

ТРАНСКРИПЦИЯ

Лекция-семинар 2.
Регуляция транскрипции

Обсуждаем:

- Транскрипционные факторы эукариот-особенности строения и взаимодействия с ДНК
- Как определить размеры промотора?

Транскрипционные факторы

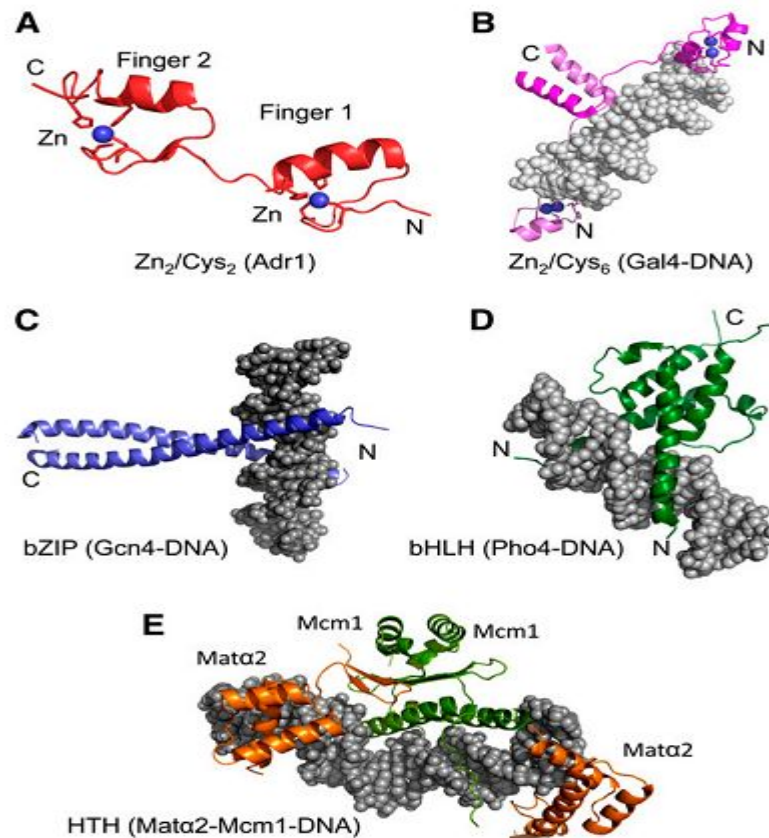
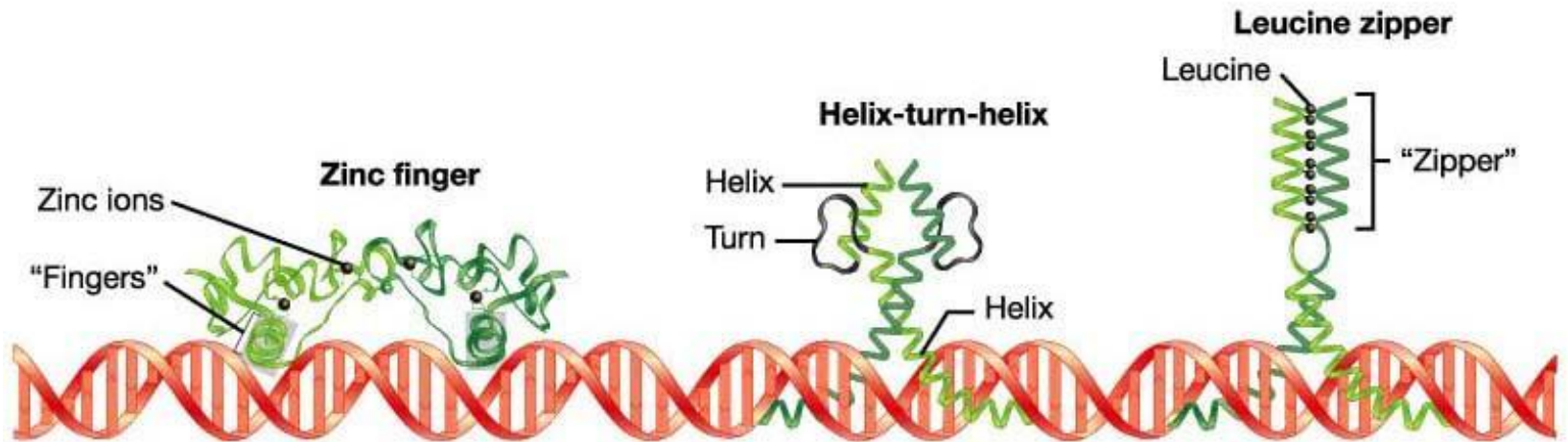


Figure 1 DNA-binding domains of five yeast transcription factors. Blue spheres, Zn; gray spheres, DNA. Protein data bank (http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/prot_dna/prot_dna.html) accession codes are in parentheses. (A) C2H2 zinc fingers of Adr1 (2ADR); (B) C6 (zinc knuckle) of Gal4 (1D66); (C) bZIP structure of Gcn4 (1YSA); (D) bHLH of Pho4 (1AOA); (E) helix-turn-helix of Mat α 2 and winged helix of Mcm1 (1MNM).

Действие ТФ



Транскрипционные факторы

Активаторы и репрессоры

Являются модульными по структуре и содержат следующие домены:

1. ДНК-связывающий домен (DBD)
2. Трансактивирующий домен (TAD)
3. Сигналраспознающий домен (SSD)
4. Димеризационный домен

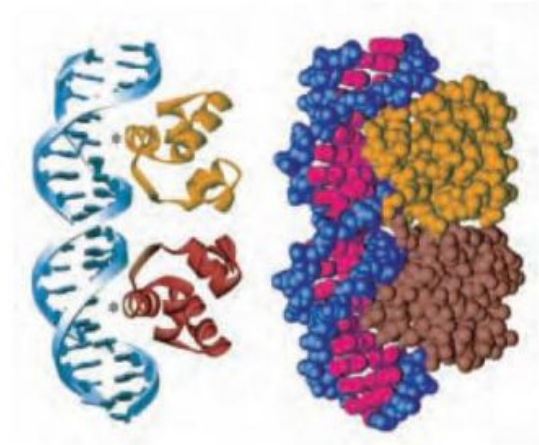
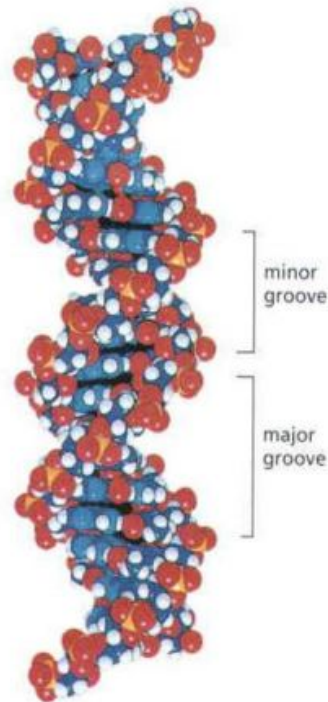


Трансактивирующие домены

- Кислые (GAL4, из 49 Ак – 11 кислые)
- Глутамин-богатые (Sp1, ~25% Ак – глутамин)
- Пролин-богатые (CTF, из 84 Ак – 19 пролин)

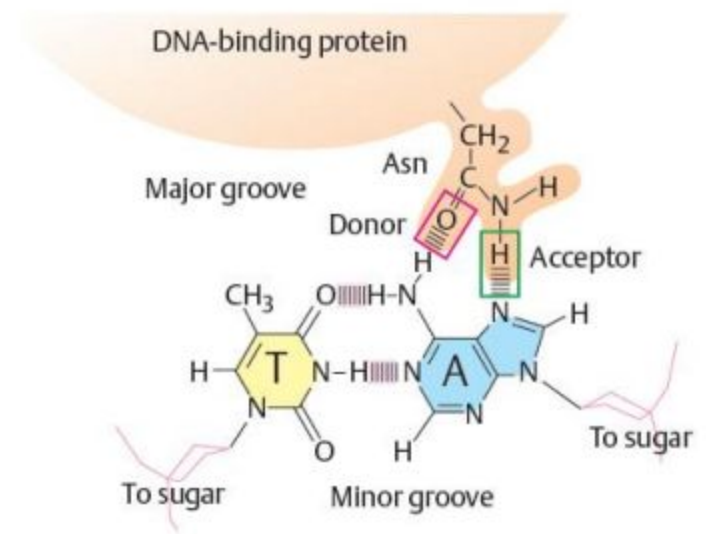
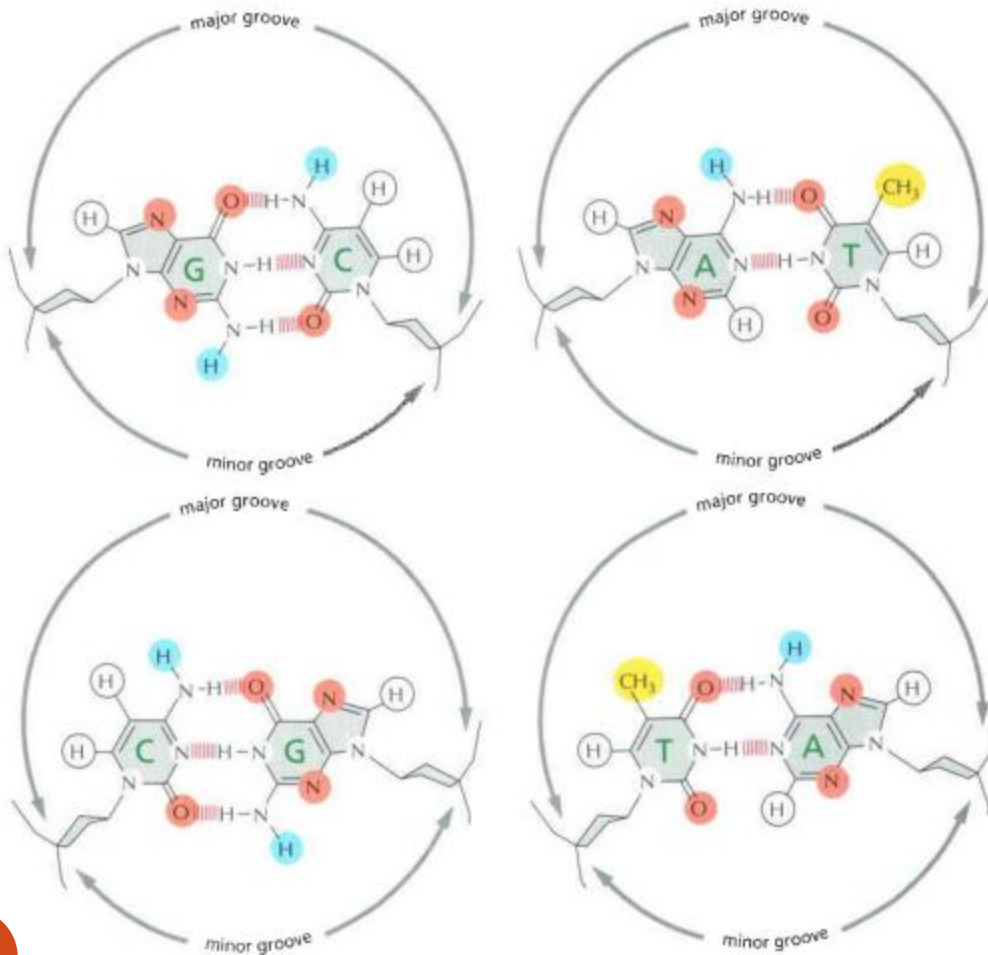
ДНК-связывающие домены

- Взаимодействуют в основном с большой бороздкой ДНК



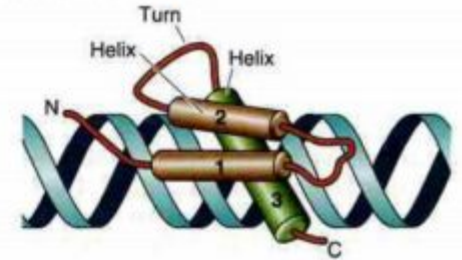
ДНК-связывающие домены

- Образуют водородные связи с азотистыми основаниями

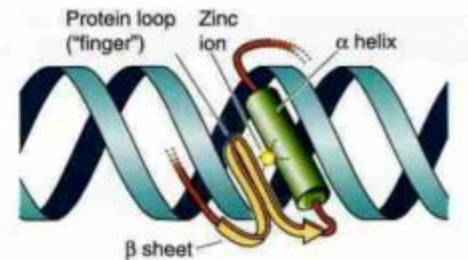


Семейства транскрипционных факторов

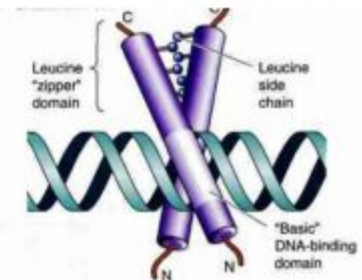
- Спираль-поворот-спираль (helix-turn-helix - **HTH**)



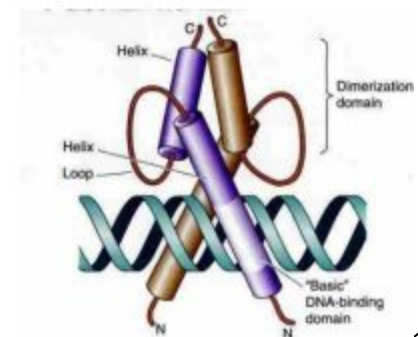
- Цинковые пальцы (zinc finger)



- Лейциновая молния (basic leucine zipper - **bZIP**)

