA*.

Lemontt, J.F. (1980). Genetic and physiological factors affecting repair and mutagenesis in yeast. *Basic Life Sci.* 15, 85-120

Lee, Y.C., and Kim, Y.J. (1998). Requirement for a functional interaction between mediator components Med6 and Srb4 in RNA polymerase II transcription. *Mol Cell Biol* 18, 5364-5370

Lee, T. I., Wyrick, J.J., Koh, S.S., Jennings, E.G., Gadbois, E.L., and Young, R.A. (1998). Interplay of positive and negative regulators in transcription initiation by RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell Biol* 18, 4455-4462

Lee, T.I., and Young, R.A. (1998). Regulation of gene expression by TBP-associated proteins. *Genes Dev* 12, 1398-1408

Leuther, K.K., and Johnston, S.A., (1992). Nondissociation of GAL4 and GAL80 *in vivo* after galactose induction. *Science* 256, 1333-1335

Li, Y., Bjorklund, S., Jiang, Y.W., Kim, Y.j., Lane, W.S., Stillman, D.J. and Kornberg, R.D. (1995). Yeast global transcriptional regulators Sin4 and Rgr1 are components of mediator complex/RNA polymerase II holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 10864-10868

Lopandic, K., Deana, A.D., S. Barbaric, and L.A. Pinna. (1987). Biochemical and genetic evidence that yeast extracellular protein phosphatase activity is due to acid phosphatase. *Biochem. Int.* 14, 627- 633

Ma J., and Ptashne M. (1987). The carboxy-terminal 30 amino acids of Gal4 are recognized by Gal80. *Cell* 50, 137-142

McGall, G., Labadie, J., Brock, P., Wallraff, G., Nguyen, T., and Hinsberg, W. (1996). Light-directed synthesis of high-density oligonucleotide arrays using semiconductor photoresists. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 13555-13560

Melcher, K., and Johnston, S.A. (1995). Gal4 interacts with TATA-binding protein and coactivators. *Mol Cell Biol* 15, 2839-2848

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51, 263-273

Myer, V.E., and Young, R.Y. (1998). RNA polymeraseII holoenzymes and subcomplexes. *J Biol Chem* 273, 27757- 27760

Nasmyth, K. and Dirick, L. (1991). The role of SWI4 and SWI6 in the activity of G1 cyclins in yeast. *Cell* 66, 995-1013

Nightingale, K., Dimitrov, S., Reeves, R. and Wolffe, A. (1996). Evidence for a shared structural role for HMG1 and linker histones B4 and H1 in organizing chromatin. *EMBO J* 15, 548-561

Novina, C.D., and Roy, A.L.(1996). Core promoters and transcriptional control. *Trends Genet.* 12, 351-355

Orphanides, G., Lagrange, T., and Reinberg, D. (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev* 10, 2657-2683

Oshima, Y., and Takano, I. (1971). Mating types in *Saccharomyces*: their convertibility and homothallism. *Genetics* 67, 327-335

Paull, T.T., Carey, M., and Johnson, R.C. (1996). Yeast HMG proteins NHP6A/B potentiate promotor-specific transcriptional activation in vivo and assembly of preinitiation complexes in vitro. *Genes Dev* 10, 2769-2781

Pease, A.C., Solas, D., Sullivan, E.J., Cronin, M.T., Holmes, C.P., and Fodor, S.P.A. (1994). Light-directed oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 5022-5026

Ptashne, M., and Gann, A. (1997). Transcriptional activation by recruitment. *Nature* 386, 569-577

Read, C.M., Cary, T.D., Crane-Robinson, C., Driscoll, P.C., Carillo, M.O.M., and Norman, D.G. (1995). The structure of the HMG box and its interactions with DNA. In Ekstein, F. and Lilley, D.M.J. (eds). *Nucleic Acids and Molecular Biology*. Springer.-Verlag, Berlin 9, 222-250

Reinberg D., Orphanides G., Ebright R., Akoulitchev S., Carcamao J., Cho H., Cortes P., Drapkin R., Flores O., Ha I., Inostroza J:A., Kim S., Kim T.K., Kumar., Lagrange T., LeRoy G., Lu H., Ma D.M., Maldoando E., Merino A., Mermelstein F., Olave I., Sheldon M., Shiekhattar R., and Ywawel L. (1998). The RNA polymerase II general transcription factors: past, present, and future. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 63, 83-103

Smith, R.L., and Johnson, A.D. (2000). Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *TIPS* 25, 325-330

Richard, G.F., Fairhead, C., and Dujon, B. (1997). Complete transcriptional map of yeast chromosome XI in different life conditions. *J Mol Biol.* 268, 303-321

Roeder, R.G. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* 21, 327-335

- Roeder, R.G., and Rutter, W.J. (1969). Multiple forms of DNA-dependent RNA-polymerase in eukaryotic organisms. *Nature* 224, 234-237
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning* (USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Smale, S.T., and Baltimore, D. (1989). The initiator as a transcription control element. *Cell* 57, 103-113
- Schmitt, M.E., Brown, T.A., and Trumppower, B.L. (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl Acids Res* 18, 3092-3092
- Sentenac, A. (1985) Eukaryotic RNA polymerases. *CRC Crit Rev Biochem.* 18, 31-90
- Sherman, F. (1991). Getting started with yeast. *Methods in Enzymology* 194, 3-21.
- Shevchenko, A., Jensen, O.N., Podtelejnikov, A.V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., et al. (1996). Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci USA*) 93, 14440-14445
- Shi, X., Chang, M., Wolfe, A.J., Chang, C.H., Frazer-Abel, A.A., Wade, P.A., Burton, Z.F., and Jaehning, J.A. (1997). Cdc73p and Paf1p are found in a novel RNA polymeraseII containing complex distinct from Srbp-containing holoenzyme. *Mol Cell Biol*.17, 1160-1169
- Shykind, B.M., Kim, J., and Sharp, P.A. (1995). Activation of the TFIID-TFIIA complex with HMG-2. *Genes Dev* 9, 1354-1365
- Sidorova, J., and Breeden, L., (1993). Analysis of the SWI4/SWI6 protein complex, which directs G₁/S-specific transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 13, 1069-1077

Sidorova, J., and Breeden, L. (1999). The MSN1 and NHP6A genes suppress SWI6 defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 151, 45-55

Sprague, G.F., and Herskowitz, I. (1981). Control of yeast cell type by the mating type locus. I. Identification and control of expression of the a-specific gene, BAR1. *J. Mol. Biol.* 153, 305- 321

Sprague, G.G., Jr., Blair, L.C., and Thorner, J. (1983). Cell interactions and regulation of cell type in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Microbiol* 37, 623-660

Strathern, J.N., Klar, A.J., Hicks, J.B., Abraham, J.A., Ivy, J.M., Nasmyth, K.A., and McGill, C. (1982). Homothallic switching of yeast mating type cassettes is initiated by double-stranded cut in the MAT locus. *Cell* 31, 183-192

Struhl, K. (1999). Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. *Cell* 98, 1-4

Sudarsanam, P., Iyer, V.R., Brown, P.O., and Winston, F. (2000). Whole-genome expression analysis of *sfn/swi* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci* 97, 3364-3369

Taketo, A. (1988). DNA transfection of *Escherichia coli* by electroporation. *Biochim. Biophys. Acta* 949, 318-324

Tremethick, D. J. and Molloy, P. L. (1988). Effect of high mobility group proteins 1 and 2 on initiation and elongation of specific transcription by RNA polymerase II *in vitro*. *Nucleic Acids Res* 16, 11107-11123

Vincent, A.C., and Struhl, K. (1992). ACR1, a yeast ATF/CREB repressor. *Mol Cell Biol* 12, 5394-5405

Vogel, K., and Hinnen, A. (1990). The yeast phosphatase system. *Mol. Microbiol.* 4, 2013- 2017

Wilson, K.L., and Herskowitz, I. (1984). Negative regulation of Ste6 gene expression by the $\alpha 2$ product of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 4, 2420- 2427

Wodicka, L., Don, H., Mittmann, M., Ho, M.H., and Lockhart, D.J. (1997). Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Biotechnol.* 15, 1359-1367

Wyrick, J.J., Holstege, F.C., Jennings, E.G., Causton, H.C., Shore, D., Grunstein M., Lander E.S., and Young R.A. (1999). Chromosomal landscape of nucleosome-dependent gene expression and silencing in yeast. *Nature* 402, 418-421

Yen, Y.M., Wong, B., and Johnson, R.C. (1998). Determinants of DNA binding and bending by the *Saccharomyces cerevisiae* high mobility group protein NHP6A that are important for its biological activities. Role of the unique N- terminus and putative intercalating methionine. *J. Biol. Chem* 273, 4424-4435

Anhang

A. Liste der Gene, die im NHP6A/B-Deletionsstamm im Vergleich zum WT-Stamm herunterreguliert wurden

Gen	x-fach herunterreguliert	Funktion nach YPD Title Line, copyright Proteome. Inc.
PUR5	26.0	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase, converts inosine 5'-phosphate and NAD(+) to xanthosine 5'-phosphate and NADH
PHO12	13.2	Acid phosphatase, secreted
HO	11.8	Homothallic switching endonuclease, initiates mating type interconversion by making a double-stranded break in the expressed MAT gene
PHO11	10.9	Acid phosphatase, secreted
RPL7B	10.9	Ribosomal protein L7B; (Yeast L6) (YL8B) (rp11) (E. coli L30) (rat L7)
YIL032C	9.2	Protein of unknown function
YAR066W	8.6	Protein of unknown function
YER121W	8.4	Protein of unknown function
SPL2	8.4	Putative inhibitor of the Pho80p-Pho85p cyclin-dependent protein kinase complex to block its ability to phosphorylate novel factors other than Pho4p
COS8	8.4	Protein with similarity to subtelomerically-encoded proteins such as Cos5p, Ybr302p, Cos3p, Cos1p, Cos4p, Cos8p, Cos6p, Cos9p
YEL045C	7.1	Protein of unknown function, has motifs typical of ATP/GTP binding sites
YPR053C	7.0	
YGL222C	7.0	Protein of unknown function
WSC4	6.9	Protein required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response
YOL161C	6.6	Protein with similarity to members of the PAU1 family
YDR539W	6.5	Protein of unknown function
PHO5	6.5	Acid phosphatase, repressible, requires glycosylation for activity
MFA1	6.5	Mating pheromone a-factor, exported from cell by Ste6p
YKR047W	6.5	Protein of unknown function
YOL150C	6.4	Protein of unknown function
DDR48	6.4	Stress protein induced by heat shock, DNA damage, or osmotic stress
YJL152W	6.3	Protein of unknown function
YDR149C	6.3	
YMR173WA	6.1	
POT1	6.1	3-Ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal (acetyl-CoA acyltransferase), catalyzes last step of peroxisomal fatty acid beta-oxidation
YBL053W	6.0	Protein of unknown function
TDH1	5.9	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1, converts D-glyceraldehyde 3-phosphate to 1,3-diphosphoglycerate
YHL037C	5.9	Protein of unknown function
YML032CA	5.6	
YMR172CA	5.5	

YDR024W	5.5	Protein of unknown function
GDH3	5.3	NADP-glutamate dehydrogenase 2, converts glutamate and NADP (+) to alpha-ketoglutarate, ammonia, and NADPH
GTT2	5.1	Glutathione transferase
YLR162W	5.1	Protein of unknown function
HSP26	5.1	Heat shock protein 26kD, expressed during entry to stationary phase and induced by osmostress
YGL121C	5.0	Protein of unknown function
BAR1	5.0	Secreted pepsin-like protease that degrades alpha-factor
PET122	5.0	Translational activator required for mitochondrial translation of COX3 mRNA
YGP1	4.9	Secreted glycoprotein produced in response to nutrient limitation
YDR543C	4.8	Protein with similarity to other subtelomerically-encoded proteins
YFL032W	4.8	Protein of unknown function
GAL2	4.8	Galactose (and glucose) permease (facilitated diffusion transporter)
YDR220C	4.7	Protein of unknown function
YLR415C	4.6	Protein of unknown function
YKR105C	4.6	Member of major facilitator superfamily (MFS) multidrug-resistance (MFS-MDR) protein family
YGR219W	4.6	Protein of unknown function
PHD1	4.6	Transcription factor involved in regulation of filamentous growth
MRE11	4.6	Putative 5' to 3' exonuclease required for double strand break repair and meiotic recombination
YDR516C	4.5	Protein with similarity to Glk1p
YGR066C	4.5	Protein with similarity to Vid24p
YFL051C	4.5	Protein with similarity to Flo1p family of proteins
YAT1	4.4	Outer carnitine acetyltransferase, mitochondrial
YMR085W	4.4	
YGL182C	4.4	Protein of unknown function
YNR002C	4.2	Protein with similarity to Ycr010p
YNL150W	4.2	Protein of unknown function
YDR544C	4.2	Protein of unknown function
HXK1	4.1	Hexokinase I; glucose repressible enzyme that converts hexoses to hexose phosphates in glycolysis
DMC1	4.1	Meiosis-specific recombination protein structurally related to <i>S. cerevisiae</i> Rad51p, Rad55p, Rad57p, and to <i>E. coli</i> RecA
CYT1	4.1	Cytochrome c1; has an inner membrane space (IMS) sorting signal that does not require Imp1p for cleavage
YLR279W	4.1	Protein of unknown function
YDR215C	4.1	Protein of unknown function
YAR061W	4.1	Protein with similarity to N-terminus of Flo1p, probable pseudogene
CLB6	4.1	B-type cyclin appearing late in G1, involved in initiation of DNA synthesis
YLL032C	4.0	Protein of unknown function
ATR1	3.9	Aminotriazole and 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) resistance protein, member of major facilitator superfamily (MFS) multidrug-resistance (MFS-MDR) protein family
YGR243W	3.9	Protein of unknown function
YDR157W	3.9	
YDL096C	3.9	Protein of unknown function
PET117	3.9	Protein involved in assembly of cytochrome oxidase
POP8	3.8	Subunit of both RNase P and RNase MRP
YGL052W	3.8	Protein of unknown function
SAP4	3.8	Sit4p-associated protein
DAL4	3.8	Allantoin permease, member of the uracil/allantoin permease family of the major facilitator superfamily (MFS)

<u>YLR349W</u>	3.7	Protein of unknown function
<u>YJR160C</u>	3.7	Protein with strong similarity to maltose permeases (maltose/H ⁺ symporters) Mal31p and Mal61p, member of sugar permease family
<u>YJR087W</u>	3.7	Protein of unknown function
<u>YER084W</u>	3.7	Protein of unknown function
<u>YDR413C</u>	3.7	Protein of unknown function
<u>YDR327W</u>	3.7	Protein of unknown function
<u>YCR087W</u>	3.7	Protein of unknown function
<u>YCR024C</u>	3.7	Asparaginyl-tRNA synthetase, mitochondrial
<u>GPH1</u>	3.7	Glycogen phosphorylase, releases alpha-D-glucose-1-phosphate from glycogen
<u>YBL094C</u>	3.6	Protein with weak similarity to Neurospora crassa chitin synthase, may not be an expressed ORF
<u>AAD4</u>	3.6	Protein with similarity to aryl-alcohol dehydrogenases
<u>YPS5</u>	3.6	Yapsin 5, GPI-anchored aspartyl protease
<u>YNR074C</u>	3.6	Protein with similarity to various reductases
<u>YGR073C</u>	3.6	Protein of unknown function
<u>YER188W</u>	3.6	Protein of unknown function
<u>YDL172C</u>	3.6	Protein of unknown function
<u>YBR180W</u>	3.6	Member of major facilitator superfamily (MFS) multidrug-resistance (MFS-MDR) protein family
<u>JEN1</u>	3.6	Protein with similarity to E. coli osmoregulatory proP proline/betaine transporter and KgtP alpha-ketoglutarate transporter, member of the major facilitator superfamily
<u>HOP1</u>	3.6	Meiosis-specific protein associated with lateral elements of the synaptonemal complex, involved in homologous chromosome synapsis and chiasmata formation
<u>ZTA1</u>	3.5	Zeta-crystallin homolog, has similarity to E. coli quinone oxidoreductase and human zeta-crystallin which has quinone oxidoreductase activity
<u>YDR533C</u>	3.5	Protein of unknown function
<u>YBL077W</u>	3.5	Protein of unknown function
<u>TEC1</u>	3.5	Transcriptional activator involved with STE12 in pseudohyphal formation
<u>PHO84</u>	3.5	High-affinity inorganic phosphate/H ⁺ symporter, member of sugar permease family
<u>PAU3</u>	3.5	Stress-induced protein of the PAU1 family, although homology does not extend to the serine-rich region
<u>YPR067W</u>	3.5	Protein of unknown function
<u>YNR014W</u>	3.5	Protein of unknown function
<u>YJL015C</u>	3.5	Protein of unknown function, overlaps with YJL016W
<u>YGL239C</u>	3.5	Protein of unknown function
<u>YDR250C</u>	3.5	Protein of unknown function
<u>SNZ2</u>	3.5	Member of the stationary phase-induced gene family which includes Snz1p and Snz3p
<u>ECM4</u>	3.5	Protein possibly involved in cell wall structure or biosynthesis
<u>BRR1</u>	3.5	Protein involved in snRNP biogenesis
<u>YML131W</u>	3.4	Protein of unknown function
<u>YJL027C</u>	3.4	Protein of unknown function
<u>YBL071C</u>	3.4	Protein of unknown function
<u>THI5</u>	3.4	Biosynthetic enzyme involved in pyrimidine biosynthesis pathway above the hydroxymethyl-pyrimidine precursor leading to the thiamine moiety
<u>HXT11</u>	3.4	Low-affinity glucose permease
<u>GRE2</u>	3.3	Protein induced by osmotic stress
<u>YNL013C</u>	3.3	Protein of unknown function, questionable ORF
<u>YML083C</u>	3.3	Protein of unknown function

<u>YLR416C</u>	3.3	Protein of unknown function
<u>YJR038C</u>	3.3	Protein of unknown function
<u>YJR037W</u>	3.3	Protein of unknown function
<u>YJL077C</u>	3.3	Protein of unknown function
<u>YJL075C</u>	3.3	Protein of unknown function
<u>YIL132C</u>	3.3	Protein of unknown function
<u>YER106W</u>	3.3	Protein of unknown function
<u>YDR541C</u>	3.3	Protein with weak similarity to dihydroflavonol-4-reductases
<u>MSH5</u>	3.3	Meiosis-specific protein involved in reciprocal recombination, not involved in mismatch repair
<u>YRO2</u>	3.2	Protein with similarity to heat shock protein Hsp30p, has 7 potential transmembrane domains
<u>YLR154C</u>	3.2	Protein of unknown function
<u>LPP1</u>	3.2	Lipid phosphate phosphatase, Mg ²⁺ -independent
<u>YPL280W</u>	3.2	Protein of unknown function
<u>YOR072W</u>	3.2	Protein of unknown function
<u>YNL170W</u>	3.2	Protein of unknown function, questionable ORF
<u>YML089C</u>	3.2	Protein of unknown function
<u>YJL045W</u>	3.2	Protein with similarity to succinate dehydrogenase flavoprotein
<u>YGR268C</u>	3.2	Protein of unknown function
<u>YGL199C</u>	3.2	Protein of unknown function
<u>YCR105W</u>	3.2	Protein with similarity to bovine alcohol dehydrogenase
<u>SLS1</u>	3.2	Protein involved in mitochondrial metabolism
<u>HXT12</u>	3.2	Protein with similarity to hexose transporters (YIL170W and YIL171W are both homologous to HXT genes and are separated by a frameshift)
<u>TDH2</u>	3.1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2, converts D-glyceraldehyde 3-phosphate to 1,3-dephosphoglycerate
<u>GPD1</u>	3.1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD ⁺) (cytoplasmic); involved in glycerol production converting glycerol-3-phosphate and NAD ⁺ to dihydroxyacetone phosphate and NADH
<u>YKT9</u>	3.1	Protein of unknown function
<u>YGR131W</u>	3.1	Protein of unknown function
<u>YGL230C</u>	3.1	Protein of unknown function
<u>YGL109W</u>	3.1	Protein of unknown function
<u>YBR226C</u>	3.1	Protein of unknown function
<u>URA3</u>	3.1	Orotidine-5'-phosphate decarboxylase
<u>ARR1</u>	3.1	Transcription factor of the basic leucine zipper (bZIP) type, involved in arsenic resistance, one of eight members of a novel fungal-specific family of bZIP proteins
<u>YLR460C</u>	3.0	Protein with strong similarity to Ycr102p
<u>YLR050C</u>	3.0	Protein with similarity to C-terminal region of human MAC30
<u>YAR073W</u>	3.0	Protein with strong similarity to Pur5p, may be an inosine-5'-monophosphate dehydrogenase
<u>TFS1</u>	3.0	CDC25-dependent nutrient- and ammonia-response cell cycle regulator, suppressor of CDC25 mutations
<u>RPL15B</u>	3.0	Ribosomal protein L15B (Yeast L13) (YL10) (rp15R) (rat L15)
<u>PBI2</u>	3.0	Protease B (yycB or Prb1p) inhibitor 2 (I2B), has activity related to vacuolar fusion that is not related to protease activity
<u>OST4</u>	3.0	Oligosaccharyltransferase subunit of length 36 amino acids
<u>HXT4</u>	3.0	Moderate- to low-affinity hexose transporter, member of sugar permease family
<u>YPL102C</u>	3.0	Protein of unknown function
<u>YOR053W</u>	3.0	Protein with similarity to protamines
<u>YLR327C</u>	3.0	Protein with strong similarity to Stf2p
<u>YLR042C</u>	3.0	Protein of unknown function
<u>YKL044W</u>	3.0	Protein of unknown function
<u>YIL141W</u>	3.0	Protein of unknown function

<u>YDR255C</u>	3.0	Protein of unknown function
<u>VPS28</u>	3.0	Protein required for traffic to the vacuole through the endocytic and biosynthetic pathways
<u>YPL019C</u>	2.9	Protein of unknown function
<u>YER046W</u>	2.9	Protein of unknown function
<u>MRS4</u>	2.9	Splicing protein and member of the mitochondrial carrier (MCF) family, can suppress mitochondrial splicing defects
<u>FLR1</u>	2.9	Protein with similarity to members of the major facilitator superfamily (MFS) multidrug-resistance proteins family
<u>YNL195C</u>	2.9	Protein of unknown function
<u>YMR117C</u>	2.9	Protein of the spindle pole body
<u>YLR040C</u>	2.9	Protein of unknown function
<u>YJR078W</u>	2.9	Protein with similarity to indoleamine 2,3-dioxygenase
<u>YCL042W</u>	2.9	Protein of unknown function
<u>YPL274W</u>	2.8	Protein with similarity to Gap1p and other amino acid permeases
<u>YNL134C</u>	2.8	Protein with similarity to C. carbonum toxD gene
<u>SDH1</u>	2.8	Succinate dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein (Fp) subunit, converts succinate + ubiquinone to fumarate + ubiquinol in the TCA cycle
<u>AGA2</u>	2.8	a-Agglutinin binding subunit
<u>YPR007C</u>	2.8	Protein of unknown function
<u>YOR013W</u>	2.8	Protein of unknown function
<u>YGR293C</u>	2.8	Protein of unknown function
<u>YDR126W</u>	2.8	
<u>YDL085W</u>	2.8	Protein with similarity to NADH dehydrogenase
<u>YBR022W</u>	2.8	Protein of unknown function
<u>UBP16</u>	2.8	Putative ubiquitin-specific protease
<u>TOF1</u>	2.8	Topoisomerase I interacting factor
<u>PGM2</u>	2.8	Phosphoglucomutase, major isozyme, interconverts Glc-1-P and Glc-6-P
<u>MBR3</u>	2.8	Protein that participates with Nam7p/Upf1p in suppression of mitochondrial splicing defect
<u>YGL104C</u>	2.7	Protein with strong similarity to glucose transport proteins
<u>YDR273W</u>	2.7	Protein of unknown function
<u>YDL156W</u>	2.7	Protein of unknown function, has WD (WD-40) repeats
<u>SOM1</u>	2.7	Protein required for mitochondrial inner peptidase function
<u>ADK2</u>	2.7	Adenylate kinase (GTP
<u>YPR126C</u>	2.7	Protein of unknown function, questionable ORF
<u>YOR391C</u>	2.7	Protein of unknown function
<u>YNR008W</u>	2.7	Protein with similarity to human phosphatidylcholine-sterol O-acyltransferase precursor
<u>YML058CA</u>	2.7	
<u>YLR374C</u>	2.7	Protein of unknown function
<u>YIL168W</u>	2.7	
<u>YFR035C</u>	2.7	Protein of unknown function
<u>YDL162C</u>	2.7	Protein of unknown function
<u>YAL045C</u>	2.7	Protein of unknown function
<u>YBR206W</u>	2.6	Protein of unknown function
<u>YBR139W</u>	2.6	Protein with similarity to serine-type carboxypeptidases
<u>RML2</u>	2.6	Mitochondrial ribosomal protein L2 of the large subunit
<u>PRY1</u>	2.6	Protein expressed under starvation conditions
<u>CYC1</u>	2.6	Cytochrome-c isoform 1; member of the cytochrome bc1 complex, predominant isoform during aerobic growth
<u>CDS1</u>	2.6	CDP-diacylglycerol (CDP-DAG) synthase
<u>YSC84</u>	2.6	Protein of unknown function
<u>YOL048C</u>	2.6	Protein of unknown function
<u>YCR085W</u>	2.6	Protein of unknown function

<u>YBL065W</u>	2.6	Protein of unknown function
<u>YAL034WA</u>	2.6	Protein of unknown function
<u>RCE1</u>	2.6	Protease involved in ras and a-factor terminal proteolysis
<u>MRPL31</u>	2.6	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
<u>YOX1</u>	2.5	Homeodomain protein that binds leu-tRNA gene
<u>YHR097C</u>	2.5	Protein of unknown function
<u>YHR049CA</u>	2.5	Protein of unknown function
<u>YHB1</u>	2.5	Flavo-hemoglobin of unknown function, distantly related to animal hemoglobins
<u>YER079W</u>	2.5	Protein of unknown function
<u>YCL073C</u>	2.5	Member of major facilitator superfamily (MFS) multidrug-resistance (MFS-MDR) protein family
<u>YCL035C</u>	2.5	Protein with similarity to thioltransferase Ttr1p
<u>UGA1</u>	2.5	4-Aminobutyrate aminotransferase (GABA transaminase), produces gamma-aminobutyric acid
<u>UBC5</u>	2.5	Ubiquitin-conjugating enzyme that with Ubc4p is responsible for most of ubiquitin-dependent protein degradation of short-lived and abnormal proteins
<u>RPL9B</u>	2.5	Ribosomal protein L9B (YL11) (rp25) (rp24) (E. coli L6) (rat L9)
<u>MOG1</u>	2.5	Protein that interacts with Gsp1p
<u>MAM33</u>	2.5	Mitochondrial protein required for normal respiratory growth
<u>ATP11</u>	2.5	F1-ATP synthase assembly protein
<u>ZIP1</u>	2.5	Structural protein of the synaptonemal complex central element, has predicted coiled-coil domain
<u>YOR343C</u>	2.5	Protein of unknown function
<u>YNL213C</u>	2.5	Protein of unknown function, lysine-rich
<u>YKR067W</u>	2.5	Protein with similarity to Sct1p
<u>YJR154W</u>	2.5	Protein of unknown function
<u>YJR114W</u>	2.5	Protein of unknown function
<u>YHR145C</u>	2.5	Protein of unknown function
<u>YAR069C</u>	2.5	Protein of unknown function, has 3 potential membrane spanning regions
<u>SWH1</u>	2.5	Protein of unknown function
<u>MDG1</u>	2.5	G-protein involved in adaptation to pheromone response
<u>GLC3</u>	2.5	alpha-1,4-glucan branching enzyme
<u>BBP1</u>	2.5	Protein of the spindle pole body that binds to Bfr1p
<u>YBL010C</u>	2.4	Protein of unknown function
<u>SSU1</u>	2.4	Plasma membrane protein involved in sulfite tolerance
<u>SOD2</u>	2.4	Manganese superoxide dismutase, mitochondrial
<u>RSC8</u>	2.4	Component of abundant chromatin remodeling complex (RSC)
<u>QCR7</u>	2.4	Ubiquinol cytochrome-c reductase subunit 7 (14 kDa protein), component of ubiquinol cytochrome-c reductase complex
<u>MDH1</u>	2.4	Malate dehydrogenase, mitochondrial
<u>GSP2</u>	2.4	GTP-binding protein of the ras superfamily involved in trafficking through nuclear pores
<u>YNR042W</u>	2.4	Protein of unknown function
<u>YHR182W</u>	2.4	Protein of unknown function
<u>YHL006C</u>	2.4	Protein of unknown function
<u>YDR029W</u>	2.4	Protein of unknown function
<u>YBL098W</u>	2.4	Kylnurenine 3-hydroxylase involved in tryptophan degradation and nicotinic acid synthesis
<u>OYE3</u>	2.4	NAPDH dehydrogenase (old yellow enzyme), isoform 3
<u>ZDS2</u>	2.3	Multicopy suppressor of sin4
<u>YJL012C</u>	2.3	Protein with weak similarity to Pho81p
<u>MNN1</u>	2.3	Alpha-1,3-mannosyltransferase; required for complex glycosylation of both N- and O-oligosaccharides
<u>LYS7</u>	2.3	Copper chaperone for superoxide dismutase Sod1p
<u>LYS20</u>	2.3	Probable homocitrate synthase or isopropylmalate synthase