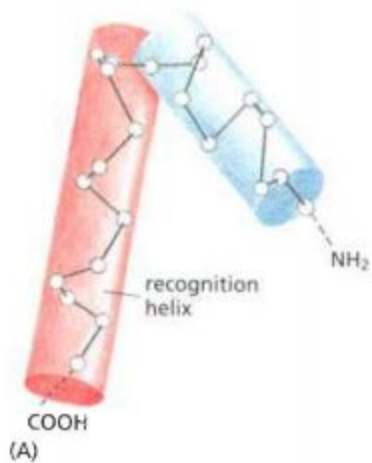


- Спираль-петля-спираль (basic helix-loop-helix – **bHLH**)

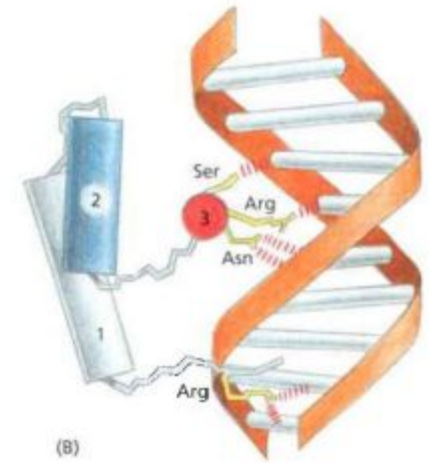
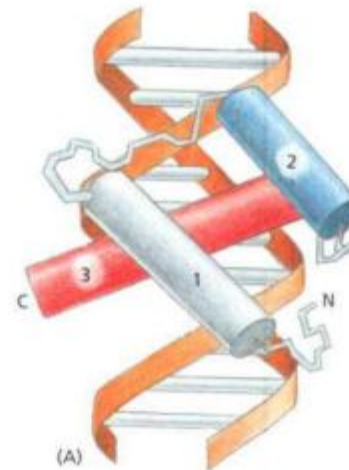


Спираль-поворот-спираль

прокариоты



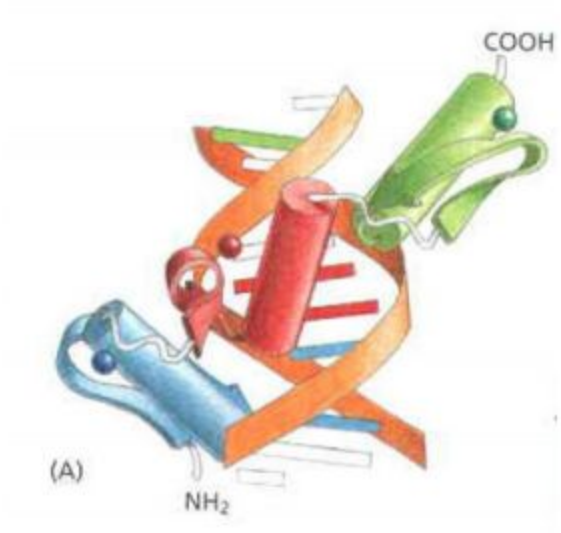
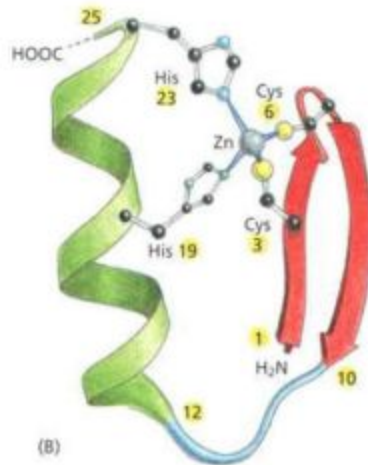
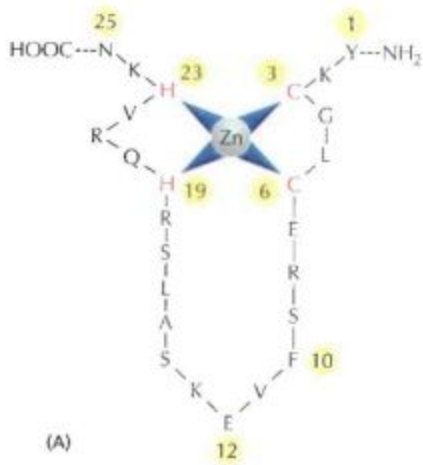
эукариоты



Часто функционируют как димеры

Примеры: гомеодомен (белки HOX, POU)

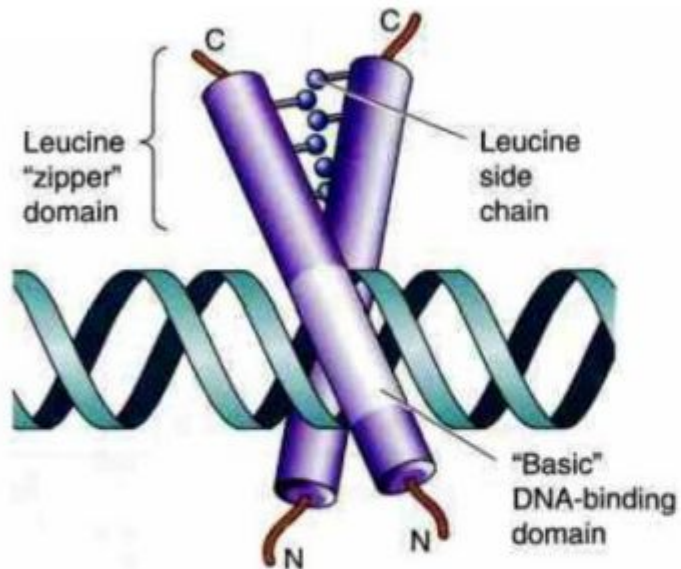
Цинковые пальцы



Часто в ТФ содержится больше одного Zn пальца (может быть больше 10)

Примеры: Sp1, Egr-1, WT-1, рецептор стероидных гормонов

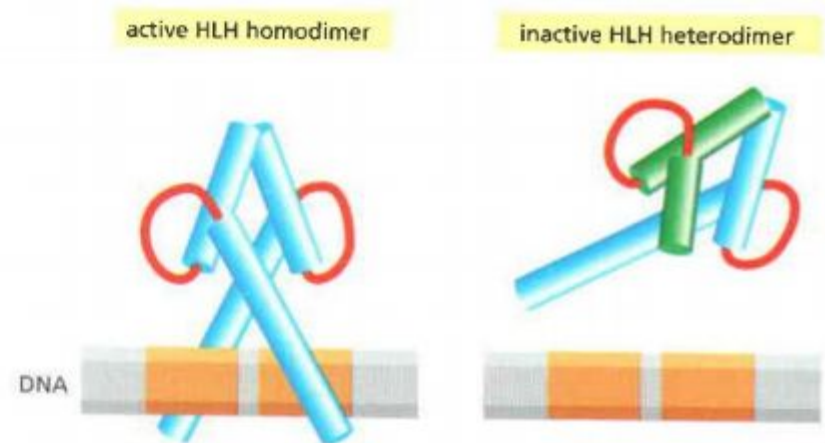
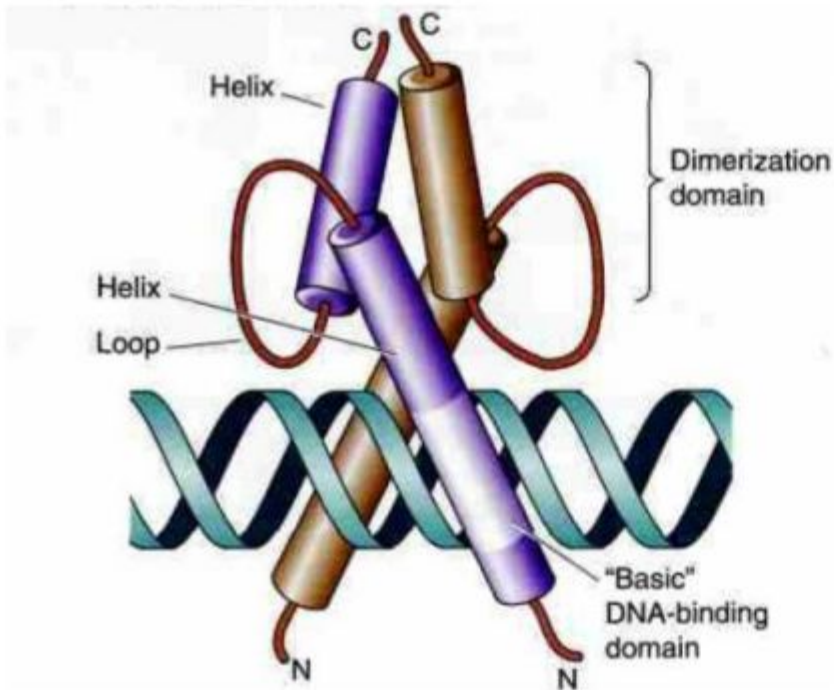
Лейциновая молния



Функционируют как гомо- или гетеродимеры

Примеры: C/EBP β , c-Fos, c-Jun, CREB

Спираль-петля-спираль

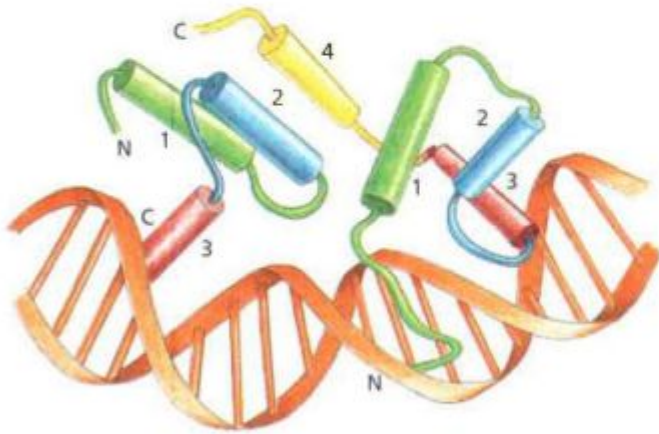


Функционируют как гомо- или гетеродимеры

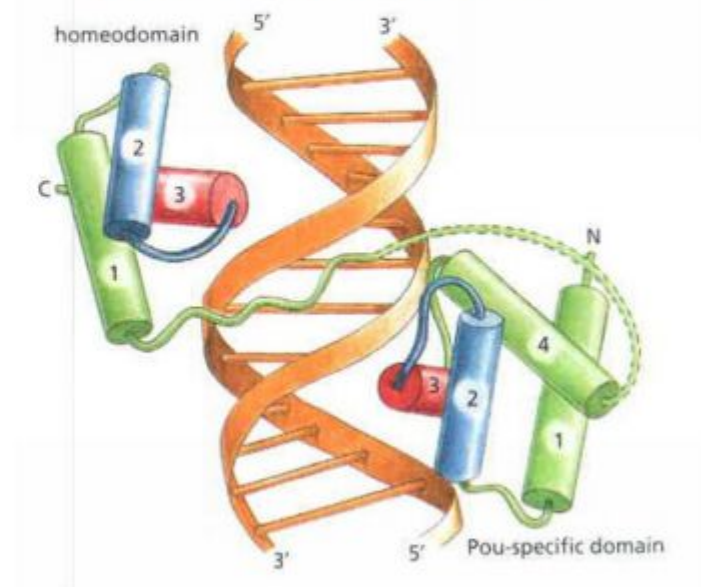
Примеры: MyoD, E-protein.