<u>ERV1</u>	2.3	Protein essential for mitochondrial biogenesis and cell viability
<u>CWP1</u>	2.3	Mannoprotein of the cell wall; member of the PAU1 family
<u>YPR140W</u>	2.3	Protein with similarity to human Barth syndrome gene tafazzin
<u>YPL099C</u>	2.3	Protein of unknown function
<u>YOR218C</u>	2.3	Protein of unknown function
<u>MEF2</u>	2.3	Mitochondrial translation elongation factor, promotes GTP-dependent translocation of nascent chain from A-site to P-site of ribosome
<u>ARE2</u>	2.3	Acyl-CoA
<u>YJL068C</u>	2.2	Protein with similarity to human esterase D
<u>YIL124W</u>	2.2	Protein with similarity to insect-type alcohol/ribitol dehydrogenase and to Yir035p
<u>YDR470C</u>	2.2	Protein of the mitochondrial carrier (MCF) family
<u>YDR380W</u>	2.2	Protein with similarity to pyruvate decarboxylase, pyruvate oxidase, acetolactate synthase (large subunit), and other enzymes that require thiamine pyrophosphate
<u>RME1</u>	2.2	Zinc-finger transcription factor that represses meiosis in non- α /alpha cells
<u>OPI3</u>	2.2	Phospholipid-N-methyltransferase, carries out second and third methylation steps of the phosphatidylcholine biosynthesis pathway
<u>LSC2</u>	2.2	Beta subunit of succinyl-CoA synthetase (succinyl-CoA ligase) (succinate thiokinase)
<u>CIN4</u>	2.2	GTP-binding protein involved in chromosome segregation, mutants arrest at mitosis with loss of microtubule structure
<u>YLL016W</u>	2.2	
<u>YPL098C</u>	2.1	Protein of unknown function
<u>YMR195W</u>	2.1	Protein of unknown function
<u>YIL158W</u>	2.1	Protein with similarity to Ykr100p
<u>RIP1</u>	2.1	Ubiquinol cytochrome-c reductase iron-sulfur protein (Rieske iron-sulfur protein), component of ubiquinol cytochrome-c reductase complex
<u>CLB1</u>	2.1	G2/M-phase-specific cyclin
<u>ACH1</u>	2.1	Acetyl-CoA hydrolase, acyl CoA chains longer than acetyl are hydrolyzed slowly and inhibit the hydrolysis of acetyl-CoA
<u>SPR6</u>	2.0	Sporulation-specific protein
<u>YBL048W</u>	2.0	Protein of unknown function

B. Liste der Gene, die im NHP6A/B-Deletionsstamm im Vergleich zum WT-Stamm hochreguliert wurden

Gen	x-fach hochreguliert	Funktion nach YPD Title Line, copyright Proteome.Inc
<u>YHL049C</u>	23.5	Protein with similarity to other subtelomerically-encoded proteins including Yer189p, Yml133p, and Yjl225p, coded from a subtelomeric Y' region
<u>YHR214WA</u>	15.8	Protein of unknown function
<u>YHR081W</u>	8.6	Protein of unknown function
<u>YKL204W</u>	8.5	Protein of unknown function, probable purine nucleotide-binding protein
<u>YGR250C</u>	8.3	Protein of unknown function, has three RNA Recognition (RRM) domains
<u>BRR2</u>	8.2	RNA helicase-related protein required for pre-mRNA splicing
<u>YER137C</u>	7.9	Protein of unknown function, has motifs typical of heme-binding site of cytochrome c proteins
<u>YGL066W</u>	5.8	Protein with similarity to Dictyostelium discoideum G-box-binding factor
<u>PDR6</u>	5.7	Regulatory protein for pleiotropic drug resistance protein
<u>ZDS1</u>	5.6	Protein that regulates SWE1 and CLN2 transcription
<u>WHI3</u>	5.6	Protein involved in regulation of cell size, has 1 RNA recognition (RRM) domain
<u>SAT2</u>	5.6	Protein involved in osmotolerance
<u>YER018C</u>	5.5	Protein of the spindle pole body
<u>FBP26</u>	5.5	6-Phosphofructo-2-kinase / fructose-2,6-bisphosphatase
<u>BET4</u>	5.5	Geranylgeranyltransferase Type II alpha subunit, complexes with Bet2p
<u>KIN2</u>	5.3	Serine/threonine protein kinase, related to Kin1p and S. pombe KIN1
<u>YKL116C</u>	5.2	Serine/threonine protein kinase with similarity to S pombe nim1
<u>YBL004W</u>	5.2	Protein with similarity to members of the major facilitator superfamily (MFS)
<u>YLR112W</u>	5.0	Protein of unknown function
<u>YJL035C</u>	5.0	Protein of unknown function
<u>YGR271W</u>	5.0	Protein with similarity to Ski2p
<u>YGR230W</u>	5.0	Protein with similarity to Spo12p
<u>SNF11</u>	5.0	S.cerevisiae chromosome IV reading frame ORF YDR073w.
<u>TEL2</u>	4.9	Protein involved in controlling telomere length and telomere position effect
<u>KRE11</u>	4.9	Potential regulatory protein involved in synthesis of cell wall beta-1,6-glucan
<u>CDC39</u>	4.9	Nuclear protein that negatively affects basal transcription from many promoters
<u>UME6</u>	4.8	Negative transcriptional regulator involved in nitrogen repression and induction of meiosis
<u>FUR4</u>	4.8	Uracil permease, member of the uracil/allantoin permease family of the major facilitator superfamily (MFS)
<u>YNR059W</u>	4.7	Protein with similarity to Mnn1p and Yil014p
<u>YLR205C</u>	4.7	Protein of unknown function
<u>YHR151C</u>	4.7	Protein of unknown function
<u>YMR304CA</u>	4.6	
<u>APS3</u>	4.6	Clathrin-associated protein (AP) complex, small subunit
<u>YIL112W</u>	4.5	Protein with similarity to ankyrin and coiled-coil proteins

<u>YIL056W</u>	4.5	Protein of unknown function
<u>YDL129W</u>	4.5	Protein of unknown function
<u>YIL122W</u>	4.4	Protein of unknown function
<u>YHR033W</u>	4.3	Protein with similarity to Pro1p
<u>DNA2</u>	4.3	Protein that have DNA helicase, ssDNA-dependent ATPase, and ATP-dependent endonuclease activities
<u>YJL200C</u>	4.2	Protein with similarity to aconitase, has potential mitochondrial transit peptide
<u>YIL003W</u>	4.2	Protein with similarity to E. coli MRP protein
<u>YDR467C</u>	4.2	Protein of unknown function
<u>TUB4</u>	4.2	Gamma tubulin, required for microtubule organization and nuclear division
<u>ESC2</u>	4.2	Protein involved in chromatin silencing
<u>WTM2</u>	4.1	Transcriptional modulator protein involved in meiotic regulation and silencing
<u>YGR198W</u>	4.1	Protein of unknown function
<u>YGR089W</u>	4.1	Protein with similarity to human desmoplakin I PIR
<u>YBR225W</u>	4.1	Protein of unknown function
<u>YDR186C</u>	4.0	Protein of unknown function
<u>FZF1</u>	4.0	Putative transcription factor involved in sulfite metabolism
<u>YDR333C</u>	4.0	Protein of unknown function
<u>SWI3</u>	3.9	Component of SWI/SNF global transcription activator complex, acts to assist gene-specific activators through chromatin remodeling
<u>YNL101W</u>	3.8	Protein with similarity to members of a putative transporter family that includes Ybr089p, Yer064p, Yer119p, Yil088p, Ykl146p, and Ynl101p
<u>YIL019W</u>	3.8	Protein of unknown function, has potential coiled-coil region
<u>YDR141C</u>	3.8	Protein of unknown function, member of the major facilitator superfamily (MFS)
<u>PTP3</u>	3.8	Protein tyrosine phosphatase (PTPase) involved in Hog1p MAP kinase high-osmolarity sensing pathway
<u>YBL101WB</u>	3.7	
<u>YIL117C</u>	3.7	Protein of unknown function
<u>NCA1</u>	3.7	Protein required for accumulation of mitochondrial transcript of ATP9/OLI1
<u>MSH3</u>	3.7	Component with Msh2p of DNA mismatch binding factor, involved in mismatch repair involving microsatellite (short repeat) sequences
<u>HCA4</u>	3.7	Probable RNA helicase CA4, involved in ribosomal RNA processing
<u>ACE2</u>	3.7	Metallothionein expression activator with similarity to Swi5p
<u>YMR041C</u>	3.6	Protein of unknown function
<u>YHR189W</u>	3.6	Putative peptidyl-trna hydrolase
<u>YGR237C</u>	3.6	Protein of unknown function
<u>MUB1</u>	3.6	Zinc finger protein, involved in the regulation of bud site selection
<u>MRPS5</u>	3.6	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit
<u>SUA5</u>	3.5	Protein involved in translation initiation, mutant suppresses the affect of an aberrant upstream ATG in CYC1
<u>YGL045W</u>	3.5	Protein of unknown function
<u>YDR383C</u>	3.5	Protein of unknown function
<u>YDR104C</u>	3.5	Protein of unknown function
<u>BIO3</u>	3.4	DAPA aminotransferase, component of the biotin biosynthesis pathway
<u>YLR404W</u>	3.4	Protein of unknown function
<u>YKR029C</u>	3.4	Protein with similarity to E(z) Enhancer of zeste in the C-terminal domain, contains a PHD finger
<u>YHR031C</u>	3.4	Protein with similarity to Pif1p and other helicases
<u>YER077C</u>	3.4	Protein with similarity to class I tRNA synthetases
<u>CPA2</u>	3.3	Carbamoylphosphate synthase (glutamine-hydrolyzing) arginine-specific, large chain
<u>YBR238C</u>	3.3	Protein of unknown function

<u>UBP8</u>	3.3	Putative ubiquitin-specific protease
<u>FKH2</u>	3.3	Homolog of <i>Drosophila</i> forkhead protein
<u>RSP5</u>	3.2	Ubiquitin-protein ligase
<u>YNL119W</u>	3.2	Protein of unknown function
<u>YJL058C</u>	3.2	Protein of unknown function
<u>NUP188</u>	3.2	Nuclear pore protein (nucleoporin)
<u>MIP1</u>	3.2	Mitochondrial DNA-directed DNA polymerase
<u>ERR1</u>	3.2	Enolase-related subtelomeric sequence (see R316)
<u>AZF1</u>	3.2	Probable zinc-finger transcription factor
<u>ADE4</u>	3.2	Amidophosphoribosyltransferase (glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase), first step in de novo purine biosynthesis
<u>YLR326W</u>	3.1	Protein of unknown function
<u>YLR106C</u>	3.1	Protein with weak similarity near the N-terminus to Dyn1p and with weak similarity in the C-terminus to End3p
<u>TRA1</u>	3.1	Homolog of human TR-AP which associates with a domain of c-Myc essential for cellular transformation
<u>SSK2</u>	3.1	Map kinase kinase kinase (MAPKKK) of the high-osmolarity signal transduction pathway
<u>YLR392C</u>	3.1	Protein of unknown function
<u>YKR027W</u>	3.1	Protein of unknown function
<u>YHR155W</u>	3.1	Protein with similarity to Sip3p
<u>SMK1</u>	3.1	Sporulation-specific protein kinase of the MAP family required for completion of sporulation
<u>LHS1</u>	3.1	Hsp70 superfamily member required for efficient translocation of protein precursors across the ER membrane
<u>LCB4</u>	3.1	Long chain base kinase, involved in biosynthesis of sphingolipid
<u>IRE1</u>	3.1	Protein kinase and type I membrane protein involved in transmission of the unfolded protein response (UPR) from the ER lumen to nucleus, site-specific endoribonuclease that acts on the HAC1 mRNA transcript to remove an intron
<u>HCS1</u>	3.1	DNA helicase A and Dom34p-interacting protein (47, 2652, 2655, 32404, 32405)
<u>BUB2</u>	3.1	Checkpoint protein required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function
<u>YLR184W</u>	3.0	Protein of unknown function
<u>YLR111W</u>	3.0	Protein of unknown function
<u>YIL024C</u>	3.0	Protein of unknown function
<u>YGR068C</u>	3.0	Protein with similarity to Rod1p
<u>SRB6</u>	3.0	Component of the RNA polymerase II holoenzyme and Kornberg's mediator (SRB) subcomplex
<u>RIF1</u>	3.0	Rap1p-interacting factor, involved in telomere length regulation and transcriptional silencing
<u>BUL1</u>	3.0	Protein involved in the ubiquitination pathway
<u>YGR145W</u>	2.9	Protein with similarity to MESA gene of <i>Plasmodium falciparum</i>
<u>YBR077C</u>	2.9	Protein of unknown function
<u>YOR060C</u>	2.9	Protein of unknown function
<u>YJR033C</u>	2.9	Protein of unknown function
<u>YJL108C</u>	2.9	Protein of unknown function, contains 8 potential transmembrane domains
<u>YGL144C</u>	2.9	Protein of unknown function
<u>YEL029C</u>	2.9	Protein with similarity to putative <i>Salmonella</i> phosphotransferase system transcriptional regulator ptsJ
<u>YBR044C</u>	2.9	Protein with weak similarity to mitochondrial Hsp60p
<u>DHH1</u>	2.8	Putative RNA helicase of DEAD/DEAH box family
<u>YOR287C</u>	2.8	Protein with weak similarity to PITSLRE protein kinase isoforms
<u>YLR087C</u>	2.8	Protein of unknown function
<u>YJR130C</u>	2.8	Protein with similarity to O-succinylhomoserine (thiol)-lyase

<u>YHR209W</u>	2.8	Protein with similarity to Yer175p
<u>YDR334W</u>	2.8	Protein with similarity to Snf2p and other members of the Snf2p ATPase family
<u>YCR027C</u>	2.8	Protein with similarity to Dictyostelium ras-related protein
<u>SNU56</u>	2.8	U1 snRNA-associated protein
<u>NUF1</u>	2.8	Spindle pole body component with coiled-coil structure, determines the spacing between the ends of microtubules and the central plaque
<u>EPL1</u>	2.8	Protein of unknown function
<u>ECM22</u>	2.8	Protein with similarity to transcription factors, has Zn[2]-Cys[6] fungal-type binuclear cluster domain in the N-terminal region
<u>CIS1</u>	2.8	S.cerevisiae chromosome IV reading frame ORF YDR022c.
<u>YNR065C</u>	2.7	Protein with similarity to Pep1p
<u>RNA1</u>	2.7	GTPase-activating (GAP) protein for Gsp1p
<u>ZAPI</u>	2.7	Zinc-responsive transcriptional activator of zinc uptake system genes
<u>YOR041C</u>	2.7	Protein of unknown function
<u>YMR077C</u>	2.7	Protein with similarity to Snf7p
<u>YLR265C</u>	2.7	Protein of unknown function
<u>YDR326C</u>	2.7	Protein of unknown function
<u>YCL063W</u>	2.7	Protein with similarity to plant aminocyclopropane-1-carboxylate synthase
<u>RAD14</u>	2.7	Zinc-binding protein of nucleotide excision repairosome and homolog of human XPA xeroderma pigmentosum gene product
<u>PHO87</u>	2.7	Member of the phosphate permease family of the major facilitator superfamily
<u>PEX15</u>	2.7	Peroxisomal integral membrane protein required for peroxisome assembly
<u>PET18</u>	2.7	Protein involved in maintenance of mitochondrial DNA
<u>EXO70</u>	2.7	Component of exocyst complex, 70 kDa, required for exocytosis
<u>YJL039C</u>	2.6	Putative nuclear pore protein
<u>SKN7</u>	2.6	Transcription factor with homology to response regulator proteins of bacterial two-component systems and DNA-binding region of Hsf1p
<u>PPT1</u>	2.6	Protein serine/threonine phosphatase of unknown function, member of the PPP family of protein phosphatases and related to PP5 phosphatases, has tetratricopeptide (TPR) repeats
<u>YOR296W</u>	2.6	Protein that may be involved in bud-site selection
<u>YDR249C</u>	2.6	Protein with weak similarity to cytochromes
<u>YDR026C</u>	2.6	Protein with similarity to Reb1p
<u>RED1</u>	2.6	Meiosis-specific protein associated with lateral elements of the synaptonemal complex, involved in homologous chromosome synapsis and chiasmata formation
<u>GYP7</u>	2.6	GTPase-activating protein for Ypt7p
<u>GND2</u>	2.6	6-Phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating, converts 6-phosphogluconate + NADP to ribulose-5-phosphate + NADPH + CO ₂
<u>BNI4</u>	2.6	Protein that may be involved in linking chitin synthase III to septins of the neck filaments
<u>YGL088W</u>	2.5	Protein with similarity to Cyanophora paradoxa ribosomal protein secY
<u>YDR246W</u>	2.5	Protein of the TRAPP (transport particle protein) complex involved in protein transport from endoplasmic reticulum to Golgi
<u>BUR6</u>	2.5	Alpha subunit of NC2 (Dr1/Drap1) repressor of class II transcription
<u>YNL164C</u>	2.5	Protein of unknown function
<u>YIL073C</u>	2.5	Protein of unknown function, has cecropin family signature
<u>YFR046C</u>	2.5	Protein of unknown function
<u>WSC3</u>	2.5	Protein required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response
<u>SIP3</u>	2.5	Protein that interacts with Snf1p, contains a PH (pleckstrin) domain
<u>SAP155</u>	2.5	Sit4p-associated protein
<u>REF2</u>	2.5	Protein involved in mRNA 3'-end formation prior to polyadenylation, mutant has significantly lower usage of weak poly(A) sites

<u>RAD26</u>	2.5	Putative helicase homologous to Cockayne syndrome B gene ERCC-6, involved in transcription-coupled repair
<u>NAM8</u>	2.5	U1 snRNA-associated protein, essential for meiotic recombination and suppressor of mitochondrial splicing defects, has 3 RNA recognition (RRM) domains
<u>MID2</u>	2.5	Protein kinase A interference protein, multicopy suppressor of temperature sensitivity of htr1 null mutant
<u>MET4</u>	2.5	Transcriptional activator of the sulfur assimilation pathway, member of basic leucine zipper (bZIP) family
<u>LTV1</u>	2.5	Protein required for viability at low temperature
<u>KAR5</u>	2.5	Coiled-coil membrane protein, required for homotypic nuclear fusion
<u>HRD3</u>	2.5	Protein required for efficient degradation of Hmg CoA reductase isozyme Hmg2p
<u>ECM31</u>	2.5	Protein possibly involved in cell wall structure or biosynthesis
<u>BUD6</u>	2.5	Protein required for bipolar budding; mutant strains bud randomly
<u>YOL045W</u>	2.4	Serine/threonine protein kinase of unknown function
<u>YGR280C</u>	2.4	Protein of unknown function
<u>YAR1</u>	2.4	Protein with 2 ankyrin repeats
<u>MDM12</u>	2.4	Mitochondrial inheritance protein which may function in a complex with Mdm10p at the mitochondrial surface
<u>DFG5</u>	2.4	Protein required for filamentous growth, cell polarity, and cellular elongation
<u>YMR263W</u>	2.4	Protein of unknown function
<u>YML034W</u>	2.4	Protein of unknown function
<u>YJR012C</u>	2.4	Protein of unknown function
<u>POL4</u>	2.4	DNA polymerase related to human DNA polymerase beta, involved in DNA repair
<u>MAK10</u>	2.4	Glucose-repressible protein required for replication of double-stranded RNA (dsRNA) virus
<u>YOL155C</u>	2.3	Protein with similarity to <i>S. cerevisiae</i> glucan 1,4-alpha-glucosidase
<u>TAF17</u>	2.3	Component of TAF(II) complex
<u>SSD1</u>	2.3	Single-copy suppressor of many different mutations, associated with cytoplasmic RNA
<u>YJR003C</u>	2.3	Protein with weak similarity to human collagen alpha 3 (VI) chain precursor
<u>YIL029C</u>	2.3	Protein of unknown function
<u>VAC7</u>	2.3	Integral vacuolar membrane protein, involved in vacuole morphology and inheritance
<u>NPR2</u>	2.3	Nitrogen permease regulator
<u>IXR1</u>	2.3	Intrastrand crosslink recognition protein with 2 HMG boxes and transcription factor that confers oxygen (O ₂) regulation on COX5B
<u>CCE1</u>	2.3	Cruciform cutting endonuclease
<u>BUD4</u>	2.3	Protein required for formation of axial but not bipolar budding pattern
<u>YNL124W</u>	2.2	Protein of unknown function
<u>YDR107C</u>	2.2	Protein with strong similarity to Emp70p
<u>SUM1</u>	2.2	Suppressor of mar1-1 (sir2)
<u>SNQ2</u>	2.2	Multidrug resistance protein of the ATP-binding cassette (ABC) superfamily
<u>MOT1</u>	2.2	Transcriptional Accessory Protein (TAF) involved in transcriptional repression through interaction with TATA-binding protein
<u>MKC7</u>	2.2	Aspartyl protease of the periplasmic space, has similarity to Yps1p and Bar1p
<u>SMP3</u>	2.2	Protein required for plasmid maintenance, functions in the protein kinase C pathway
<u>PRP24</u>	2.2	Pre-mRNA splicing factor, responsible for reannealing U4 and U6 snRNAs to recycle snRNPs for subsequent splicing reactions, has 3 RNA recognition (RRM) domains
<u>MSB4</u>	2.2	Multicopy suppressor of bud emergence mutants
<u>HEM13</u>	2.2	Coproporphyrinogen III oxidase, oxygen-repressed, sixth step in heme

		biosynthetic pathway
<u>EBS1</u>	2.2	Protein with similarity to Est1p
<u>YGR260W</u>	2.1	Protein with similarity to Dal5p
<u>MDS3</u>	2.1	Negative regulator of expression of early meiotic genes
<u>CKA1</u>	2.1	Casein kinase II, catalytic (alpha) subunit
<u>UFD1</u>	2.1	Ubiquitin fusion degradation protein
<u>IRA1</u>	2.1	GTPase-activating protein for Ras1p and Ras2p

C. Liste der Gene, die im CDC73-Deletionsstamm im Vergleich zum WT-Stamm herunterreguliert wurden

Gen	x-fach herunterreguliert	Funktion nach YPD Title Line, copyright Proteome. Inc.
<u>DTP</u>	13.1	Mitochondrial dicarboxylate transport protein
<u>YIL032C</u>	9.2	Protein of unknown function
<u>YHR048W</u>	7.3	Member of major facilitator superfamily (MFS) multidrug-resistance (MFS-MDR) protein family
<u>WSC4</u>	7.1	Protein required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response
<u>YDR220C</u>	6.3	Protein of unknown function
<u>HMS2</u>	6.3	Transcription factor with a probable role in pseudohyphal growth
<u>YGL222C</u>	6.2	Protein of unknown function
<u>YAR066W</u>	6.1	Protein of unknown function
<u>YHL037C</u>	5.9	Protein of unknown function
<u>YHL006C</u>	5.9	Protein of unknown function
<u>ATF2</u>	5.9	Alcohol O-acetyltransferase
<u>YEL045C</u>	5.8	Protein of unknown function, has motifs typical of ATP/GTP binding sites
<u>YKR105C</u>	5.6	Member of major facilitator superfamily (MFS) multidrug-resistance (MFS-MDR) protein family
<u>ADK2</u>	5.6	Adenylate kinase (GTP
<u>YGL109W</u>	5.4	Protein of unknown function
<u>YGR243W</u>	5.3	Protein of unknown function
<u>PDC6</u>	5.3	Pyruvate decarboxylase isozyme 3
<u>YLR162W</u>	5.1	Protein of unknown function
<u>YBL053W</u>	5.1	Protein of unknown function
<u>YOR053W</u>	4.7	Protein with similarity to protamines
<u>YKL053W</u>	4.7	Protein of unknown function
<u>YGL182C</u>	4.7	Protein of unknown function
<u>YDR413C</u>	4.6	Protein of unknown function
<u>POT1</u>	4.6	3-Ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal (acetyl-CoA acyltransferase), catalyzes last step of peroxisomal fatty acid beta-oxidation
<u>MRF1</u>	4.2	Mitochondrial peptide chain release factor, directs termination of translation in response to termination codons UAA and UAG
<u>CWP1</u>	4.2	Mannoprotein of the cell wall; member of the PAU1 family
<u>YDR544C</u>	4.2	Protein of unknown function
<u>YDR215C</u>	4.1	Protein of unknown function
<u>YDR024W</u>	4.1	Protein of unknown function
<u>YAR061W</u>	4.1	Protein with similarity to N-terminus of Flo1p, probable pseudogene
<u>YLR118C</u>	4.0	Protein with similarity to esterases
<u>ZTA1</u>	3.9	Zeta-crystallin homolog, has similarity to E. coli quinone oxidoreductase and human zeta-crystallin which has quinone oxidoreductase activity
<u>YJL027C</u>	3.9	Protein of unknown function
<u>YCR062W</u>	3.9	Protein of unknown function
<u>DAL4</u>	3.9	Allantoin permease, member of the uracil/allantoin permease family of the major facilitator superfamily (MFS)
<u>YAT1</u>	3.8	Outer carnitine acetyltransferase, mitochondrial
<u>SCS7</u>	3.8	Ceramide hydroxylase that hydroxylates the C-26 fatty-acyl moiety of inositol-phosphorylceramide
<u>HAD1</u>	3.8	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase, involved in biosynthesis of nicotinic acid from tryptophan

<u>FCY22</u>	3.8	Purine-cytosine permease with similarity to Fcy2p, member of the purine/cytosine family of the major facilitator superfamily (MFS)
<u>YLR279W</u>	3.8	Protein of unknown function
<u>YKL069W</u>	3.8	Protein of unknown function
<u>YHR145C</u>	3.8	Protein of unknown function
<u>YGL072C</u>	3.8	Protein of unknown function
<u>YDR126W</u>	3.8	
<u>GAL2</u>	3.8	Galactose (and glucose) permease (facilitated diffusion transporter)
<u>RPL7B</u>	3.7	Ribosomal protein L7B; (Yeast L6) (YL8B) (rp11) (E. coli L30) (rat L7)
<u>YJL067W</u>	3.7	Protein of unknown function
<u>YGR066C</u>	3.7	Protein with similarity to Vid24p
<u>YPS5</u>	3.6	Yapsin 5, GPI-anchored aspartyl protease
<u>YLR073C</u>	3.6	Protein of unknown function
<u>YJR037W</u>	3.6	Protein of unknown function
<u>YHR214W</u>	3.6	Protein of unknown function
<u>YFL051C</u>	3.6	Protein with similarity to Flo1p family of proteins
<u>YPL280W</u>	3.5	Protein of unknown function
<u>YML089C</u>	3.5	Protein of unknown function
<u>YLR137W</u>	3.5	Protein of unknown function
<u>YJL045W</u>	3.5	Protein with similarity to succinate dehydrogenase flavoprotein
<u>YIL132C</u>	3.5	Protein of unknown function
<u>YER084W</u>	3.5	Protein of unknown function
<u>ECM4</u>	3.5	Protein possibly involved in cell wall structure or biosynthesis
<u>CEM1</u>	3.5	Beta-ketoacyl-ACP synthase, mitochondrial (3-oxoacyl-[Acyl-carrier-protein] synthase)
<u>YOR161C</u>	3.4	Protein of unknown function, member of the major facilitator superfamily (MFS)
<u>YKL120W</u>	3.4	Protein with similarity to members of the mitochondrial carrier (MCF) family
<u>YJR038C</u>	3.4	Protein of unknown function
<u>YHR022C</u>	3.4	Protein with weak similarity to N-terminal region of ras-related proteins
<u>YGR203W</u>	3.4	Protein of unknown function
<u>HXT11</u>	3.4	Low-affinity glucose permease
<u>DMC1</u>	3.4	Meiosis-specific recombination protein structurally related to <i>S. cerevisiae</i> Rad51p, Rad55p, Rad57p, and to <i>E. coli</i> RecA
<u>YBR028C</u>	3.3	Serine/threonine protein kinase with similarity to Ypk2p/Ykr2p and Ypk1p
<u>HSP12</u>	3.3	Heat shock protein of 12kDa, induced by heat, osmotic stress, oxidative stress and stationary phase
<u>YPR007C</u>	3.3	Protein of unknown function
<u>YNR014W</u>	3.3	Protein of unknown function
<u>YMR172CA</u>	3.3	
<u>YJL077C</u>	3.3	Protein of unknown function
<u>YCR105W</u>	3.3	Protein with similarity to bovine alcohol dehydrogenase
<u>IMP1</u>	3.3	Inner membrane protease of mitochondria, responsible for removal of signal peptides from some proteins of the intermembrane space
<u>ARGR1</u>	3.3	Component of the ARGR transcription regulatory complex
<u>YIL065C</u>	3.2	Protein of unknown function
<u>YGL159W</u>	3.2	Protein of unknown function
<u>YGL108C</u>	3.2	Protein of unknown function
<u>PAU3</u>	3.2	Stress-induced protein of the PAU1 family, although homology does not extend to the serine-rich region
<u>MAE1</u>	3.2	Mitochondrial malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating) (NADP+)
<u>YJL083W</u>	3.2	Protein with similarity to Irs4p
<u>YER106W</u>	3.2	Protein of unknown function

<u>YDR543C</u>	3.2	Protein with similarity to other subtelomerically-encoded proteins
<u>YDR282C</u>	3.2	Protein of unknown function
<u>YDR149C</u>	3.2	
<u>XBPI</u>	3.2	Stress-induced transcriptional repressor
<u>YFR018C</u>	3.1	Protein with similarity to human glutaminyl-peptide cyclotransferase
<u>YAL060W</u>	3.1	Protein with similarity to alcohol/sorbitol dehydrogenase, member of the zinc-containing alcohol dehydrogenase family
<u>ATRI</u>	3.1	Aminotriazole and 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) resistance protein, member of major facilitator superfamily (MFS) multidrug-resistance (MFS-MDR) protein family
<u>YPL102C</u>	3.1	Protein of unknown function
<u>YMR069W</u>	3.1	Protein of unknown function
<u>YKL183W</u>	3.1	Protein of unknown function
<u>YIL092W</u>	3.1	Protein of unknown function
<u>YGL199C</u>	3.1	Protein of unknown function
<u>YFR035C</u>	3.1	Protein of unknown function
<u>YDR222W</u>	3.1	Protein of unknown function
<u>YBR022W</u>	3.1	Protein of unknown function
<u>GPI2</u>	3.1	Protein involved in synthesis of N-acetylglucosaminyl phosphatidylinositol
<u>YMR195W</u>	3.0	Protein of unknown function
<u>SSU1</u>	3.0	Plasma membrane protein involved in sulfite tolerance
<u>ICL1</u>	3.0	Isocitrate lyase, peroxisomal, carries out part of the glyoxylate cycle, required for gluconeogenesis
<u>HO</u>	3.0	Homothallic switching endonuclease, initiates mating type interconversion by making a double-stranded break in the expressed MAT gene
<u>YNR068C</u>	3.0	Protein of unknown function
<u>YNR025C</u>	3.0	Protein of unknown function, questionable ORF
<u>YKR083C</u>	3.0	Protein with similarity to paramyosin
<u>YKR051W</u>	3.0	Protein of unknown function
<u>YEL057C</u>	3.0	Protein of unknown function
<u>PKH1</u>	3.0	Serine/threonine protein kinase, phosphorylates and activates Ypk1p
<u>NCE4</u>	2.9	Negative regulator of CTS1 expression
<u>LEU1</u>	2.9	3-Isopropylmalate dehydratase, second step in leucine biosynthesis pathway
<u>HXT1</u>	2.9	Low-affinity hexose transporter; member of sugar permease family and induced by glucose only at high concentration
<u>ZIP1</u>	2.9	Structural protein of the synaptonemal complex central element, has predicted coiled-coil domain
<u>YMR117C</u>	2.9	Protein of the spindle pole body
<u>YGL230C</u>	2.9	Protein of unknown function
<u>YBR027C</u>	2.9	Protein of unknown function
<u>YBL098W</u>	2.9	Kynurenine 3-hydroxylase involved in tryptophan degradation and nicotinic acid synthesis
<u>RRN7</u>	2.9	Component of rDNA transcription factor CF which is composed of Rrn6p, Rrn7p, and Rrn11p
<u>HXT12</u>	2.9	Protein with similarity to hexose transporters (YIL170W and YIL171W are both homologous to HXT genes and are separated by a frameshift)
<u>YOR179C</u>	2.8	Protein with similarity to Ysh1p
<u>YDR380W</u>	2.8	Protein with similarity to pyruvate decarboxylase, pyruvate oxidase, acetolactate synthase (large subunit), and other enzymes that require thiamine pyrophosphate
<u>TGL2</u>	2.8	Triglyceride lipase
<u>MSH5</u>	2.8	Meiosis-specific protein involved in reciprocal recombination, not involved in mismatch repair