Комбинирование ДНК-связывающих доменов

Гетеродимеризация

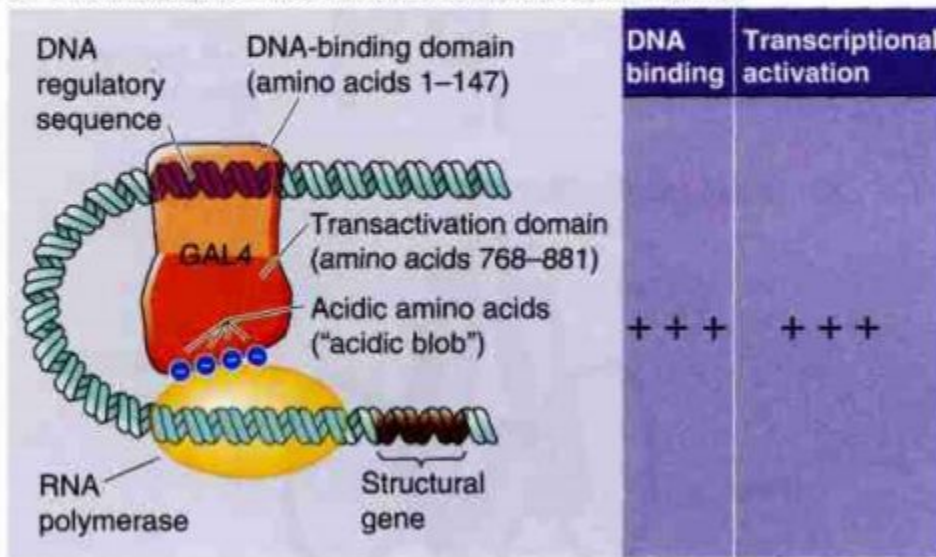


Наличие в одной молекуле разных доменов

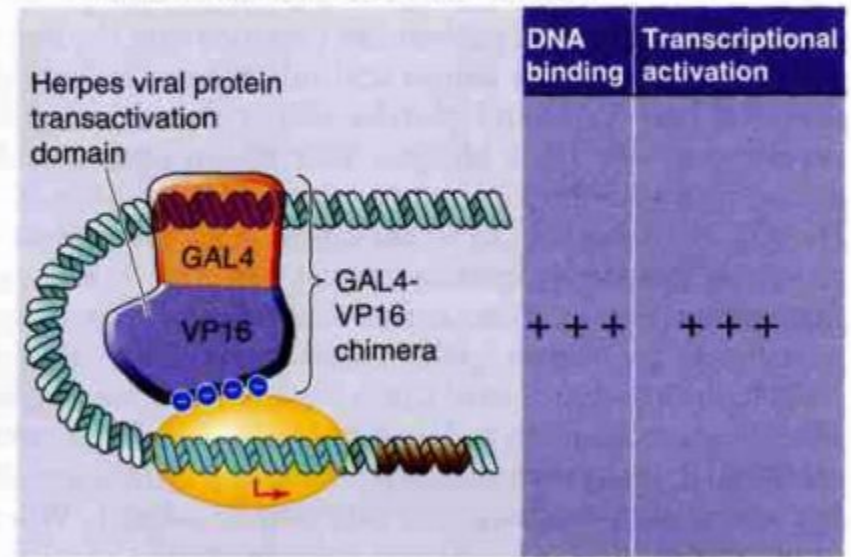


Модульная структура ТФ

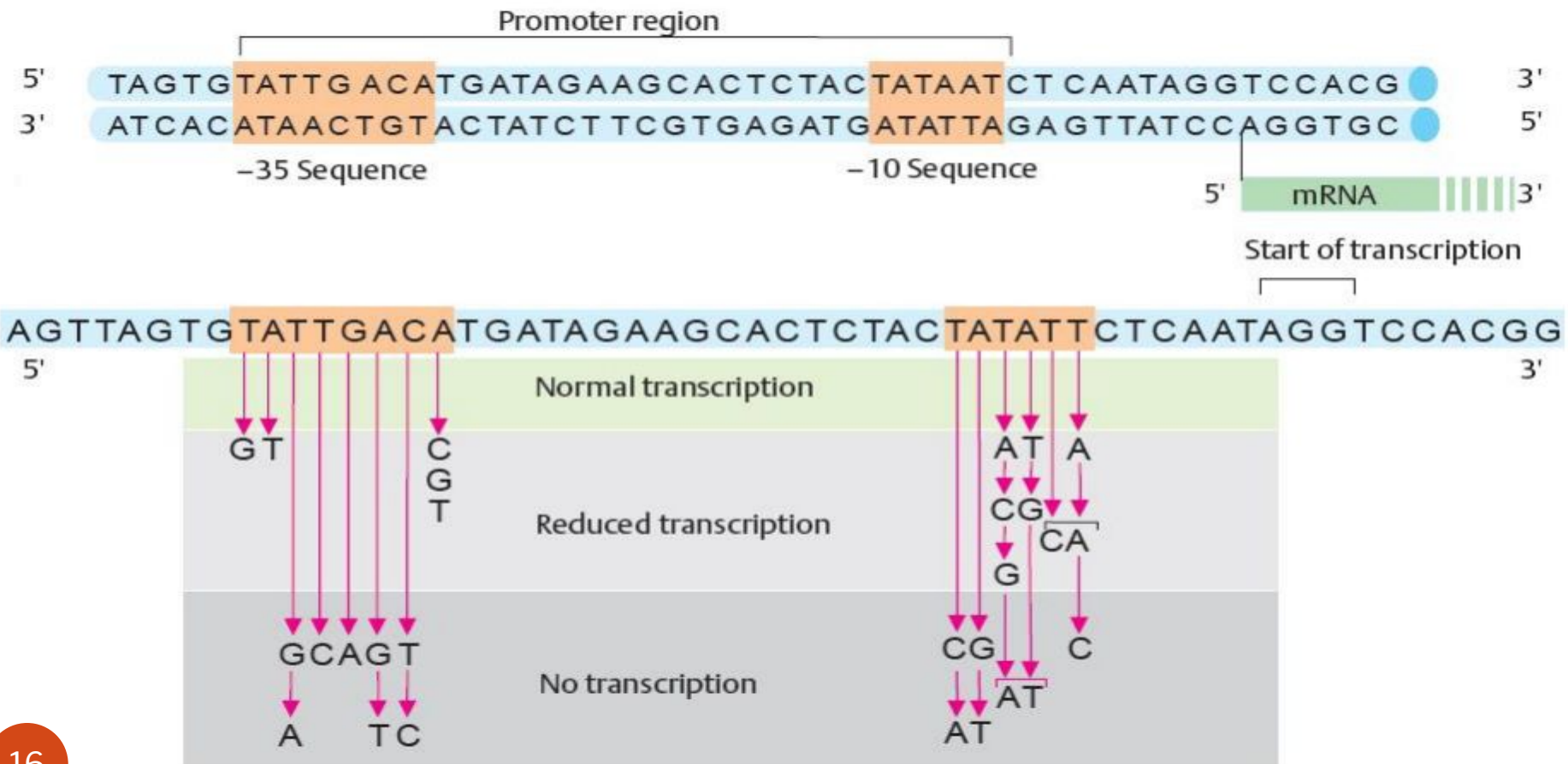
A DNA-BINDING AND TRANSACTIVATION DOMAINS



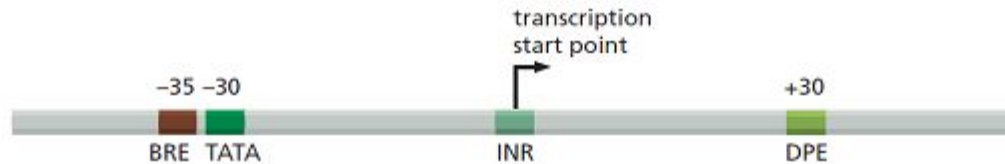
B CHIMERIC TRANSCRIPTION FACTOR



Промотор прокариот



Промотор эукариот



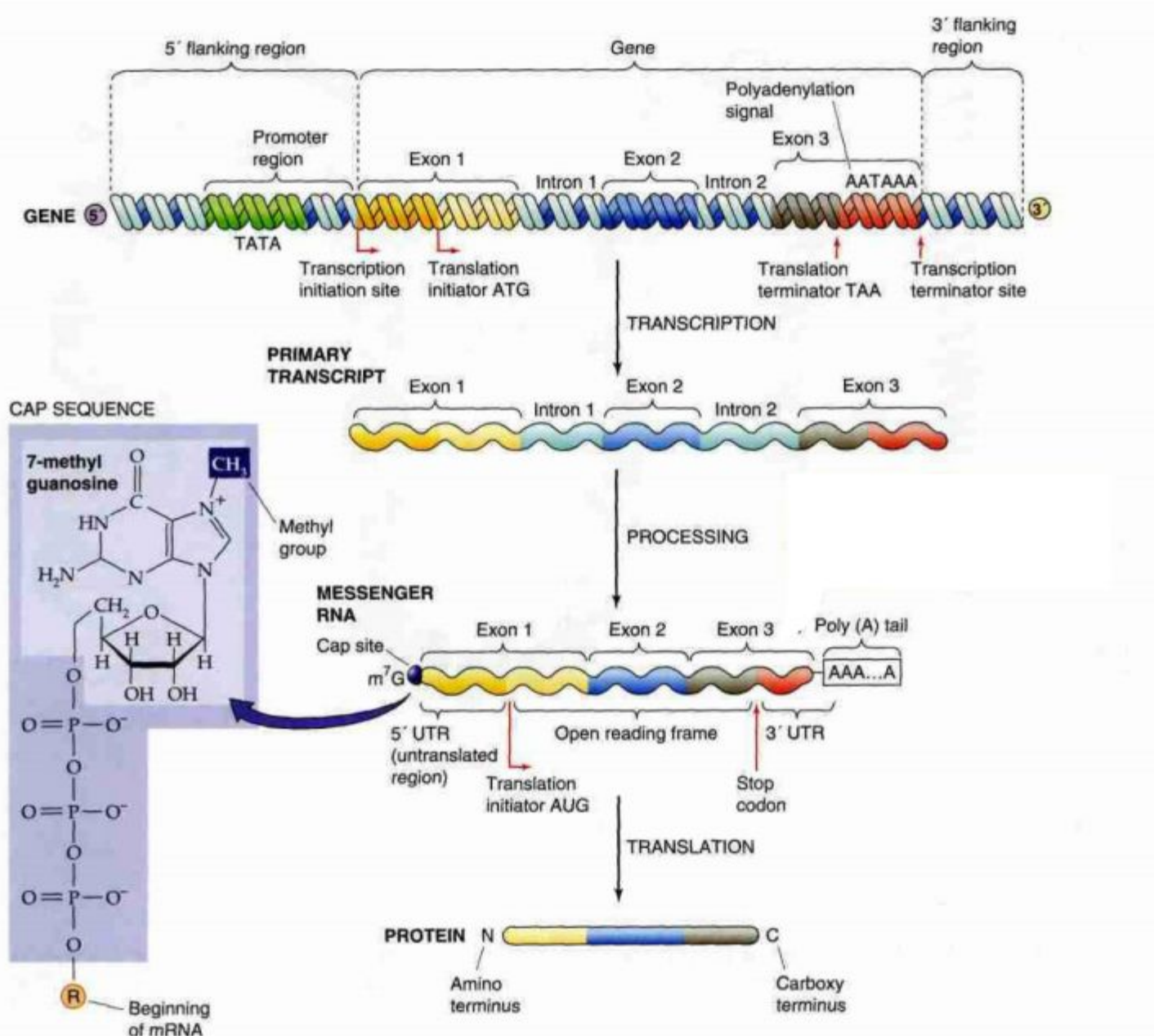
Регуляторный элемент	Последовательность	Общий транскрипционный фактор
BRE	G/C G/C G/A C G C C	TFIIB
TATA	T A T A A/T A A/T	TBP
INR	C/T C/T A N T/A C/T C/T	TFIID
DPE	A/G G A/T C G T G	TFIID

BRE - B recognition element

INR - initiator element

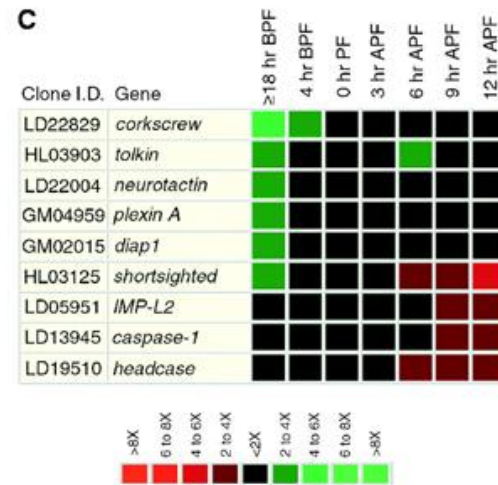
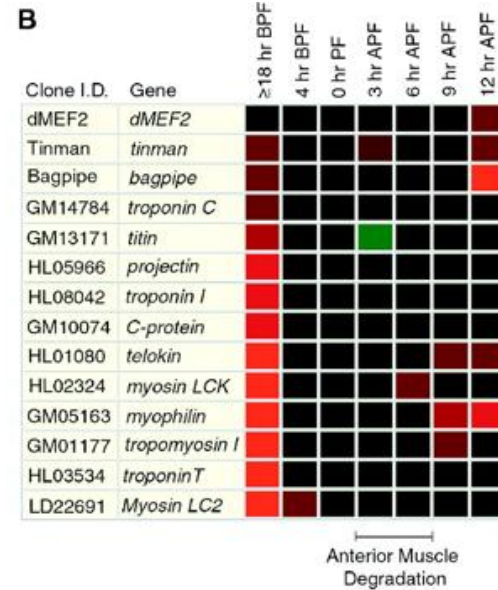
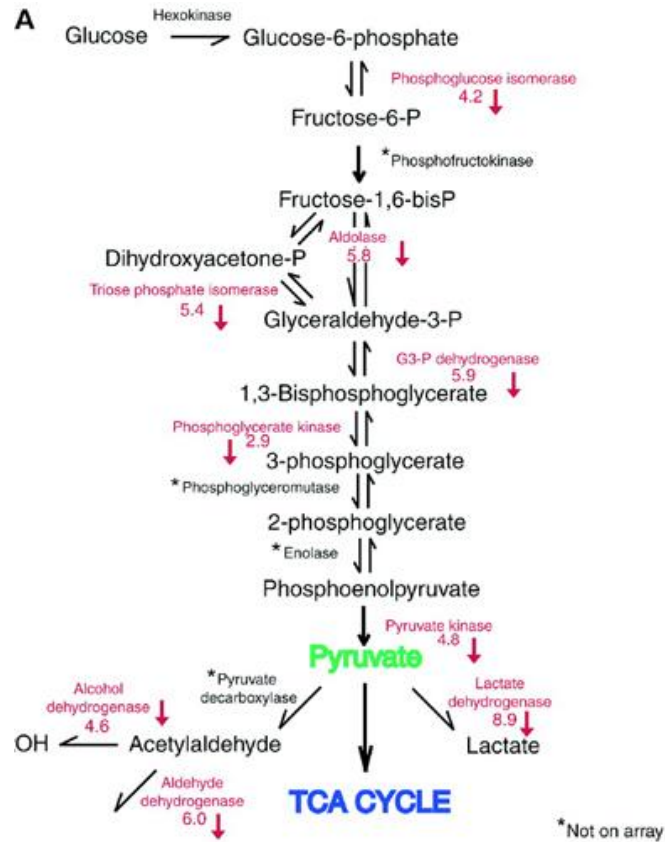
DPE - downstream promoter element