<u>YOR084W</u>	2.8	Protein of unknown function
<u>YNL200C</u>	2.8	Protein of unknown function
<u>YNL013C</u>	2.8	Protein of unknown function, questionable ORF
<u>YLL062C</u>	2.8	Protein of unknown function
<u>YJR114W</u>	2.8	Protein of unknown function
<u>YIL168W</u>	2.8	
<u>YER121W</u>	2.8	Protein of unknown function
<u>YCR087W</u>	2.8	Protein of unknown function
<u>YBL029W</u>	2.8	Protein of unknown function, has a leucine zipper
<u>MEK1</u>	2.8	Serine/threonine protein kinase required for meiotic recombination
<u>MDG1</u>	2.8	G-protein involved in adaptation to pheromone response
<u>YRO2</u>	2.7	Protein with similarity to heat shock protein Hsp30p, has 7 potential transmembrane domains
<u>YPR063C</u>	2.7	Protein of unknown function
<u>YOR226C</u>	2.7	Protein with similarity to nitrogen fixation proteins
<u>YBL006C</u>	2.7	Protein of unknown function
<u>YPR153W</u>	2.7	Protein of unknown function
<u>YPL261C</u>	2.7	Protein of unknown function
<u>YOR268C</u>	2.7	Protein of unknown function
<u>YOR107W</u>	2.7	Protein with weak similarity to human G0/G1 switch regulatory protein 8
<u>YML058CA</u>	2.7	
<u>YDL241W</u>	2.7	Protein of unknown function
<u>YDL162C</u>	2.7	Protein of unknown function
<u>YDL096C</u>	2.7	Protein of unknown function
<u>YBR220C</u>	2.7	Protein with similarity to human acetyl coenzyme A transporter, E. coli ampG protein, and other transporter proteins
<u>YAR028W</u>	2.7	Protein with strong similarity to subtelomerically-encoded proteins such as Cos5p, Ybr302p, Cos3p, Cos1p, Cos4p, Cos8p, Cos6p, Cos9p, and Ycr007p
<u>SEN34</u>	2.7	tRNA splicing endonuclease, gamma subunit, has active site for 3' splice site cleavage
<u>HIF1</u>	2.7	Protein that interacts with histone acetyltransferase, Hat1p
<u>HEM4</u>	2.7	Uroporphyrinogen III synthase, fourth step in heme biosynthesis pathway
<u>YGL042C</u>	2.6	Protein with similarity to rat Na ⁺ /Ca ⁺⁺ exchanger NCX2 PIR
<u>YDR352W</u>	2.6	Protein of unknown function
<u>FCY21</u>	2.6	Protein with similarity to Fcy2p, member of the purine/cytosine family of the major facilitator superfamily (MFS)
<u>YHR035W</u>	2.6	Protein with weak similarity to Sec23p, expressed under nitrogen-starvation conditions
<u>YDR541C</u>	2.6	Protein with weak similarity to dihydroflavonol-4-reductases
<u>YKR074W</u>	2.5	Protein of unknown function
<u>YHM1</u>	2.5	Protein of the mitochondrial carrier (MCF) family that when overexpressed suppresses loss of Abf2p
<u>YGL174W</u>	2.5	Protein of unknown function
<u>PRY3</u>	2.5	Protein with similarity to plant pathogenesis-related proteins
<u>MSE1</u>	2.5	Glutamyl-tRNA synthetase, mitochondrial
<u>YOR391C</u>	2.5	Protein of unknown function
<u>YOR012W</u>	2.5	Protein of unknown function
<u>YLR283W</u>	2.5	Protein of unknown function
<u>YGR293C</u>	2.5	Protein of unknown function
<u>YER051W</u>	2.5	Protein of unknown function
<u>YBR190W</u>	2.5	Protein with weak similarity to glycosyl hydrolases
<u>SPS100</u>	2.5	Sporulation specific protein involved in spore wall formation, first appears at 12h of sporulation
<u>GDH3</u>	2.5	NADP-glutamate dehydrogenase 2, converts glutamate and NADP (+) to alpha-ketoglutarate, ammonia, and NADPH

<u>AMD2</u>	2.5	Protein with similarity to amidases
<u>YNL310C</u>	2.4	Protein of unknown function
<u>YMR148W</u>	2.4	Protein of unknown function
<u>YGL188C</u>	2.4	Protein of unknown function
<u>YBR177C</u>	2.4	Protein of unknown function
<u>GPD1</u>	2.4	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD ⁺) (cytoplasmic); involved in glycerol production converting glycerol-3-phosphate and NAD ⁺ to dihydroxyacetone phosphate and NADH
<u>YNL086W</u>	2.4	Protein of unknown function
<u>YML083C</u>	2.4	Protein of unknown function
<u>YFL044C</u>	2.4	Protein of unknown function
<u>YER028C</u>	2.4	Protein with similarity to Mig2p
<u>YDR020C</u>	2.4	Protein with weak similarity to uridine kinases and phosphoribulokinases
<u>YCL005W</u>	2.4	Protein of unknown function
<u>SAP4</u>	2.4	Sit4p-associated protein
<u>YLR008C</u>	2.3	Protein of unknown function
<u>VPS28</u>	2.3	Protein required for traffic to the vacuole through the endocytic and biosynthetic pathways
<u>SRB2</u>	2.3	Component of the RNA polymerase II holoenzyme and Kornberg's mediator (SRB) subcomplex
<u>ERV1</u>	2.3	Protein essential for mitochondrial biogenesis and cell viability
<u>YLL016W</u>	2.3	
<u>YKR060W</u>	2.3	Protein of unknown function
<u>YBR226C</u>	2.3	Protein of unknown function
<u>TFB4</u>	2.3	Component of RNA polymerase transcription initiation TFIIF (factor b), 37 kDa subunit
<u>REG2</u>	2.3	Possible regulatory subunit for the PP1 family protein phosphatase Glc7p
<u>GIC1</u>	2.3	Putative effector of Cdc42p, important for bud emergence
<u>CYC7</u>	2.3	Cytochrome-c isoform 2, predominant isoform during anaerobic growth
<u>YNL246W</u>	2.2	Protein with similarity to Drosophila melanogaster SET protein
<u>YFL027C</u>	2.2	Protein of unknown function
<u>YLR349W</u>	2.2	Protein of unknown function
<u>YDR491C</u>	2.2	Protein with similarity to Hrd312p
<u>HEM14</u>	2.2	Protoporphyrinogen oxidase
<u>CTP1</u>	2.2	Mitochondrial inner membrane citrate transport protein, related to uncoupling protein and other mitochondrial carrier family (MCF) proteins
<u>YIL121W</u>	2.1	Member of major facilitator superfamily (MFS) multidrug-resistance (MFS-MDR) protein family
<u>YHR097C</u>	2.1	Protein of unknown function
<u>YER073W</u>	2.1	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase
<u>YDR100W</u>	2.1	Protein of unknown function
<u>YBR180W</u>	2.1	Member of major facilitator superfamily (MFS) multidrug-resistance (MFS-MDR) protein family
<u>YAL032C</u>	2.1	Protein with similarity to Drosophila melanogaster puff-specific protein Bx42
<u>GAC1</u>	2.1	Regulatory subunit for protein serine/threonine phosphatase Glc7p
<u>PEX2</u>	2.0	Peroxisomal biogenesis protein (peroxin) required for peroxisomal import of some proteins

D. Liste der Gene, die im CDC73-Deletionsstamm im Vergleich zum WT-Stamm hochreguliert wurden

Gen	x-fach hochreguliert	Funktion nach YPD Title Line, copyright Proteome.Inc.
<u>YHL049C</u>	70.9	Protein with similarity to other subtelomerically-encoded proteins including Yer189p, Yml133p, and Yjl225p, coded from a subtelomeric Y' region
<u>YFL066C</u>	34.5	Protein with similarity to other subtelomerically-encoded proteins including Yil177p, Yhl050p, and Yer190p
<u>YBL111C</u>	27.1	
<u>YHR218W</u>	24.1	Protein with similarity to other subtelomerically-encoded proteins including Yhr219p and Yfl065p, probable pseudogene
<u>YFR026C</u>	12.6	Protein of unknown function
<u>URA3</u>	11.7	Orotidine-5'-phosphate decarboxylase
<u>YKL204W</u>	10.2	Protein of unknown function, probable purine nucleotide-binding protein
<u>YHR214WA</u>	9.9	Protein of unknown function
<u>LHS1</u>	8.8	Hsp70 superfamily member required for efficient translocation of protein precursors across the ER membrane
<u>YIL112W</u>	7.9	Protein with similarity to ankyrin and coiled-coil proteins
<u>YGR237C</u>	7.7	Protein of unknown function
<u>YMR046C</u>	7.6	
<u>YFL065C</u>	7.4	Protein with similarity to other subtelomerically-encoded proteins including Yhl049p, Yil177p, Yjl225p, Yer190p, Yhr218p, and Yel076p
<u>COX18</u>	6.1	Protein required for activity of mitochondrial cytochrome oxidase
<u>BRR2</u>	5.9	RNA helicase-related protein required for pre-mRNA splicing
<u>YMR304CA</u>	5.7	
<u>BET4</u>	5.7	Geranylgeranyltransferase Type II alpha subunit, complexes with Bet2p
<u>YGL045W</u>	5.6	Protein of unknown function
<u>YBR302C</u>	5.4	Protein with similarity to subtelomerically-encoded proteins such as Cos5p, Ybr302p, Cos3p, Cos1p, Cos4p, Cos8p, Cos6p, Cos9p
<u>YJR026W</u>	5.2	
<u>ZDS1</u>	5.1	Protein that regulates SWE1 and CLN2 transcription
<u>COS3</u>	5.1	Protein with strong similarity to subtelomerically-encoded proteins such as Cos5p, Ybr302p, Cos3p, Cos1p, Cos4p, Cos8p, Cos6p, Cos9p
<u>KRE11</u>	5.0	Potential regulatory protein involved in synthesis of cell wall beta-1,6-glucan
<u>FBP26</u>	5.0	6-Phosphofructo-2-kinase / fructose-2,6-bisphosphatase
<u>YBL101WB</u>	4.9	
<u>YMR040W</u>	4.9	Protein with similarity to Ykl065p
<u>LAS17</u>	4.9	Component of the cortical actin cytoskeleton
<u>YKL116C</u>	4.8	Serine/threonine protein kinase with similarity to S pombe nim1
<u>YIL117C</u>	4.8	Protein of unknown function
<u>ZAP1</u>	4.7	Zinc-responsive transcriptional activator of zinc uptake system genes
<u>YNR059W</u>	4.7	Protein with similarity to Mnn1p and Yil014p
<u>WHI3</u>	4.6	Protein involved in regulation of cell size, has 1 RNA recognition (RRM) domain
<u>YML040W</u>	4.5	
<u>YLR462W</u>	4.5	Protein of unknown function
<u>YER116C</u>	4.5	Protein of unknown function
<u>YBR225W</u>	4.5	Protein of unknown function
<u>YGL168W</u>	4.4	Protein of unknown function
<u>YMR051C</u>	4.3	

<u>YJR028W</u>	4.3	
<u>GLS2</u>	4.3	Component of beta-1,3-glucan synthase, probably functions as an alternate subunit with Gls1p with which it has strong similarity
<u>YER077C</u>	4.3	Protein with similarity to class I tRNA synthetases
<u>YDL037C</u>	4.3	Protein with similarity to glucan 1,4-alpha-glucosidase
<u>REF2</u>	4.3	Protein involved in mRNA 3'-end formation prior to polyadenylation, mutant has significantly lower usage of weak poly(A) sites
<u>MIP1</u>	4.3	Mitochondrial DNA-directed DNA polymerase
<u>YBR012WA</u>	4.2	
<u>YMR191W</u>	4.1	Protein of unknown function
<u>YLR024C</u>	4.1	Protein with similarity to ubiquitin-protein ligase (E3) Ubr1p
<u>SWI3</u>	4.1	Component of SWI/SNF global transcription activator complex, acts to assist gene-specific activators through chromatin remodeling
<u>JEM1</u>	4.1	DnaJ-like protein, required for nuclear fusion
<u>GYP7</u>	4.1	GTPase-activating protein for Ypt7p
<u>NTH1</u>	4.0	Neutral trehalase
<u>YPR154W</u>	4.0	Protein with similarity to several SH3 domain-containing proteins including myosin ID and IC heavy chains, human growth factor receptor-bound grb2 protein, <i>C. elegans</i> sex muscle abnormal protein 5
<u>YDR467C</u>	4.0	Protein of unknown function
<u>YDR141C</u>	4.0	Protein of unknown function, member of the major facilitator superfamily (MFS)
<u>KIN2</u>	4.0	Serine/threonine protein kinase, related to Kin1p and <i>S. pombe</i> KIN1
<u>YOR220W</u>	3.8	Protein of unknown function
<u>YAR010C</u>	3.8	Protein of unknown function
<u>DUR1.2</u>	3.8	Urea amidolyase, contains urea carboxylase and allophanate hydrolase activities
<u>YNL101W</u>	3.8	Protein with similarity to members of a putative transporter family that includes Ybr089p, Yer064p, Yer119p, Yil088p, Ykl146p, and Ynl101p
<u>YLR346C</u>	3.8	Protein of unknown function
<u>AAD6</u>	3.7	Probable aryl-alcohol reductase
<u>YDL050C</u>	3.7	Protein of Unknown Function
<u>HIR3</u>	3.7	Histone transcription regulator
<u>YDL025C</u>	3.6	Serine/threonine protein kinase with similarity to members of the NPR1 subfamily
<u>YER081W</u>	3.5	Putative phosphoglycerate dehydrogenase; involved in synthesis of serine from 3-phosphoglycerate
<u>PTP2</u>	3.5	Protein tyrosine phosphatase (PTPase) involved in Hog1p MAP kinase high-osmolarity sensing pathway and Fus3p MAP kinase pheromone response pathway
<u>MCD4</u>	3.5	Morphogenesis checkpoint protein
<u>AMS1</u>	3.5	Alpha-mannosidase, hydrolyzes terminal non-reducing alpha-D-mannose residues from alpha-D-mannosides
<u>YOL087C</u>	3.5	Protein of unknown function, has one WD (WD-40) domain
<u>YLR392C</u>	3.5	Protein of unknown function
<u>HCA4</u>	3.5	Probable RNA helicase CA4, involved in ribosomal RNA processing
<u>YHR209W</u>	3.4	Protein with similarity to Yer175p
<u>BUB2</u>	3.4	Checkpoint protein required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function
<u>YDR186C</u>	3.3	Protein of unknown function
<u>HXT2</u>	3.3	High-affinity hexose transporter; member of sugar permease family
<u>YLR145W</u>	3.3	Protein of unknown function
<u>HCS1</u>	3.3	DNA helicase A and Dom34p-interacting protein (47, 2652, 2655, 32404, 32405)
<u>FKH2</u>	3.3	Homolog of <i>Drosophila</i> forkhead protein
<u>YIL177C</u>	3.2	Protein with similarity to subtelomerically-encoded proteins including Yjl225p, Yfl068p, and Yhl093p
<u>ERO1</u>	3.2	Protein required for protein disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum

<u>YOL008W</u>	3.2	Protein of unknown function
<u>YJL200C</u>	3.2	Protein with similarity to aconitase, has potential mitochondrial transit peptide
<u>UME6</u>	3.2	Negative transcriptional regulator involved in nitrogen repression and induction of meiosis
<u>MET8</u>	3.2	Protein involved in the expression of PAPS reductase and sulfite reductase
<u>GND2</u>	3.2	6-Phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating, converts 6-phosphogluconate + NADP to ribulose-5-phosphate + NADPH + CO ₂
<u>DNA2</u>	3.2	Protein that have DNA helicase, ssDNA-dependent ATPase, and ATP-dependent endonuclease activities
<u>YNL339C</u>	3.1	Protein of unknown function
<u>YPL068C</u>	3.1	Protein of unknown function
<u>YMR291W</u>	3.1	Serine/threonine protein kinase of unknown function
<u>YKR049C</u>	3.1	Protein of unknown function
<u>YKL225W</u>	3.1	Protein of unknown function
<u>YIL056W</u>	3.1	Protein of unknown function
<u>YDR383C</u>	3.1	Protein of unknown function
<u>TWF1</u>	3.1	Twinfilin A, member of a family of proteins that sequester actin monomers
<u>TEL2</u>	3.1	Protein involved in controlling telomere length and telomere position effect
<u>SPT20</u>	3.1	Component of the nucleosomal histone acetyltransferase (Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase or SAGA) complex, member of TBP class of SPT proteins
<u>COS4</u>	3.1	Protein with strong similarity to subtelomerically-encoded proteins such as Cos5p, Ybr302p, Cos3p, Cos1p, Cos4p, Cos8p, Cos6p, Cos9p
<u>CDC39</u>	3.1	Nuclear protein that negatively affects basal transcription from many promoters
<u>ZRT1</u>	3.0	High-affinity zinc transport protein
<u>SSK2</u>	3.0	Map kinase kinase kinase (MAPKKK) of the high-osmolarity signal transduction pathway
<u>YLR184W</u>	3.0	Protein of unknown function
<u>YJL035C</u>	3.0	Protein of unknown function
<u>YER018C</u>	3.0	Protein of the spindle pole body
<u>VPS16</u>	3.0	Vacuolar sorting protein, mutant has pleiotropic defects in vacuolar morphology and vacuolar protein targeting
<u>SRB6</u>	3.0	Component of the RNA polymerase II holoenzyme and Kornberg's mediator (SRB) subcomplex
<u>PRP24</u>	3.0	Pre-mRNA splicing factor, responsible for reannealing U4 and U6 snRNAs to recycle snRNPs for subsequent splicing reactions, has 3 RNA recognition (RRM) domains
<u>ORC6</u>	3.0	Origin recognition complex (ORC), sixth subunit, binds domain A consensus sequence
<u>NHA1</u>	3.0	Putative Na ⁺ /H ⁺ antiporter
<u>MET4</u>	3.0	Transcriptional activator of the sulfur assimilation pathway, member of basic leucine zipper (bZIP) family
<u>YHR111W</u>	2.9	Protein with similarity to Uba1p and molybdopterin biosynthesis protein moeB
<u>YGR161C</u>	2.9	Protein of unknown function, has phosphopantetheine attachment site
<u>YGL179C</u>	2.9	Serine/threonine protein kinase with similarity to Elm1p and Kin82p
<u>YBL112C</u>	2.9	
<u>BNI4</u>	2.9	Protein that may be involved in linking chitin synthase III to septins of the neck filaments
<u>YJL036W</u>	2.9	Protein with similarity to Mvp1p
<u>YGL066W</u>	2.9	Protein with similarity to Dictyostelium discoideum G-box-binding factor
<u>SMP1</u>	2.9	Transcription factor of the MADS (Mcm1p, Agamous, Deficiens, SRF) box family

<u>PIB1</u>	2.9	Phosphatidylinositol(3)-phosphate binding protein, with similarity to Pep7p/Vac1p, Fab1p and human endosomal protein
<u>NRD1</u>	2.9	Protein that controls transcriptional elongation through interaction with the C-terminal domain of RNA polymerase II large subunit, has one RNA recognition (RRM) domain
<u>ECM25</u>	2.9	Protein possibly involved in cell wall structure or biosynthesis
<u>AZF1</u>	2.9	Probable zinc-finger transcription factor
<u>YPR204W</u>	2.8	Protein with similarity to other subtelomerically-encoded proteins
<u>YOR306C</u>	2.8	Protein with similarity to human X-linked PEST-containing transporter
<u>YOL031C</u>	2.8	Protein with weak similarity to Yarrowia lipolytica Sls1 protein precursor
<u>YLR194C</u>	2.8	Protein of unknown function
<u>YEL077C</u>	2.8	
<u>GFA1</u>	2.8	Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase, isomerizing (hexosephosphate aminotransferase), first step in chitin biosynthesis pathway
<u>CMK2</u>	2.8	Calcium/calmodulin-dependent serine/threonine protein kinase (CaM kinase) type II
<u>CAR1</u>	2.8	Arginase, present in a complex with ornithine carbamyltransferase; acts as a allosteric regulator
<u>YOR138C</u>	2.8	Protein of unknown function
<u>YIL024C</u>	2.8	Protein of unknown function
<u>YER187W</u>	2.8	Protein with similarity to killer toxin Khs1p
<u>STP2</u>	2.8	Protein involved in tRNA splicing and branched-chain amino acid uptake
<u>DUN1</u>	2.8	Protein kinase required for induction of Rnr3p and DNA repair genes after DNA damage
<u>YPL283C</u>	2.7	Protein with similarity to other subtelomerically-encoded protein
<u>YOR385W</u>	2.7	Protein of unknown function
<u>YOR052C</u>	2.7	Protein of unknown function
<u>YGR296W</u>	2.7	Protein with similarity to other subtelomerically-encoded proteins including Yer190p
<u>YGL164C</u>	2.7	Protein of unknown function
<u>YER190W</u>	2.7	Protein with similarity to other subtelomerically-encoded proteins including Yil177p
<u>YBL113C</u>	2.7	
<u>YNL164C</u>	2.7	Protein of unknown function
<u>YLR352W</u>	2.7	Protein of unknown function
<u>YLR345W</u>	2.7	Protein with similarity to rat fructose-2,6-bisphosphatase
<u>SKM1</u>	2.7	Serine/threonine protein kinase with similarity to Ste20p and Cla4p
<u>SIP3</u>	2.7	Protein that interacts with Snf1p, contains a PH (pleckstrin) domain
<u>RAD9</u>	2.7	DNA repair checkpoint protein required for cell cycle arrest following DNA damage
<u>DIG2</u>	2.7	MAP kinase-associated protein involved in negative regulation of invasive growth and mating response
<u>UBI4</u>	2.6	Ubiquitin, mature protein is cleaved from polyubiquitin (Ubi4p) or from fusions with ribosomal proteins
<u>SEC16</u>	2.6	Hydrophilic protein required for vesicle formation in ER to Golgi transport
<u>YKL222C</u>	2.6	Protein with similarity to transcription factors, has Zn[2]-Cys[6] fungal-type binuclear cluster domain in the N-terminal region
<u>YHR155W</u>	2.6	Protein with similarity to Sip3p
<u>UBP11</u>	2.6	Ubiquitin-specific protease
<u>IXR1</u>	2.6	Intrastrand crosslink recognition protein with 2 HMG boxes and transcription factor that confers oxygen (O ₂) regulation on COX5B
<u>YJL225C</u>	2.5	Protein with similarity to other subtelomerically-encoded proteins including Yil177p, Yhr219p, and Yhl079p
<u>YHL050C</u>	2.5	Protein with similarity to other subtelomerically-encoded proteins
<u>YGL131C</u>	2.5	Protein of unknown function

<u>HVG1</u>	2.5	Putative nucleotide sugar transporter, with similarity to vanadate resistance protein Gog5p
<u>HSP78</u>	2.5	Heat shock protein of ClpB family of ATP-dependent proteases, mitochondrial
<u>ESC2</u>	2.5	Protein involved in chromatin silencing
<u>CAK1</u>	2.5	Cdk-activating kinase (serine/threonine protein kinase) responsible for in vivo activation of Cdc28p, also involved in spore wall formation
<u>YMR184W</u>	2.4	Protein of unknown function
<u>YIL108W</u>	2.4	Protein of unknown function
<u>YHR219W</u>	2.4	Protein with similarity to other subtelomerically-encoded proteins
<u>TFA1</u>	2.4	RNA polymerase transcription initiation factor TFIIE (factor a), 66 kDa subunit
<u>PDR10</u>	2.4	Member of ATP-binding cassette (ABC) superfamily
<u>YOR252W</u>	2.4	Protein of unknown function
<u>YLR087C</u>	2.4	Protein of unknown function
<u>YBL083C</u>	2.4	Protein of unknown function
<u>TUB4</u>	2.4	Gamma tubulin, required for microtubule organization and nuclear division
<u>STE3</u>	2.4	Pheromone a-factor receptor, seven-transmembrane domain protein
<u>SGT1</u>	2.4	Protein involved in suppression of skp1 mutation
<u>PUT1</u>	2.4	Proline oxidase, first step in synthesis of glutamate from proline
<u>BUL1</u>	2.4	Protein involved in the ubiquitination pathway
<u>YLL066C</u>	2.3	Protein with similarity to other subtelomerically-encoded proteins including Yhl050p, Yil177p, and Yhr219p
<u>YJL171C</u>	2.3	Protein of unknown function
<u>YKR012C</u>	2.3	Protein of unknown function
<u>YGL219C</u>	2.3	Protein with similarity to Mycoplasma genitalium threoninyl-tRNA synthetase
<u>YAL034C</u>	2.3	Protein of unknown function
<u>RIM15</u>	2.3	Serine/threonine protein kinase, positive regulator of IME2 expression and of sporulation
<u>RAD26</u>	2.3	Putative helicase homologous to Cockayne syndrome B gene ERCC-6, involved in transcription-coupled repair
<u>PEP12</u>	2.3	Syntaxin homolog (t-SNARE) involved in Golgi to vacuole transport
<u>MEC3</u>	2.3	Checkpoint protein required for arrest in G2 after DNA damage and for delaying in G1- and S-phase during DNA damage
<u>FAP1</u>	2.3	Protein with similarity to human DNA-binding protein tenascin and Drosophila melanogaster shuttle craft protein
<u>PBI2</u>	2.2	Protease B (yscB or Prb1p) inhibitor 2 (I2B), has activity related to vacuolar fusion that is not related to protease activity
<u>MSB2</u>	2.2	Protein for which overproduction suppresses bud emergence defect of cdc24 mutant
<u>YNL217W</u>	2.2	Protein of unknown function
<u>MNN4</u>	2.2	Protein required for transfer of mannosylphosphate to core and outer chain portions of N-linked oligosaccharides
<u>MAK10</u>	2.2	Glucose-repressible protein required for replication of double-stranded RNA (dsRNA) virus
<u>CCH1</u>	2.2	Putative calcium channel
<u>YLR467W</u>	2.1	Protein with similarity to other subtelomerically-encoded proteins including Yer189p, Yml133p, and Yjl225p
<u>YLR466W</u>	2.1	Protein with similarity to other subtelomerically-coded proteins
<u>YGR145W</u>	2.1	Protein with similarity to MESA gene of Plasmodium falciparum
<u>YGL140C</u>	2.1	Protein of unknown function, member of the major facilitator superfamily (MFS)
<u>VPS3</u>	2.1	Vacuolar sorting protein, also involved in vacuolar segregation
<u>MEC1</u>	2.1	Checkpoint protein required for mitotic growth, DNA repair and mitotic recombination;
<u>YOR165W</u>	2.0	Protein with similarity in the C-terminal region to human GBP1, an interferon-induced GTP-binding protein

E. Liste der Gene, die im NHP6A/B- und im CDC73-Deletionsstamm im Vergleich zum WT-Stamm herunterreguliert wurden

Gen	CDC73 (198)	NHP6 (279)	Funktion nach YPD Title Line, copyright Proteome.Inc.
<u>ADK2</u>	-5.6	-2.7	Adenylate kinase (GTP
<u>ATR1</u>	-3.1	-3.9	Aminotriazole and 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) resistance protein, member of major facilitator superfamily (MFS) multidrug-resistance (MFS-MDR) protein family
<u>CWP1</u>	-4.2	-2.3	Mannoprotein of the cell wall; member of the PAU1 family
<u>DAL4</u>	-3.9	-3.8	Allantoin permease, member of the uracil/allantoin permease family of the major facilitator superfamily (MFS)
<u>DMC1</u>	-3.4	-4.1	Meiosis-specific recombination protein structurally related to <i>S. cerevisiae</i> Rad51p, Rad55p, Rad57p, and to <i>E. coli</i> RecA
<u>ECM4</u>	-3.5	-3.5	Protein possibly involved in cell wall structure or biosynthesis
<u>ERV1</u>	-2.3	-2.3	Protein essential for mitochondrial biogenesis and cell viability
<u>GAL2</u>	-3.8	-4.8	Galactose (and glucose) permease (facilitated diffusion transporter)
<u>GDH3</u>	-2.5	-5.3	NADP-glutamate dehydrogenase 2, converts glutamate and NADP (+) to alpha-ketoglutarate, ammonia, and NADPH
<u>GPD1</u>	-2.4	-3.1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (cytoplasmic); involved in glycerol production converting glycerol-3-phosphate and NAD+ to dihydroxyacetone phosphate and NADH
<u>HO</u>	-3.0	-11.8	Homothallic switching endonuclease, initiates mating type interconversion by making a double-stranded break in the expressed MAT gene
<u>HXT11</u>	-3.4	-3.4	Low-affinity glucose permease
<u>HXT12</u>	-2.9	-3.2	Protein with similarity to hexose transporters (YIL170W and YIL171W are both homologous to HXT genes and are separated by a frameshift)
<u>MDG1</u>	-2.8	-2.5	G-protein involved in adaptation to pheromone response
<u>MSH5</u>	-2.8	-3.3	Meiosis-specific protein involved in reciprocal recombination, not involved in mismatch repair
<u>PAU3</u>	-3.2	-3.5	Stress-induced protein of the PAU1 family, although homology does not extend to the serine-rich region
<u>POT1</u>	-4.6	-6.1	3-Ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal (acetyl-CoA acyltransferase), catalyzes last step of peroxisomal fatty acid beta-oxidation
<u>RPL7B</u>	-3.7	-10.9	Ribosomal protein L7B; (Yeast L6) (YL8B) (rp11) (<i>E. coli</i> L30) (rat L7)
<u>SAP4</u>	-2.4	-3.8	Sit4p-associated protein
<u>SSU1</u>	-3.0	-2.4	Plasma membrane protein involved in sulfite tolerance
<u>VPS28</u>	-2.3	-3.0	Protein required for traffic to the vacuole through the endocytic and biosynthetic pathways
<u>WSC4</u>	-7.1	-6.9	Protein required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response
<u>YAR061W</u>	-4.1	-4.1	Protein with similarity to N-terminus of Flo1p, probable pseudogene
<u>YAR066W</u>	-6.1	-8.6	Protein of unknown function
<u>YAT1</u>	-3.8	-4.4	Outer carnitine acetyltransferase, mitochondrial
<u>YBL053W</u>	-5.1	-6.0	Protein of unknown function
<u>YBL098W</u>	-2.9	-2.4	Kynurenine 3-hydroxylase involved in tryptophan degradation and nicotinic acid synthesis
<u>YBR022W</u>	-3.1	-2.8	Protein of unknown function
<u>YBR180W</u>	-2.1	-3.6	Member of major facilitator superfamily (MFS) multidrug-resistance (MFS-MDR) protein family