Эукариотический ген и этапы экспрессии

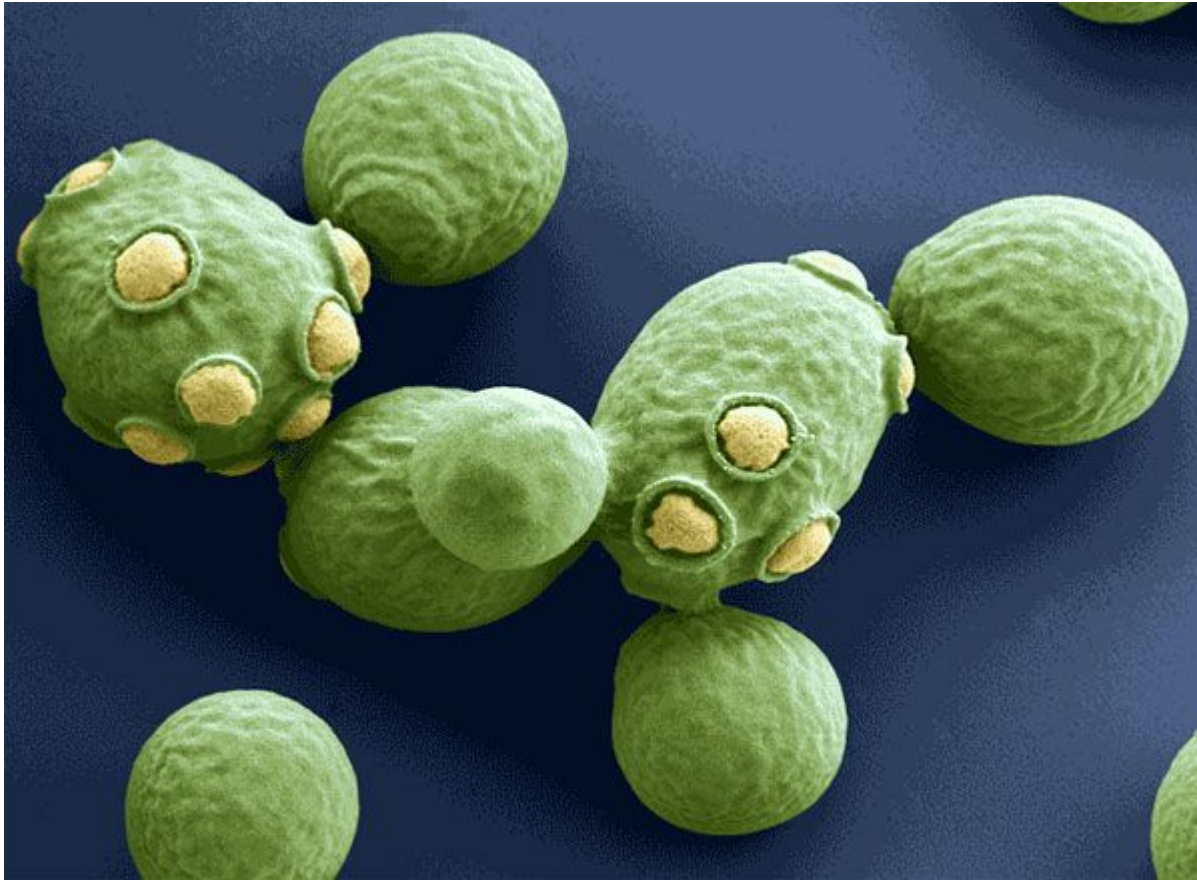


Complete Metamorphosis:
Life Cycle of the Lady Beetle

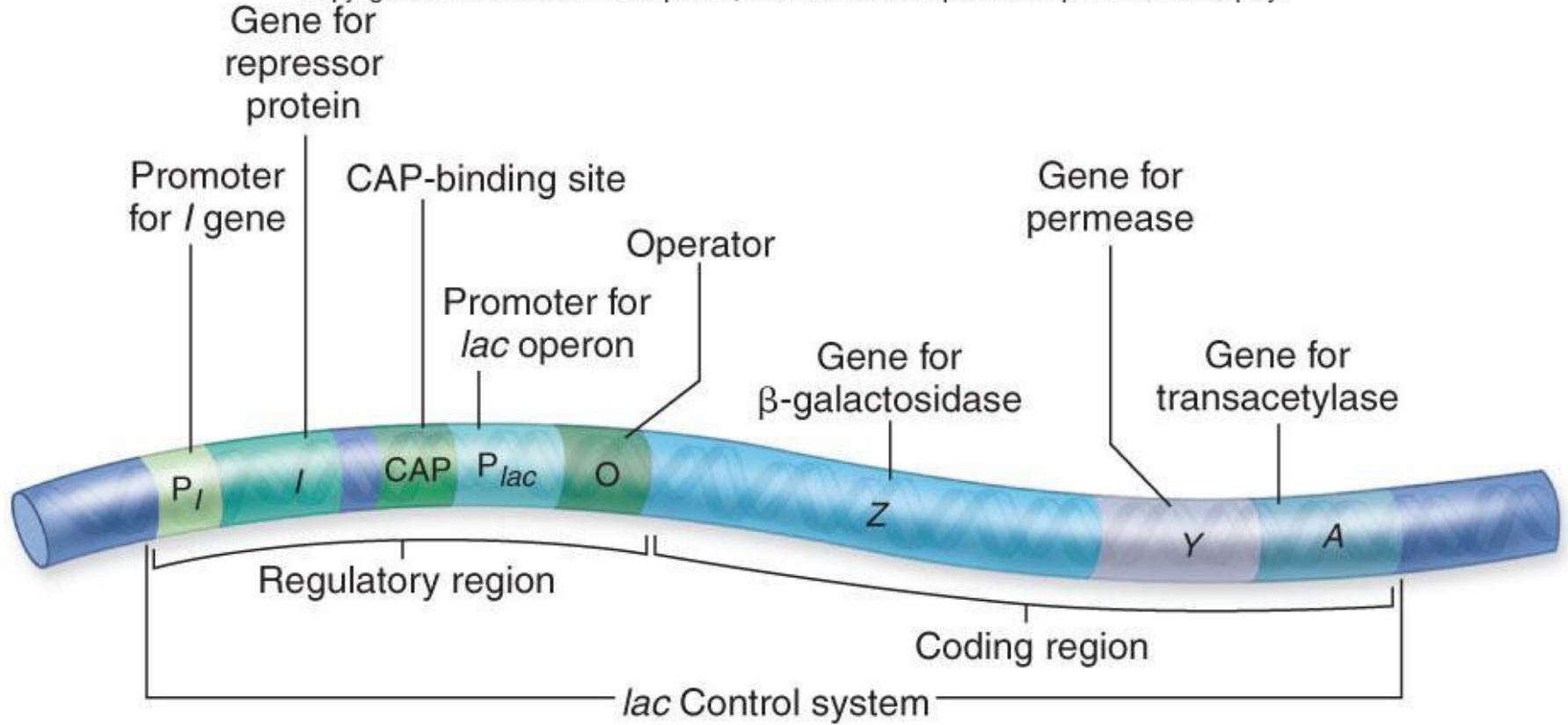




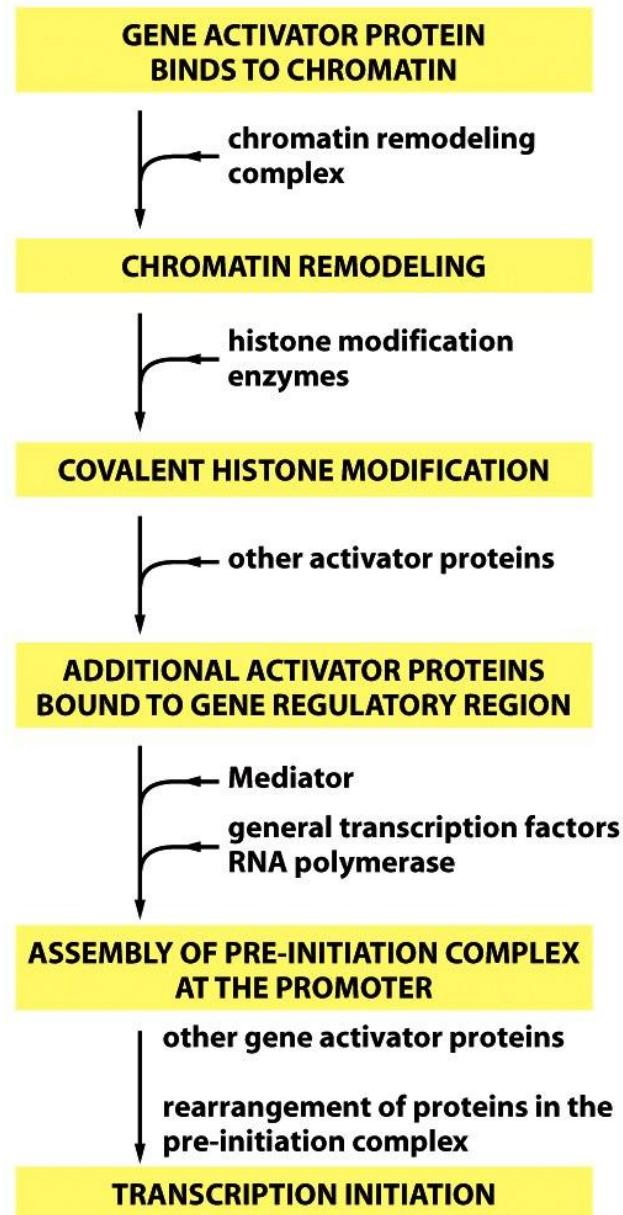




Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



Mechanism of action



Кластеры генов

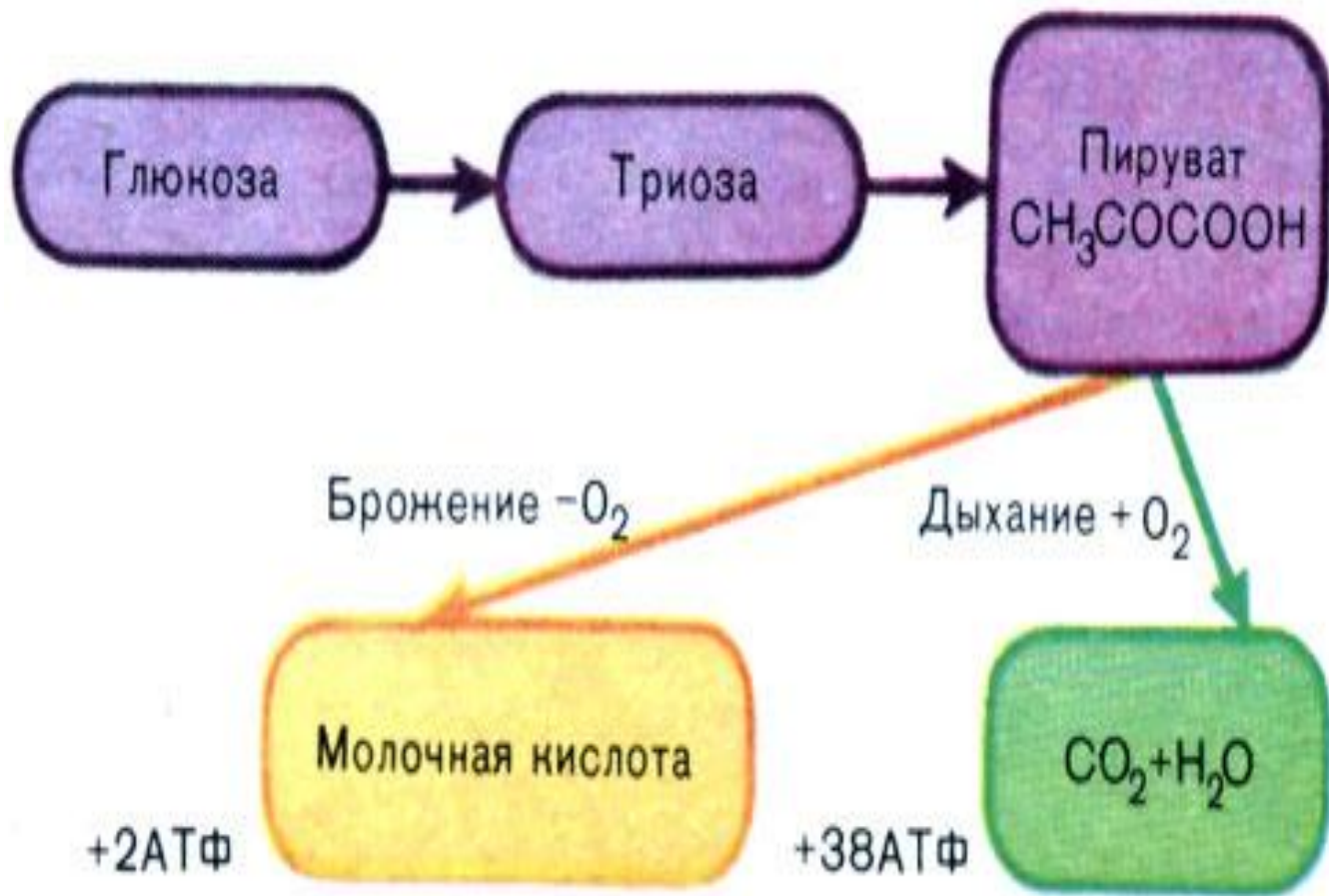
Кластеры генов	объект	авторы
DAL1 – DAL4 – DAL2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cooper, Lawther, 1974
GAL7-GAL10-GAL1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Douglas, Hawthorne, 1964
prnA-prnD-prnB-prnC	<i>Aspergillus nidulans</i>	Arst, McDonald, 1975

Подходы к изучению регуляции экспрессии генов

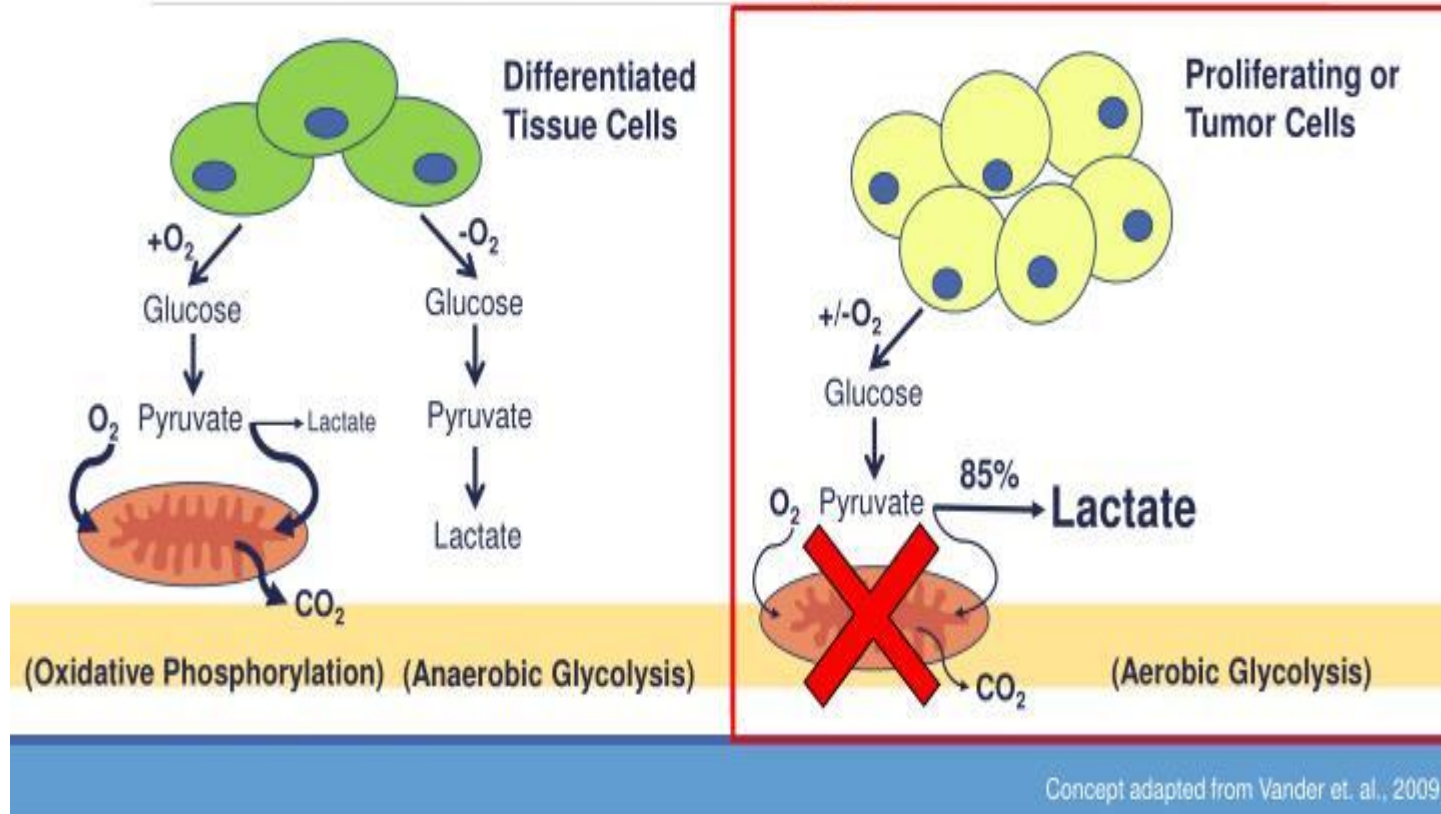
- **1. Генетический** – отбор и анализ мутантов и выяснение эпистатических взаимодействий
- **2. Молекулярно-биологический** – исследование структуры генов, выделение регуляторных белков и поиск их мишеней, анализ белок-белковых и белок-ДНК взаимодействий
- **3. Анализ транскриптомов**
- **4. Разработка принципов интеграции различных регуляторных цепей**

Генетический контроль метаболизма углеводов





What is the Warburg Effect?

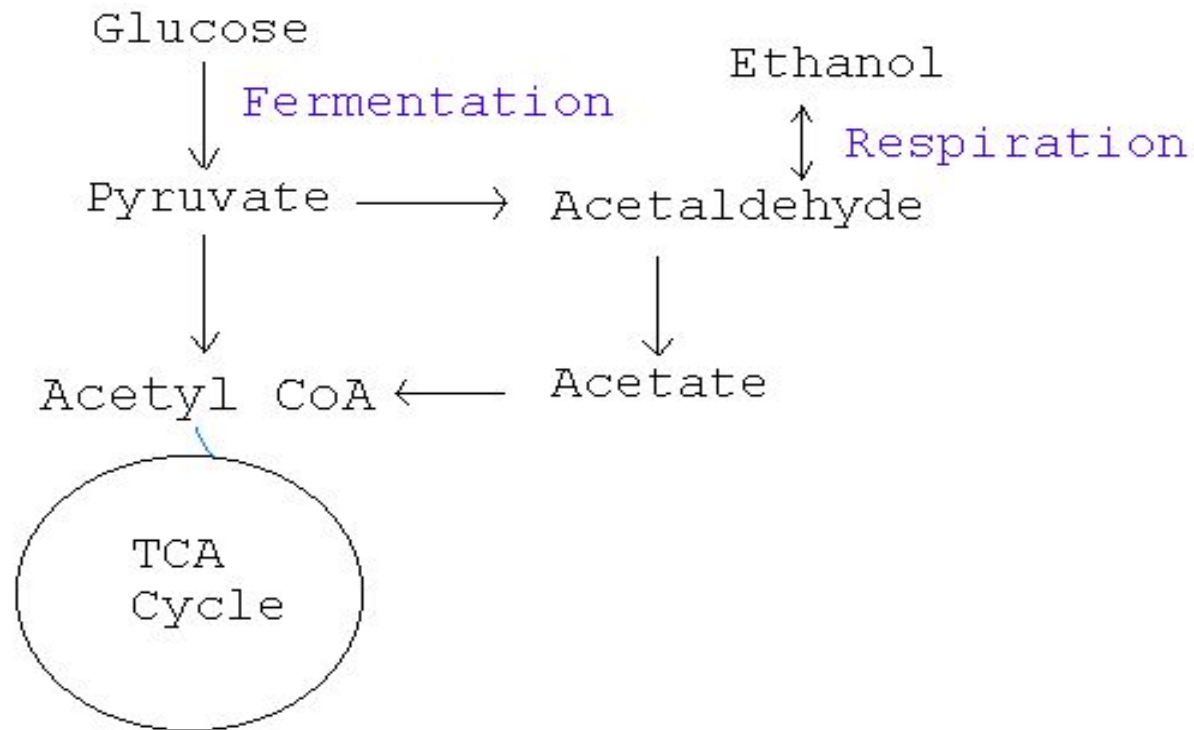


В клетках опухоли возрастает уровень фосфофруктокиназы (с очень высоким родством к глюкозе) и лактатдегидрогеназы

Метаболизм углеводов у дрожжей и его регуляция

- Ферментация: Брожение — это анаэробный метаболический распад молекул питательных веществ, например, глюкозы
- Дрожжи *S. cerevisiae* факультативные анаэробы

Yeast Metabolism



Диауксический шифт

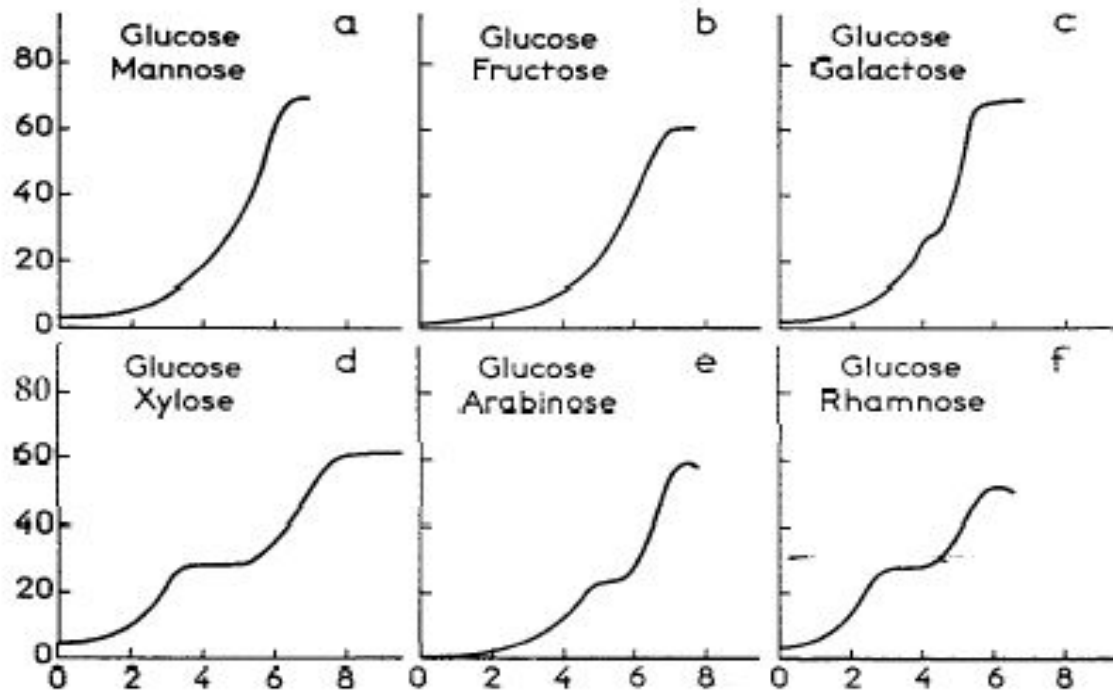
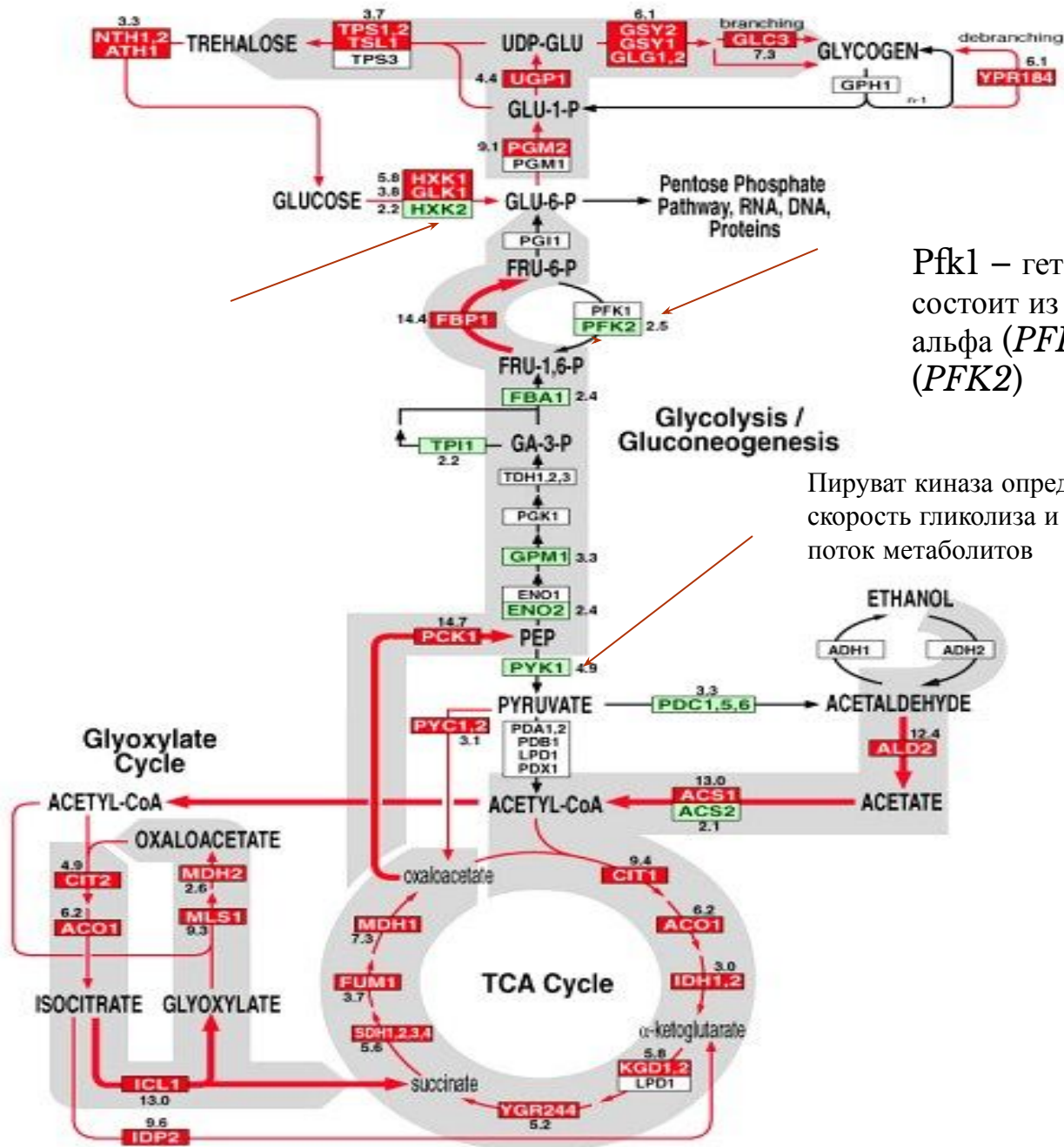


Fig.1. Growth of *E. coli* in the presence of different carbohydrate pairs serving as the only source of carbon in a synthetic medium³⁰.



Pfk1 – гетерооктамер, состоит из субъединиц альфа (*PFK1*) и бета (*PFK2*)

Пируват киназа определяет скорость гликолиза и направляет поток метаболитов

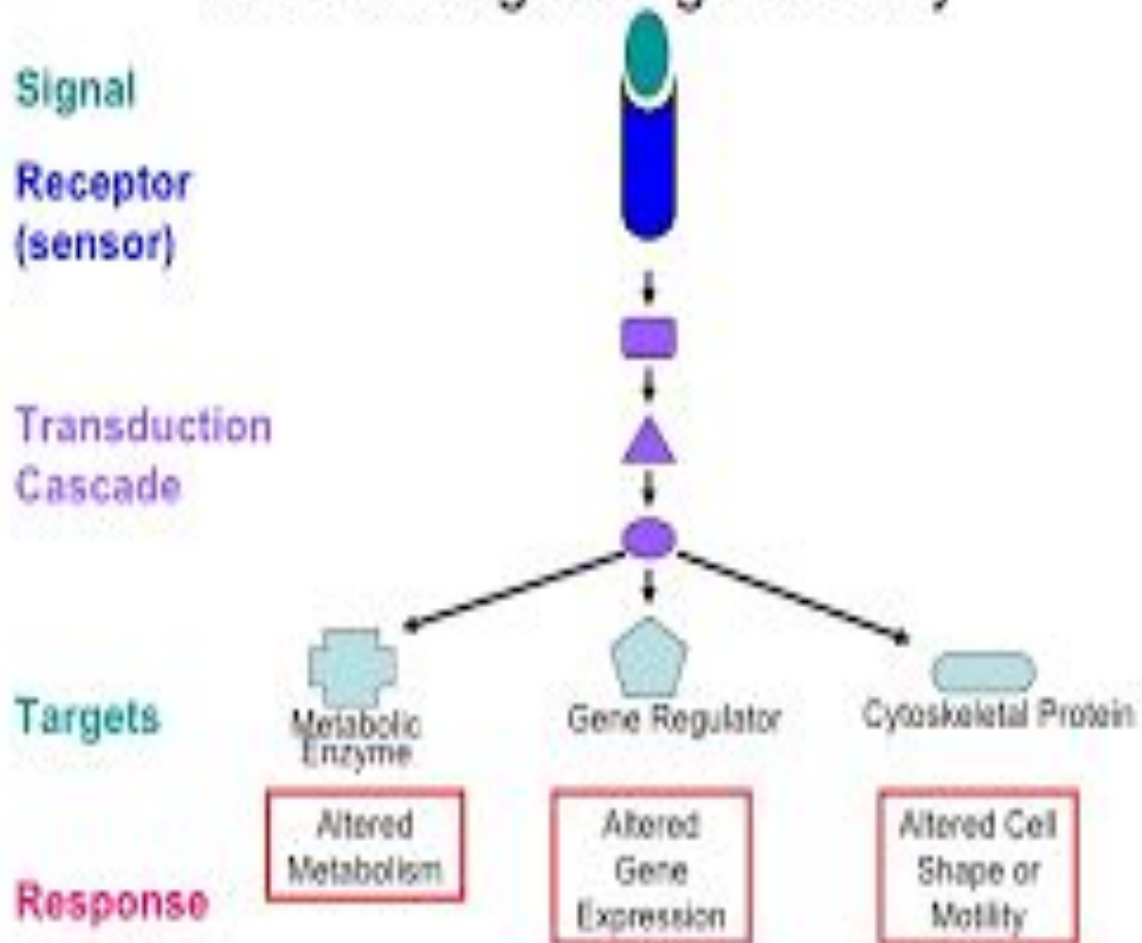
Глюкоза в среде

```
graph TD; A[Глюкоза в среде] --> B[Индукция генов, кодирующих переносчики глюкозы и ферменты гликолиза]; A --> C[Глюкозная катаболитная репрессия генов, кодирующих ферменты, необходимые для усвоения других сахаров];
```

Индукция генов,
кодирующих
переносчики
глюкозы и ферменты
гликолиза

Глюкозная катаболитная репрессия
генов, кодирующих ферменты,
необходимые для усвоения других
сахаров

Generic Signalling Pathway



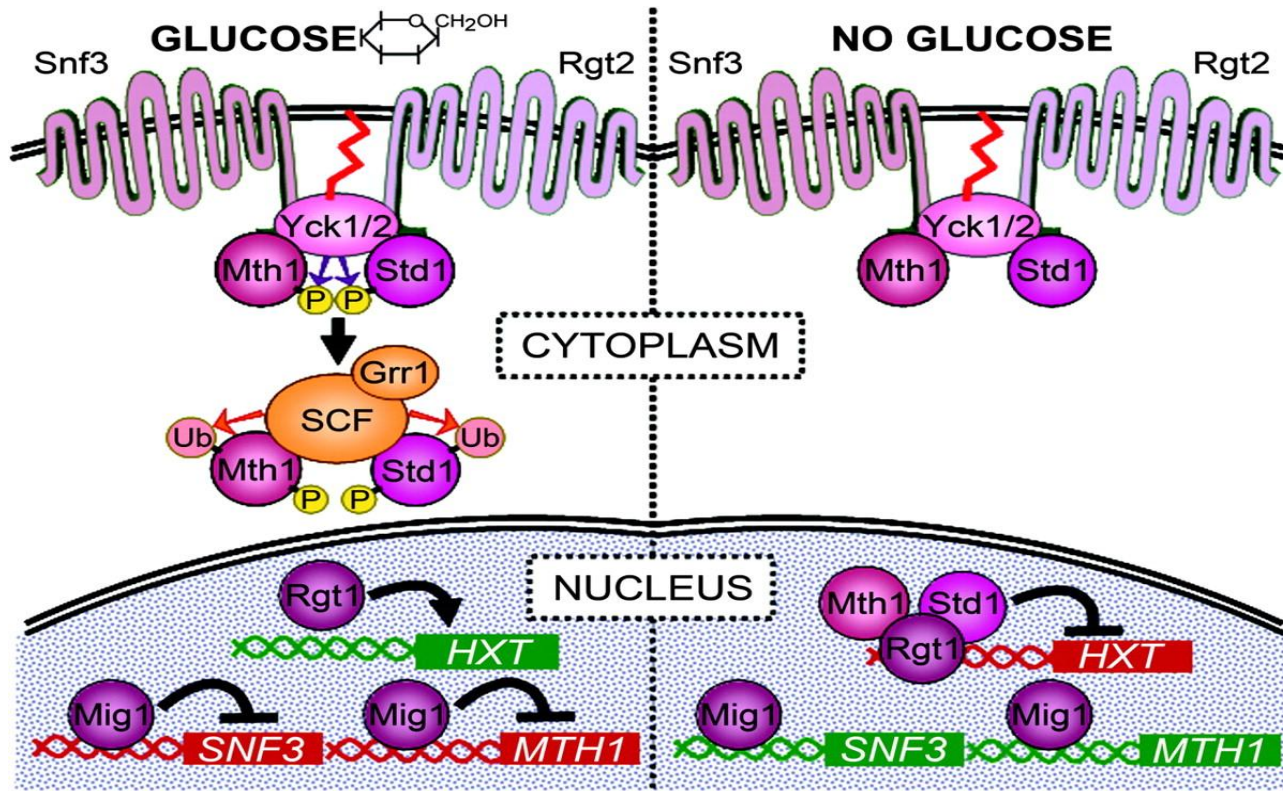
Adapted from Molecular Biology of the Cell, (2002), 4th edition. Alberts et al.

Белки, участвующие в регуляции глюкозного обмена

Mth1

- –негативный регулятор пути переноса сигнала о концентрации глюкозы в среде. Необходим для репрессии транскрипции генов НХТ ,белком репрессором Rgt1p;
- Взаимодействует с Rgt1p и сенсорами глюкозы Snf3p и Rgt2p;
- Фосфорилирование Mth1p киназой Yck1p запускает его деградацию;
- МТН1 имеет паралог STD1,который возник в результате полногеномной дупликации
- **Std1** – белок взаимодействует с Snf1p, сенсорами глюкозы Snf3p и Rgt2p; регулятор транскрипционного фактора Rgt1p;

Ответ клетки на глюкозу в среде

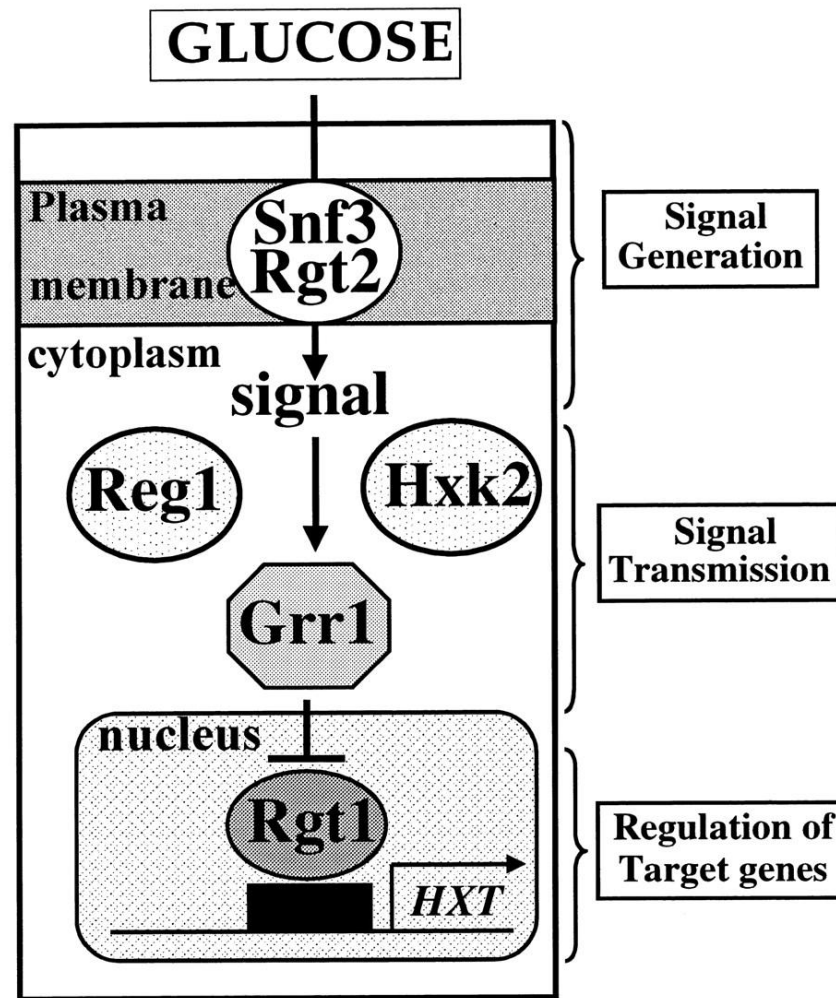


Rgt1 может быть и активатором и репрессором. Rgt1 совместно с Mth1 и Std1 репрессирует гены HXT, кодирующие транспортеры глюкозы. Освобождение промоторов от Rgt1 некоторых генов HXT требует активности cAMP-зависимой протеинкиназы (PKA)

Системы транспорта глюкозы у дрожжей-сахаромицетов

Система транспорта	белки	Фенотип мутанта
Конститутивная (с низким сродством к глюкозе)	При высокой концентрации глюкозы – Hxt1 и Hxt3	Только мутации по всем 7 генам HXT ведут к неспособности расти на глюкозе
Репрессируемая глюкозой (с высоким сродством к глюкозе)	В среде, где глюкозы мало синтезируются Hxt6 –Hxt7, при повышении концентрации – Hxt2 и Hxt4	
Сенсоры глюкозы – мембранные белки	Rgt2 - сенсор высокой концентрации глюкозы Snf3 –сенсор низкой концентрации глюкозы	Штамм <i>snf3 rgt2</i> – дефектен в глюкозной индукции генов <i>HXT</i>

The glucose induction pathway of the HXT genes and its components.



Grr1 – убиквитин-лигаза

Özcan S, Johnston M Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1999;63:554-569

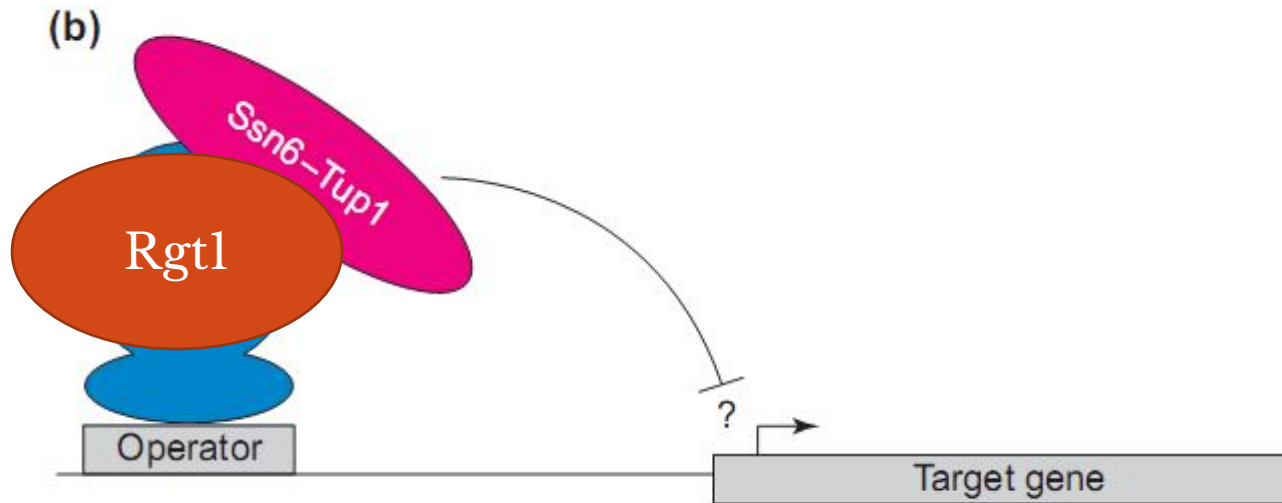
Microbiology and Molecular Biology Reviews

Rgt1

- Имеет ДНК-связывающий домен (Cys₆Zn₂)
- В отличие от Gal4p, не имеет домена димеризации и связывается с ДНК в виде мономера
- Бифункциональный ТФ – если нет глюкозы – репрессор, много глюкозы – активатор, низкий уровень – нейтральный фактор.