<u>YBR226C</u>	-2.3	-3.1	Protein of unknown function
<u>YCR087W</u>	-2.8	-3.7	Protein of unknown function
<u>YCR105W</u>	-3.3	-3.2	Protein with similarity to bovine alcohol dehydrogenase
<u>YDL096C</u>	-2.7	-3.9	Protein of unknown function
<u>YDL162C</u>	-2.7	-2.7	Protein of unknown function
<u>YDR024W</u>	-4.1	-5.5	Protein of unknown function
<u>YDR126W</u>	-3.8	-2.8	
<u>YDR149C</u>	-3.2	-6.3	
<u>YDR215C</u>	-4.1	-4.1	Protein of unknown function
<u>YDR220C</u>	-6.3	-4.7	Protein of unknown function
<u>YDR380W</u>	-2.8	-2.2	Protein with similarity to pyruvate decarboxylase, pyruvate oxidase, acetolactate synthase (large subunit), and other enzymes that require thiamine pyrophosphate
<u>YDR413C</u>	-4.6	-3.7	Protein of unknown function
<u>YDR541C</u>	-2.6	-3.3	Protein with weak similarity to dihydroflavonol-4-reductases
<u>YDR543C</u>	-3.2	-4.8	Protein with similarity to other subtelomerically-encoded proteins
<u>YDR544C</u>	-4.2	-4.2	Protein of unknown function
<u>YEL045C</u>	-5.8	-7.1	Protein of unknown function, has motifs typical of ATP/GTP binding sites
<u>YER084W</u>	-3.5	-3.7	Protein of unknown function
<u>YER106W</u>	-3.2	-3.3	Protein of unknown function
<u>YER121W</u>	-2.8	-8.4	Protein of unknown function
<u>YFL051C</u>	-3.6	-4.5	Protein with similarity to Flo1p family of proteins
<u>YFR035C</u>	-3.1	-2.7	Protein of unknown function
<u>YGL109W</u>	-5.4	-3.1	Protein of unknown function
<u>YGL182C</u>	-4.7	-4.4	Protein of unknown function
<u>YGL199C</u>	-3.1	-3.2	Protein of unknown function
<u>YGL222C</u>	-6.2	-7.0	Protein of unknown function
<u>YGL230C</u>	-2.9	-3.1	Protein of unknown function
<u>YGR066C</u>	-3.7	-4.5	Protein with similarity to Vid24p
<u>YGR243W</u>	-5.3	-3.9	Protein of unknown function
<u>YGR293C</u>	-2.5	-2.8	Protein of unknown function
<u>YHL006C</u>	-5.9	-2.4	Protein of unknown function
<u>YHL037C</u>	-5.9	-5.9	Protein of unknown function
<u>YHR097C</u>	-2.1	-2.5	Protein of unknown function
<u>YHR145C</u>	-3.8	-2.5	Protein of unknown function
<u>YIL032C</u>	-9.2	-9.2	Protein of unknown function
<u>YIL132C</u>	-3.5	-3.3	Protein of unknown function
<u>YIL168W</u>	-2.8	-2.7	
<u>YJL027C</u>	-3.9	-3.4	Protein of unknown function
<u>YJL045W</u>	-3.5	-3.2	Protein with similarity to succinate dehydrogenase flavoprotein
<u>YJL077C</u>	-3.3	-3.3	Protein of unknown function
<u>YJR037W</u>	-3.6	-3.3	Protein of unknown function
<u>YJR038C</u>	-3.4	-3.3	Protein of unknown function
<u>YJR114W</u>	-2.8	-2.5	Protein of unknown function
<u>YKR105C</u>	-5.6	-4.6	Member of major facilitator superfamily (MFS) multidrug-resistance (MFS-MDR) protein family
<u>YLL016W</u>	-2.3	-2.2	
<u>YLR162W</u>	-5.1	-5.1	Protein of unknown function
<u>YLR279W</u>	-3.8	-4.1	Protein of unknown function
<u>YLR349W</u>	-2.2	-3.7	Protein of unknown function
<u>YML058CA</u>	-2.7	-2.7	
<u>YML083C</u>	-2.4	-3.3	Protein of unknown function
<u>YML089C</u>	-3.5	-3.2	Protein of unknown function
<u>YMR117C</u>	-2.9	-2.9	Protein of the spindle pole body
<u>YMR172CA</u>	-3.3	-5.5	
<u>YMR195W</u>	-3.0	-2.1	Protein of unknown function
<u>YNL013C</u>	-2.8	-3.3	Protein of unknown function, questionable ORF

<u>YNR014W</u>	-3.3	-3.5	Protein of unknown function
<u>YOR053W</u>	-4.7	-3.0	Protein with similarity to protamines
<u>YOR391C</u>	-2.5	-2.7	Protein of unknown function
<u>YPL102C</u>	-3.1	-3.0	Protein of unknown function
<u>YPL280W</u>	-3.5	-3.2	Protein of unknown function
<u>YPR007C</u>	-3.3	-2.8	Protein of unknown function
<u>YPS5</u>	-3.6	-3.6	Yapsin 5, GPI-anchored aspartyl protease
<u>YRO2</u>	-2.7	-3.2	Protein with similarity to heat shock protein Hsp30p, has 7 potential transmembrane domains
<u>ZIP1</u>	-2.9	-2.5	Structural protein of the synaptonemal complex central element, has predicted coiled-coil domain
<u>ZTA1</u>	-3.9	-3.5	Zeta-crystallin homolog, has similarity to E. coli quinone oxidoreductase and human zeta-crystallin which has quinone oxidoreductase activity

F. Liste der Gene, die im NHP6A/B- und im CDC73-Deletionsstamm im Vergleich zum WT-Stamm hochreguliert wurden

Gen	CDC73 (208)	NHP6 (206)	Funktion nach YPD Title Line, copyright Proteome.Inc.
<u>AZF1</u>	2.9	3.2	Probable zinc-finger transcription factor
<u>BET4</u>	5.7	5.5	Geranylgeranyltransferase Type II alpha subunit, complexes with Bet2p
<u>BNI4</u>	2.9	2.6	Protein that may be involved in linking chitin synthase III to septins of the neck filaments
<u>BRR2</u>	5.9	8.2	RNA helicase-related protein required for pre-mRNA splicing
<u>BUB2</u>	3.4	3.1	Checkpoint protein required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function
<u>BUL1</u>	2.4	3.0	Protein involved in the ubiquitination pathway
<u>CDC39</u>	3.1	4.9	Nuclear protein that negatively affects basal transcription from many promoters
<u>DNA2</u>	3.2	4.3	Protein that have DNA helicase, ssDNA-dependent ATPase, and ATP-dependent endonuclease activities
<u>ESC2</u>	2.5	4.2	Protein involved in chromatin silencing
<u>FBP26</u>	5.0	5.5	6-Phosphofructo-2-kinase / fructose-2,6-bisphosphatase
<u>FKH2</u>	3.3	3.3	Homolog of Drosophila forkhead protein
<u>GND2</u>	3.2	2.6	6-Phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating, converts 6-phosphogluconate + NADP to ribulose-5-phosphate + NADPH + CO ₂
<u>GYP7</u>	4.1	2.6	GTPase-activating protein for Ypt7p
<u>HCA4</u>	3.5	3.7	Probable RNA helicase CA4, involved in ribosomal RNA processing
<u>HCS1</u>	3.3	3.1	DNA helicase A and Dom34p-interacting protein (47, 2652, 2655, 32404, 32405)
<u>IXR1</u>	2.6	2.3	Intrastrand crosslink recognition protein with 2 HMG boxes and transcription factor that confers oxygen (O ₂) regulation on COX5B
<u>KIN2</u>	4.0	5.3	Serine/threonine protein kinase, related to Kin1p and S. pombe KIN1
<u>KRE11</u>	5.0	4.9	Potential regulatory protein involved in synthesis of cell wall beta-1,6-glucan
<u>LHS1</u>	8.8	3.1	Hsp70 superfamily member required for efficient translocation of protein precursors across the ER membrane
<u>MAK10</u>	2.2	2.4	Glucose-repressible protein required for replication of double-stranded RNA (dsRNA) virus
<u>MET4</u>	3.0	2.5	Transcriptional activator of the sulfur assimilation pathway, member of basic leucine zipper (bZIP) family
<u>MIP1</u>	4.3	3.2	Mitochondrial DNA-directed DNA polymerase
<u>PRP24</u>	3.0	2.2	Pre-mRNA splicing factor, responsible for reannealing U4 and U6 snRNAs to recycle snRNPs for subsequent splicing reactions, has 3 RNA recognition (RRM) domains
<u>RAD26</u>	2.3	2.5	Putative helicase homologous to Cockayne syndrome B gene ERCC-6, involved in transcription-coupled repair
<u>REF2</u>	4.3	2.5	Protein involved in mRNA 3'-end formation prior to polyadenylation, mutant has significantly lower usage of weak poly(A) sites
<u>SIP3</u>	2.7	2.5	Protein that interacts with Snf1p, contains a PH (pleckstrin) domain
<u>SRB6</u>	3.0	3.0	Component of the RNA polymerase II holoenzyme and Kornberg's mediator (SRB) subcomplex
<u>SSK2</u>	3.0	3.1	Map kinase kinase kinase (MAPKKK) of the high-osmolarity signal transduction pathway
<u>SWI3</u>	4.1	3.9	Component of SWI/SNF global transcription activator complex, acts to assist gene-specific activators through chromatin remodeling
<u>TEL2</u>	3.1	4.9	Protein involved in controlling telomere length and telomere position effect
<u>TUB4</u>	2.4	4.2	Gamma tubulin, required for microtubule organization and nuclear division

<u>UME6</u>	3.2	4.8	Negative transcriptional regulator involved in nitrogen repression and induction of meiosis
<u>WHI3</u>	4.6	5.6	Protein involved in regulation of cell size, has 1 RNA recognition (RRM) domain
<u>YBL101WB</u>	4.9	3.7	
<u>YBR225W</u>	4.5	4.1	Protein of unknown function
<u>YDR141C</u>	4.0	3.8	Protein of unknown function, member of the major facilitator superfamily (MFS)
<u>YDR186C</u>	3.3	4.0	Protein of unknown function
<u>YDR383C</u>	3.1	3.5	Protein of unknown function
<u>YDR467C</u>	4.0	4.2	Protein of unknown function
<u>YER018C</u>	3.0	5.5	Protein of the spindle pole body
<u>YER077C</u>	4.3	3.4	Protein with similarity to class I tRNA synthetases
<u>YGL045W</u>	5.6	3.5	Protein of unknown function
<u>YGL066W</u>	2.9	5.8	Protein with similarity to Dictyostelium discoideum G-box-binding factor
<u>YGR145W</u>	2.1	2.9	Protein with similarity to MESA gene of Plasmodium falciparum
<u>YGR237C</u>	7.7	3.6	Protein of unknown function
<u>YHL049C</u>	70.9	23.5	Protein with similarity to other subtelomerically-encoded proteins including Yer189p, Yml133p, and Yjl225p, coded from a subtelomeric Y' region
<u>YHR155W</u>	2.6	3.1	Protein with similarity to Sip3p
<u>YHR209W</u>	3.4	2.8	Protein with similarity to Yer175p
<u>YHR214WA</u>	9.9	15.8	Protein of unknown function
<u>YIL024C</u>	2.8	3.0	Protein of unknown function
<u>YIL056W</u>	3.1	4.5	Protein of unknown function
<u>YIL112W</u>	7.9	4.5	Protein with similarity to ankyrin and coiled-coil proteins
<u>YIL117C</u>	4.8	3.7	Protein of unknown function
<u>YJL035C</u>	3.0	5.0	Protein of unknown function
<u>YJL200C</u>	3.2	4.2	Protein with similarity to aconitase, has potential mitochondrial transit peptide
<u>YKL116C</u>	4.8	5.2	Serine/threonine protein kinase with similarity to S pombe nim1
<u>YKL204W</u>	10.2	8.5	Protein of unknown function, probable purine nucleotide-binding protein
<u>YLR087C</u>	2.4	2.8	Protein of unknown function
<u>YLR184W</u>	3.0	3.0	Protein of unknown function
<u>YLR392C</u>	3.5	3.1	Protein of unknown function
<u>YMR304CA</u>	5.7	4.6	
<u>YNL101W</u>	3.8	3.8	Protein with similarity to members of a putative transporter family that includes Ybr089p, Yer064p, Yer119p, Yil088p, Ykl146p, and Ynl101p
<u>YNL164C</u>	2.7	2.5	Protein of unknown function
<u>YNR059W</u>	4.7	4.7	Protein with similarity to Mnn1p and Yil014p
<u>ZAP1</u>	4.7	2.7	Zinc-responsive transcriptional activator of zinc uptake system genes
<u>ZDS1</u>	5.1	5.6	Protein that regulates SWE1 and CLN2 transcription

G. Liste der Funktionen des Excel-Arbeitsblattes, das für die Auswertung der Roh-Daten nach der Hybridisierung benutzt wurde

Spalte	Funktion	Erklärung
A	Gen-Name	
B	Funktion (Proteome)	
C	Signal WT A	
D	Präsenz des Gens auf Chip WTA	
E	Signal MT A	
F	Präsenz des Gens auf Chip MT A	
G	Signal WT B	
H	Präsenz des Gens auf Chip WT B	
I	Signal MT B	
J	Präsenz des Gens auf Chip MT B	
K	keine Funktion	
L	= (C-E)	Diff.1=WT A-MT A
M	= (G-I)	Diff.2= WT B-MT B
N	=AND (ABS(L)>10;ABS(M)>10)	Sind beide Differenzen größer als 10?
O	=AND(L<0;M<0)	Ist das Signal der MT für beide Experimente größer als das Signal des WTs?
P	=AND (L>0;M>0)	Ist das Signal der MT für beide kleiner als das Signal des WTs?
Q	=OR(O;P)	Ist entweder O oder P wahr?
R	=AND (D=1;F=1;H=1;J=1)	Ist das Gen auf allen vier Chips präsent?
S	= (C ≤ 0; E ≤ 0)	Ist das Signal für WT A oder MT A ≤ 0?
T	= (G ≤ 0; I ≤ 0)	Ist das Signal für WT B oder MT B ≤ 0?
U	= (L ≤ 0)	Ist die Differenz von WT A - MT A ≤ 0?
V	= (M ≤ 0)	Ist die Differenz von WT B - MT B ≤ 0?
W	=IF(S; IF(U;5;C+5-E);C)	Wenn WT A oder MT A ≤ 0 ist und WT A - MT A ≤ 0, dann ist der Wert 5. Wenn WT A - MT A nicht ≤ 0 ist, dann werden zum Signal von WT A 5 addiert und das Signal von MT A subtrahiert. Wenn WT A und MT A ≥ 0 sind, dann gilt der Wert des Signals von WT A.