Rgt1 регулирует экспрессию генов, кодирующих белки-переносчики глюкозы и не влияет на экспрессию генов, кодирующих ферменты гликолиза

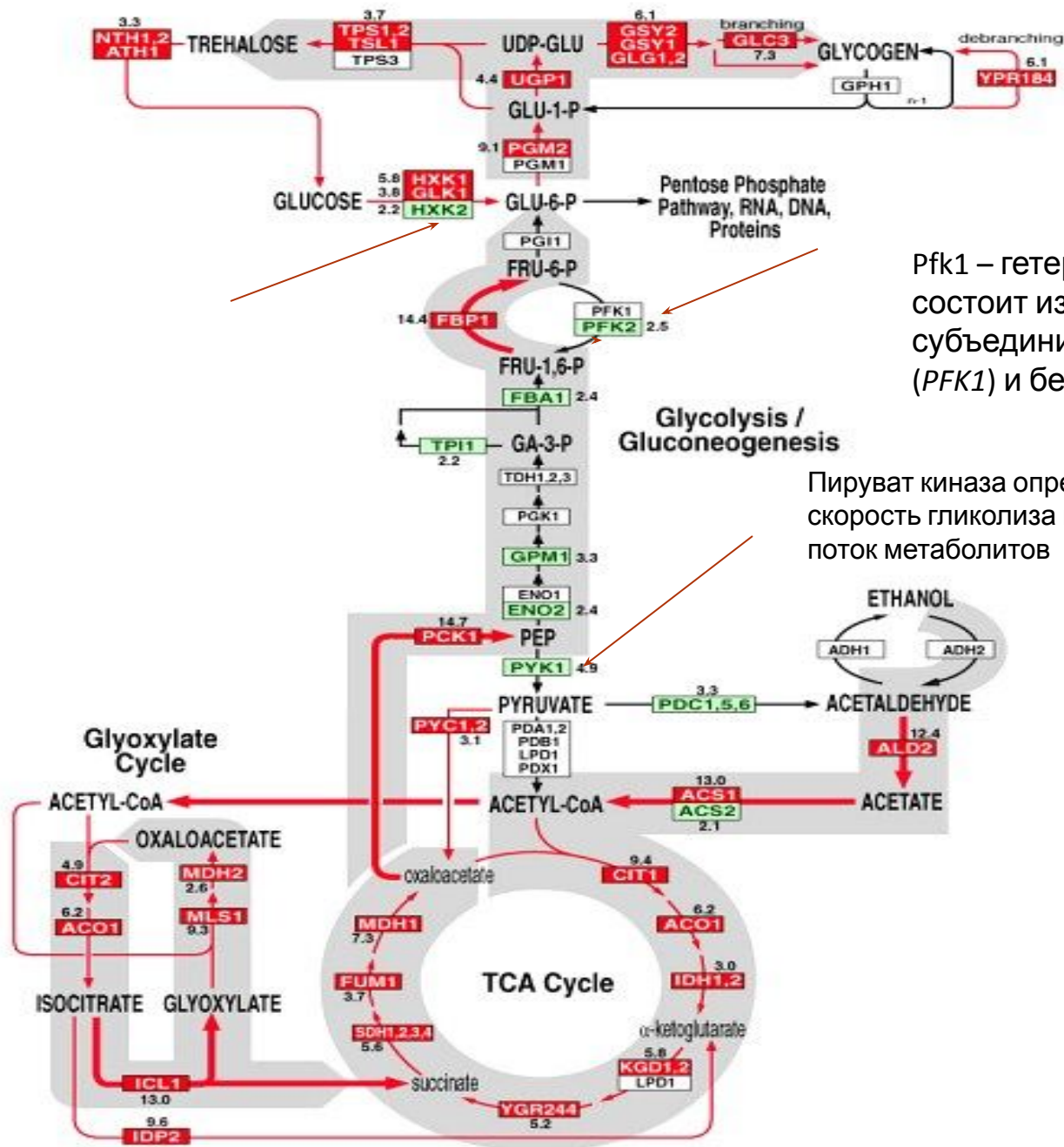
Rgt1 – регулятор генов, контролирующих белки – переносчики глюкозы
 привлекает комплекс ко-репрессора Tup1-Ssn6



Gene sets repressed by Ssn6-Tup1	
Function	DNA-binding protein
a-specific genes	$\alpha 2$ /Mcm1
Haploid-specific genes	a1/ $\alpha 2$
Glucose-repressible genes	Mig1
DNA-damage-inducible genes	Crt1
Oxygen utilization genes	Rox1
Starch-degrading enzymes	Nrg1
Osmotic-stress-inducible genes	Sko1
Sporulation-specific genes	?
Meiosis-specific genes	?
Flocculation genes	?

Глюкозная индукция

Активация генов гликолиза

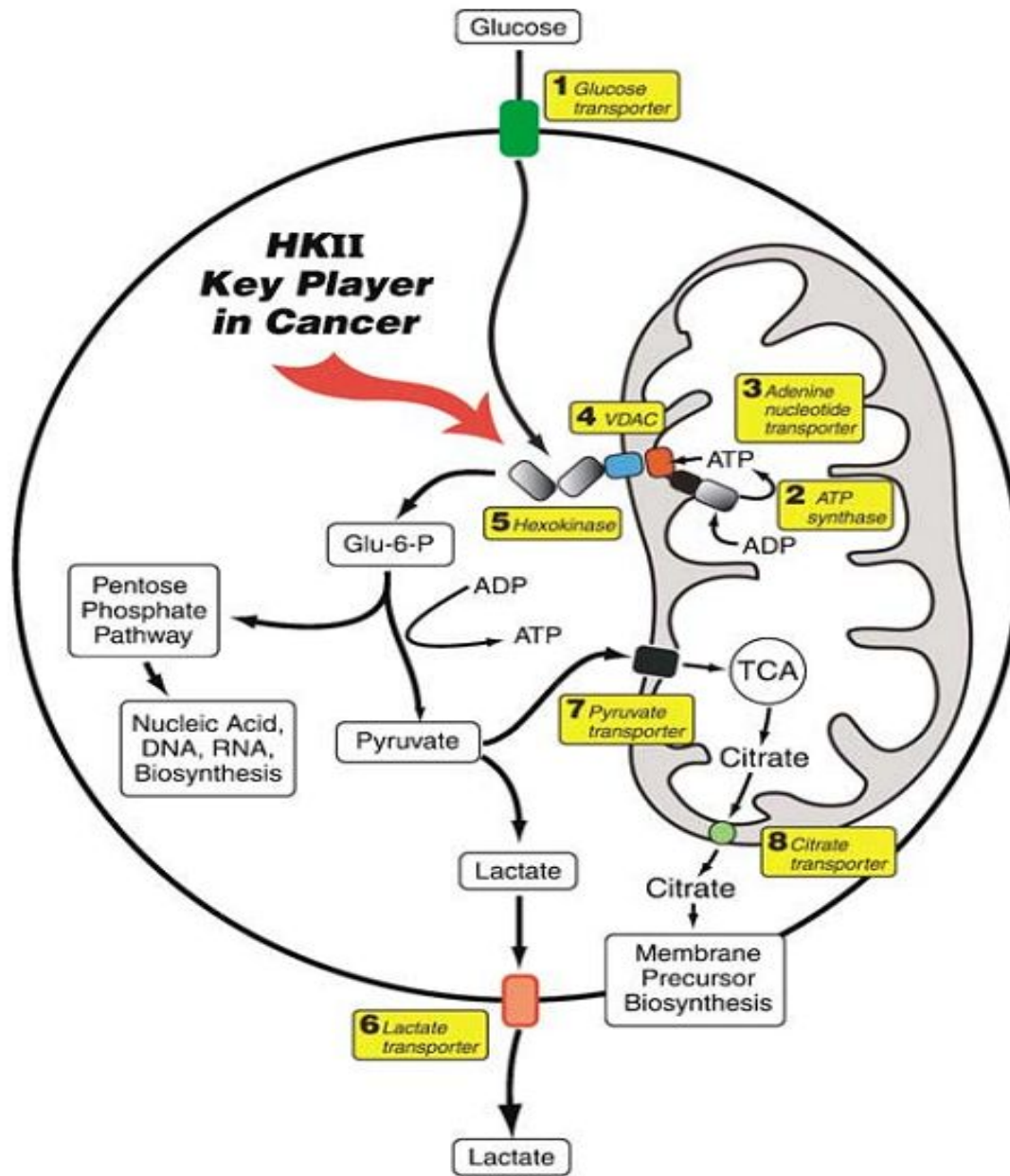


Pfk1 – гетерооктамер, СОСТОИТ ИЗ субъекдиниц альфа (PFK1) и бета (PFK2)

Пируват киназа определяет скорость гликолиза и направляет поток метаболитов

Формы гексокиназы у дрожжей

	Гексокиназа II	
	мономер	димер
+ глюкоза		Не фосфорилирована (активна)
- глюкоза	Фосфорилирована (не активна)	
Фосфатазы	Reg1p, Glc7p	



Ферменты, катализирующие необратимые реакции гликолиза

- Фосфофруктокиназа Pfk1 (Pfk1 и Pfk2)
- (в норме ингибируется цитратом и АТФ, при раке- нет)
- Пируваткиназа Puk1 – определяет скорость гликолиза. Мишень для антираковой терапии.

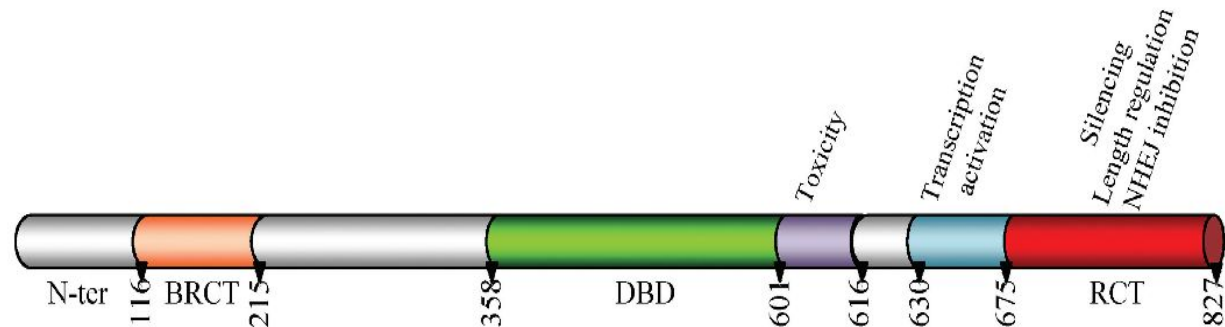
Основные регуляторы транскрипции генов, индуцируемых глюкозой

- Rap1
- Gcr1 -
- Gcr2 – взаимодействует с Gcr1 и активирует ТОЛЬКО ГЕНЫ ГЛИКОЛИЗА

Rap1

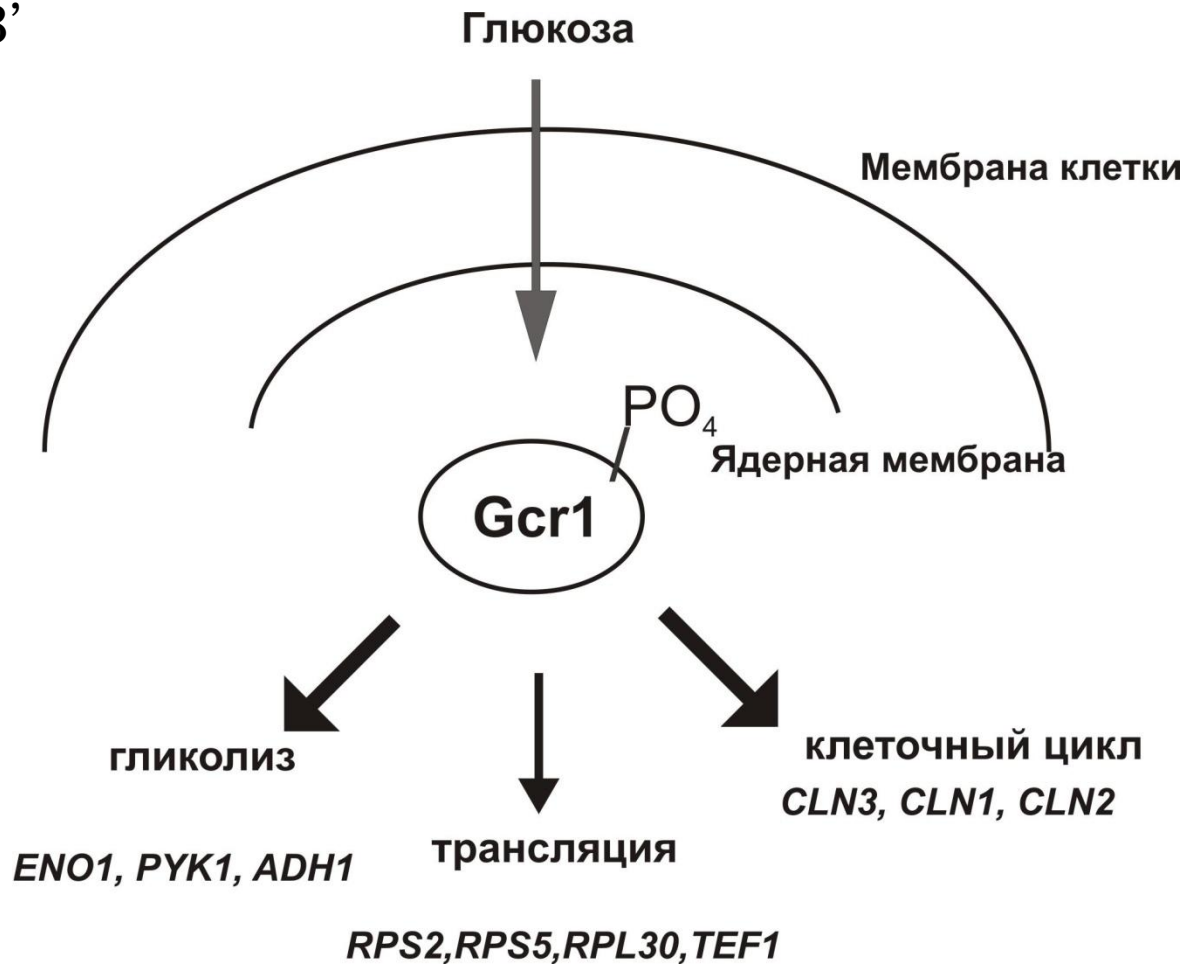
- 92,4 kDa
- Активатор генов гликолиза и генов белков рибосом
- Связывается с несколькими сотнями промоторов
- репрессор локусов типа спаривания и удлинения теломер
- Гликолиз регулирует в комплексе с Gcr1/Gcr2
- RPG-box – ACCCATACATTTA
- Узнает и активирует 294 гена у дрожжей (5% генов)

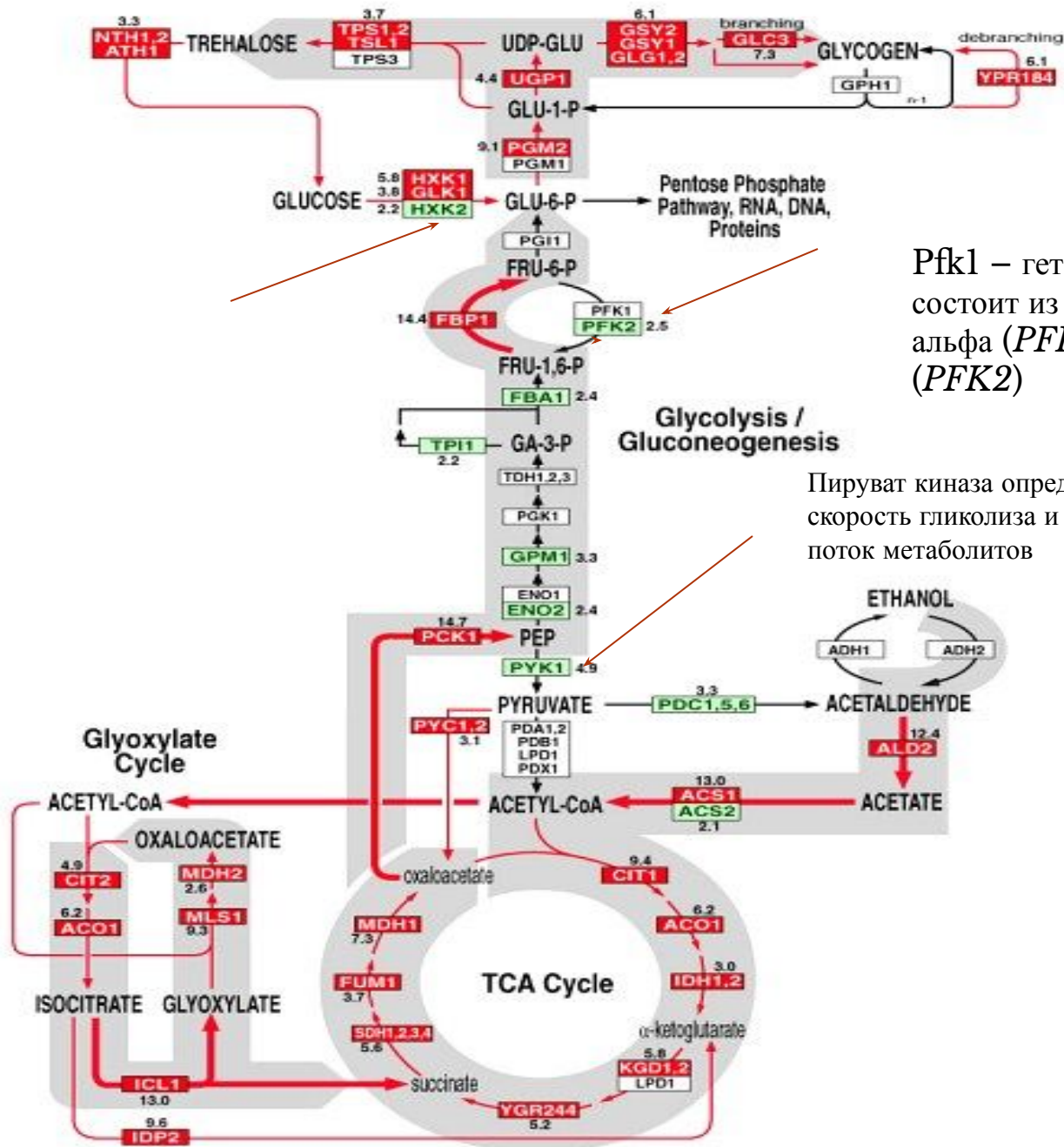
A



Роль белка-активатора Gcr1 в координации гликолиза и процессов трансляции и клеточного цикла

5'-СТТСС-3'
гомомер

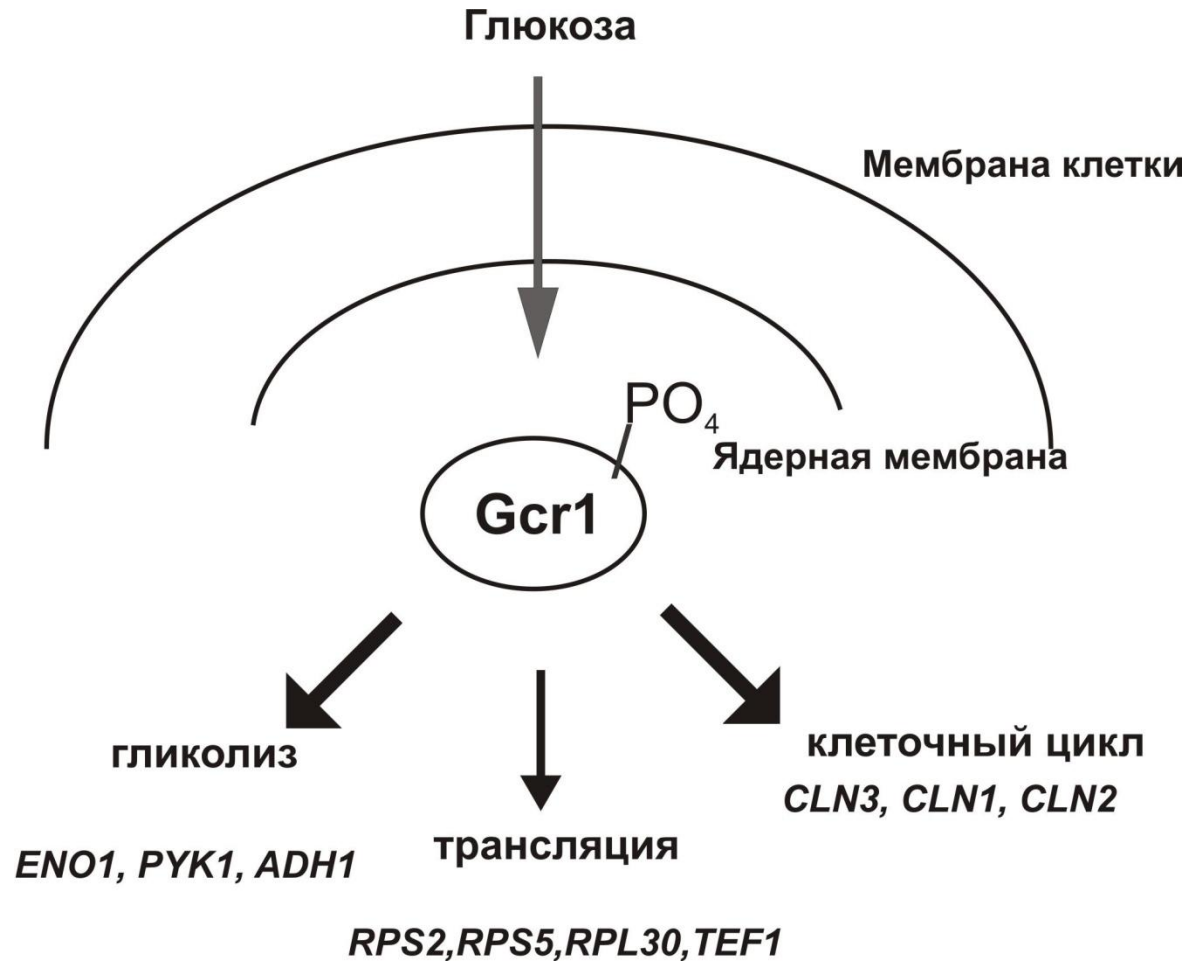




Pfk1 – гетерооктамер, состоит из субъединиц альфа (*PFK1*) и бета (*PFK2*)

Пируват киназа определяет скорость гликолиза и направляет поток метаболитов

Роль белка-активатора Gcr1 в координации гликолиза и процессов трансляции и клеточного цикла

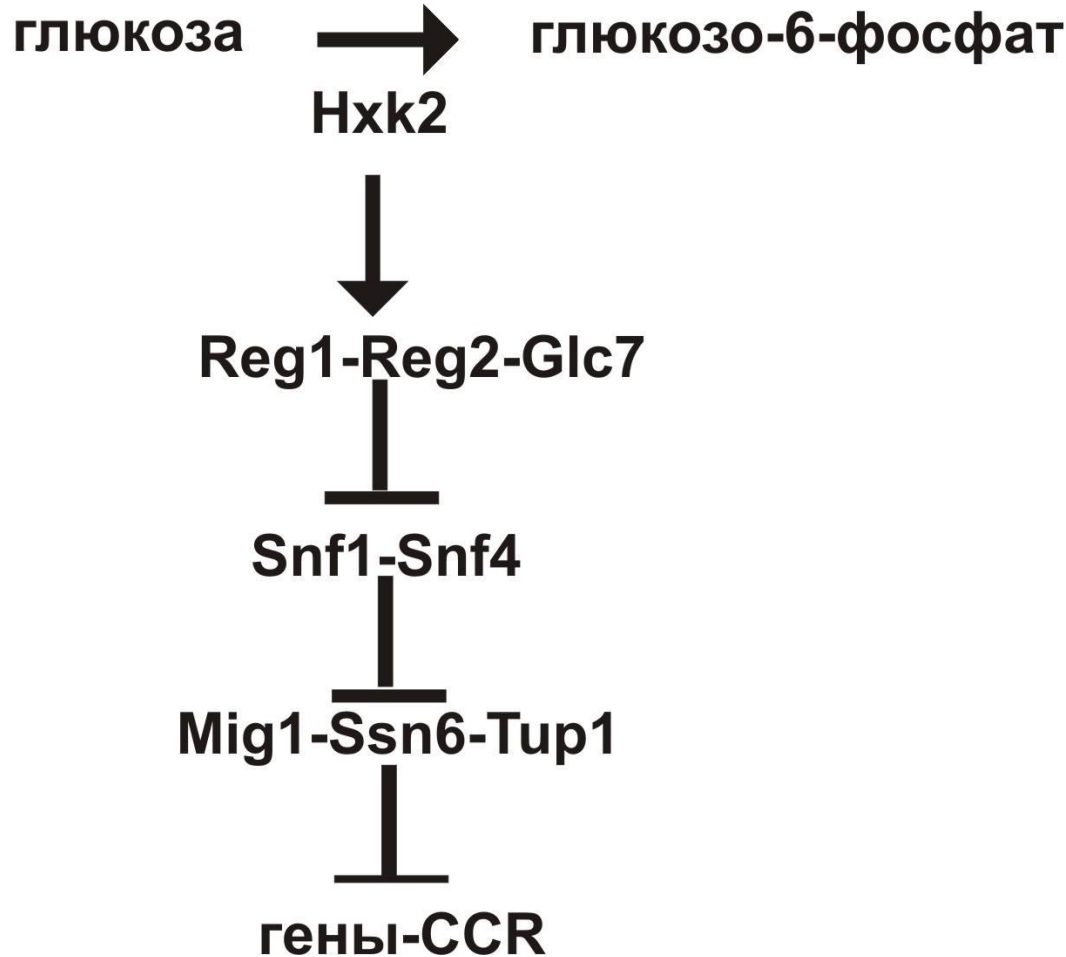


Глюкозная катаболитная репрессия

Уровни регуляции ГКР- чувствительных ферментов

1. Транскрипция
2. Трансляция (изменение скорости трансляции – Adr1p; изменение стабильности иРНК - стабильность иРНК MAL63 – с 25 минут до 6 минут.
3. Протеолитическая деградация – добавление глюкозы в среду приводит к быстрому фосфорилированию и деградации некоторых ферментов, например фруктозо-1,6-дифосфатазы.

Глюкозная катаболитная репрессия (Carbon Catabolite Repression)



Для поиска генов, контролирующих CCR, отбирали мутантов, не чувствительных к глюкозной репрессии, а также мутантов не способных к индукции при отсутствии глюкозы в среде/

Reg1-Reg2-Glc7 – комплекс протеинфосфатаз