X	=IF(S; IF(U;E+5-C;5)E)	Wenn WT A oder MT A ≤ 0 ist und WT A- MT A ≤ 0 , dann ist der Wert 5. Wenn WT A- MT A nicht ≤ 0 ist, dann werden zum Signal von WT A 5 addiert und das Signal von MT A subtrahiert. Wenn WT A und MT A ≥ 0 sind, dann gilt der Wert des Signals von MT A.
Y	=IF(T;IF(V;5;G+5-I)G)	Wenn WT B oder MT B ≤ 0 ist und WT B- MT B ≤ 0 , dann ist der Wert 5. Wenn WT B- MT B nicht ≤ 0 ist, dann werden zum Signal von WT B 5 addiert und das Signal von MT B subtrahiert. Wenn WT B und MT B ≥ 0 sind, dann gilt der Wert des Signals von WT B.
Z	=IF(T;IF(V;I+5-G;5);I)	Wenn WT B oder MT B ≤ 0 ist und WT B- MT B ≤ 0 , dann ist der Wert 5. Wenn WT B- MT B nicht ≤ 0 ist, dann werden zum Signal von WT B 5 addiert und das Signal von MT B subtrahiert. Wenn WT B und MT B ≥ 0 sind, dann gilt der Wert des Signals von MT B.
AA	=OR(S;T)	Ist eins der Signale ≤ 0 ?
AB	=OR(R;Q)	Ist das Gen entweder auf allen vier Chips präsent oder stimmen beide Experimente überein?
AC	=(X/W)	Verhältnis der korrigierten Werte für WT A und MT A.
AD	=(Z/Y)	Verhältnis der korrigierten Werte für WT B und MT B.
AE	=AND(AC>2; AD>2)	Ist das Verhältnis von WT zu MT in beiden Experimenten >2 ?
AF	=AND(AC<2;AD<2)	Ist das Verhältnis von WT zu MT in beiden Experimenten <2 ?
AG	=(AC+AD)/2	Was ist der Mittelwert der Verhältnisse?
AH	=IF(AB;IF(AG<1;-1/AG;AG),"#N/A")	Wenn das Gen in allen vier Experimenten präsent ist, und der Mittelwert der Verhältnisse von WT und MT kleiner als 1 ist, dann wird das Ergebnis nicht gewertet.
AI	keine Funktion	
AJ	=AND(AB;N;O;AE)	Das Gen ist entweder auf allen vier Chips präsent oder beide Experimente stimmen überein. Beide Differenzen sind größer, als 10. Für beide Experimente ist das Signal für den WT kleiner, als für die MT und das Verhältnis der korrigierten Werte ist in beiden Experimenten >2 .

AK	=AND(AJ;AA=FALSE)	Wenn AJ zutrifft, gleichzeitig aber eins der Signale ≤ 0 ist, so handelt es sich um ein falsches Ergebnis.
AL	=AND(AJ;R)	Das Gen ist auf allen vier Chips präsent und AJ trifft zu.
AM	=AND(AB;N;P;AF)	Das Gen ist entweder auf allen vier Chips präsent oder beide Experimente stimmen überein. Beide Differenzen sind größer, als 10. Für beide Experimente ist das Signal für den WT größer, als für die MT und das Verhältnis der korrigierten Werte ist in beiden Experimenten < 2 .
AN	=AND(AM;AA)=FALSE	Wenn AM zutrifft, gleichzeitig aber eins der Signale ≤ 0 ist, so handelt es sich um ein falsches Ergebnis.
AO	=AND(AM,R)	Das Gen ist auf allen vier Chips präsent und AM trifft zu.
AP	keine Funktion	
AQ	Gennamen	
AR	=AND(D=1;H=1)	Das Gen ist auf beiden WT-Chips präsent.
AS	=AND(AR;AM)	Das Gen ist auf beiden WT-Chips präsent und AM trifft zu.
AT	Gennamen	

H. Sequenzen der verwendeten Primer

Primer zur Amplifizierung der Basen 0 bis –200 des Promotors des HO-Gens:

HO200-5': TTC CGC GAC TTT ATT CGA AG

HO200-3': GCG AAA ATT CAT GTC ATG TCC

Primer zur Amplifizierung der Basen 0 bis –400 des Promotors des MFA1-Gens:

MFA1400-5': CTA ATT ATG CGT ACG AAA GG

MFA1400-3': CAG ATC CCT CTC ATT AAT TC

Primer zur Amplifizierung der Basen 0 bis –200 des Promotors des MFA1-Gens (MFA1-PF1):

MFA1200-5': GAG TGT GTA ATT ACC CAA AAA GGA

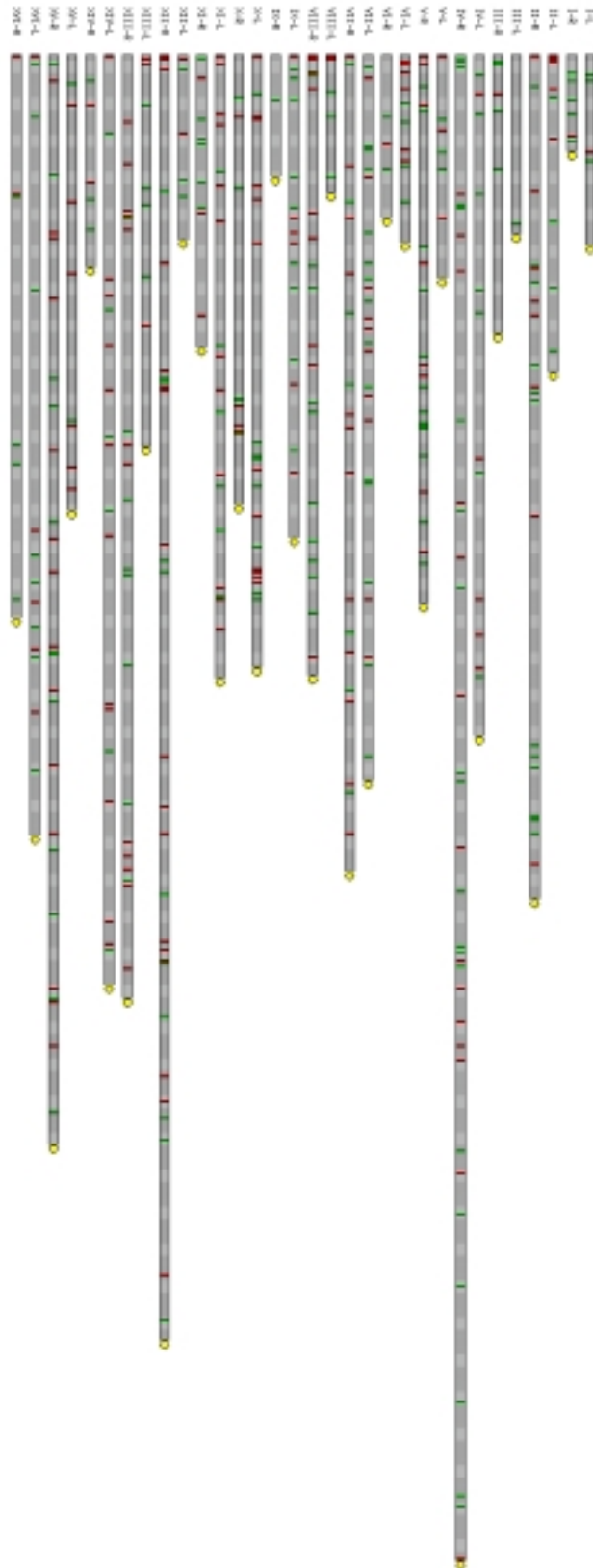
MFA1400-3': CAG ATC CCT CTC ATT AAT TC

Primer zur Amplifizierung der Basen –200 bis –400 des Promotors des MFA1-Gens (MFA1-PF2):

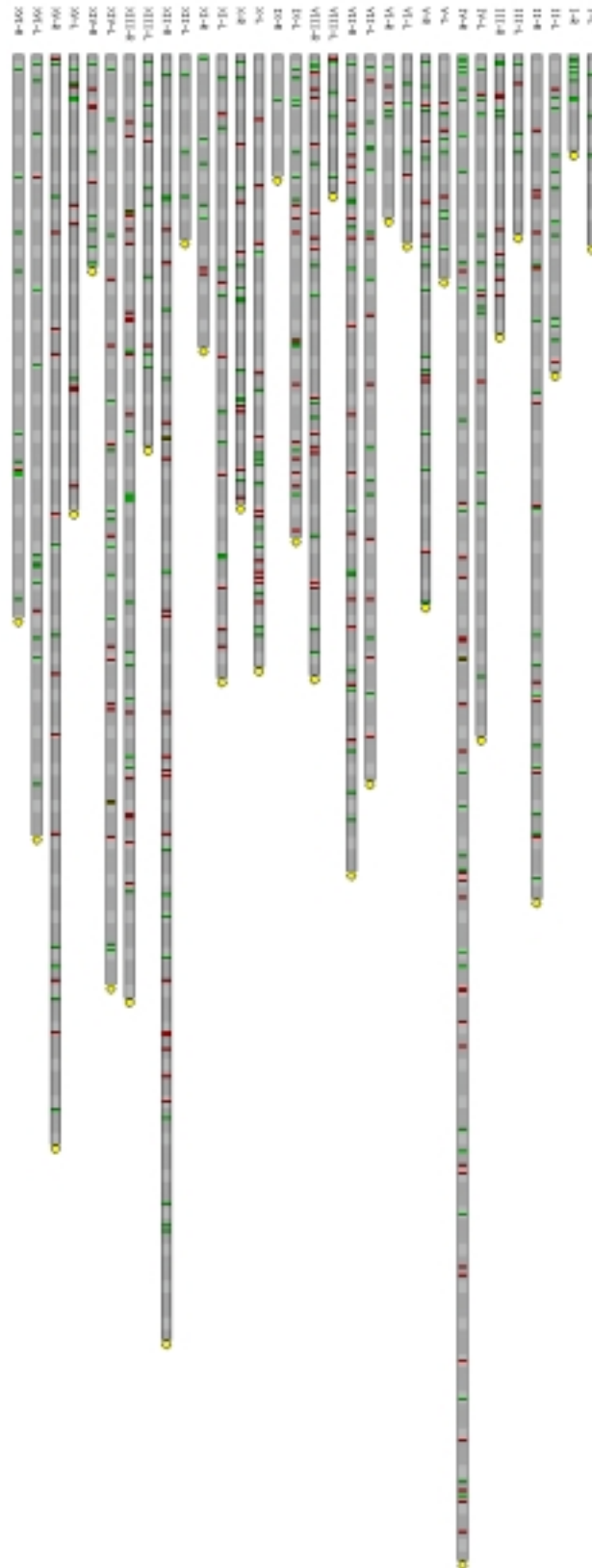
MFA1400-5': CTA ATT ATG CGT ACG AAA GG

MFA1200-3': CAC ACT CGT TTG TAA CAA GAA CAA AG

I. Lokalisation der durch Cdc73 regulierten Gene auf den Chromosomen



J. Lokalisation der durch Nhp6A/B regulierten Gene auf den Chromosomen



K. Liste der Aminosäuren und ihre Abkürzungen

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Abstract:

In this work a genomewide expressionanalysis has been carried out for strains harbouring a deletion for NHP6A/B or a deletion for CDC73.

The expression-analysis revealed, that under the chosen conditions, Nhp6A/B is involved in the regulation of approximately 10% of the genome of *S.cerevisiae*. However it is possible that the amount of genes regulated by Nhp6A/B would be different, if other conditions would be used. Nhp6A/B is necessary for the basal-transcription of the acid phosphatases and the a-specific genes MFA1 and BAR1, as well as of the haploidspecific gene HO. The direct binding of Nhp6B to the promoter of MFA1 and HO was shown *in vitro* by an electromobility-shift-assay (EMSA). The experiment revealed that Nhp6B binds different DNA-fragments with different affinities. It was also possible to show the binding of Nhp6B to the HO-promoter *in vivo* by a chromatin-immunoprecipitation. The results of the genomewide expressionanalysis of a strain deleted for NHP6A/B are very similar to the results of a genomewide expressionanalysis of strains carrying a deletion for SWI1 or SNF2, indicating a functional link between Nhp6 and the Swi/Snf-complex.

The genomewide expressionanalysis of a CDC73-deleted strain revealed that Cdc73 is involved in the regulation of approximately 8% of the *S.cerevisiae*- genome. A localization of the genes regulated by Cdc73 indicated that Cdc73 is involved in telomeric silencing. Cdc73 might be part of a new repressor-complex which is different from the complex containing the Sir-proteins.

The regulation of a group of genes in the genome of *S.cerevisiae* is dependent on both, Nhp6A/B and Cdc73, indicating a functional link between those proteins. Nhp6A/B and Cdc73 might be part of a group of proteins which are involved in transcriptional regulation by a combination with different transcriptional regulators, giving them their specificity.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit- einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen- die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen- noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist im Labor von Dr. Norbert Lehming und Prof. Dr. Richard Young unter der Betreuung von Prof. Dr. Benno Müller-Hill durchgeführt worden.

Köln, den 27.7.2000

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Dr. Norbert Lehming für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit und seine Unterstützung bedanken. Insbesondere denke ich dabei an die Förderung meines Aufenthaltes am Whitehead Institute of Biomedical Research, der wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Herrn Prof. Dr. Benno Müller-Hill und Herrn Dr. Nils Johnsson danke ich für die Begutachtung dieser Arbeit.

Especially I would like to thank Prof. Dr. Richard Young, who gave me the opportunity to work in his lab to learn a lot about genomewide expression analysis.

Thanks a lot to all the colleagues from the Young-lab. I enjoyed a lot to work with you and I benefited from the help I got whenever I needed it.

Meinen Kollegen aus dem Labor Lehming möchte ich für ihre ständige Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit danken. Besonders möchte ich mich bei Jutta für ihre Großzügigkeit und für das Korrekturlesen meiner Arbeit bedanken.

Zum Schluss danke ich ganz besonders meiner Familie, Brigitte und Matthias dafür, dass sie mir immer geduldig zugehört haben, wenn ich es gebraucht habe und mir Mut zum Weitermachen gegeben haben.

Lebenslauf

Katja Kerkmann

geb. am 28.06.1973 in Rehren
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung

1978 – 1983 Grundschule, Rehren
1983 – 1985 Orientierungsstufe, Obernkirchen
1985 – 1992 Gymnasium Ernestinum, Rinteln
Abschluss: Abitur

Hochschulstudium

Oktober 1992- September 1994	Studium der Biologie an der Universität Osnabrück, Abschluss: Vordiplom
Oktober 1994- Mai 1997	Studium der Biologie an der Universität Hannover, Abschluss: Diplom
August 1996- Mai 1997	Diplomarbeit am Max Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln Thema: Die physiologische Rolle einer Phospholipase D in der trockentoleranten Pflanze <i>C. plantagineum</i>
Juni 1997- November 2000	Doktorarbeit im Labor von Dr. Norbert Lehming unter der Betreuung von Prof. Dr. Benno Müller-Hill im Max Delbrück Labor in der Max Planck-Gesellschaft in Köln Thema: Die genomweite Expressionsanalyse von Deletionsmutanten der Gene NHP6A/B und CDC73 in der Hefe <i>S. cerevisiae</i>
August 1999- April 2000	Im Rahmen der Doktorarbeit Aufenthalt im Labor von Prof. Dr. Richard A. Young am Whitehead Institute of Biomedical Research, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA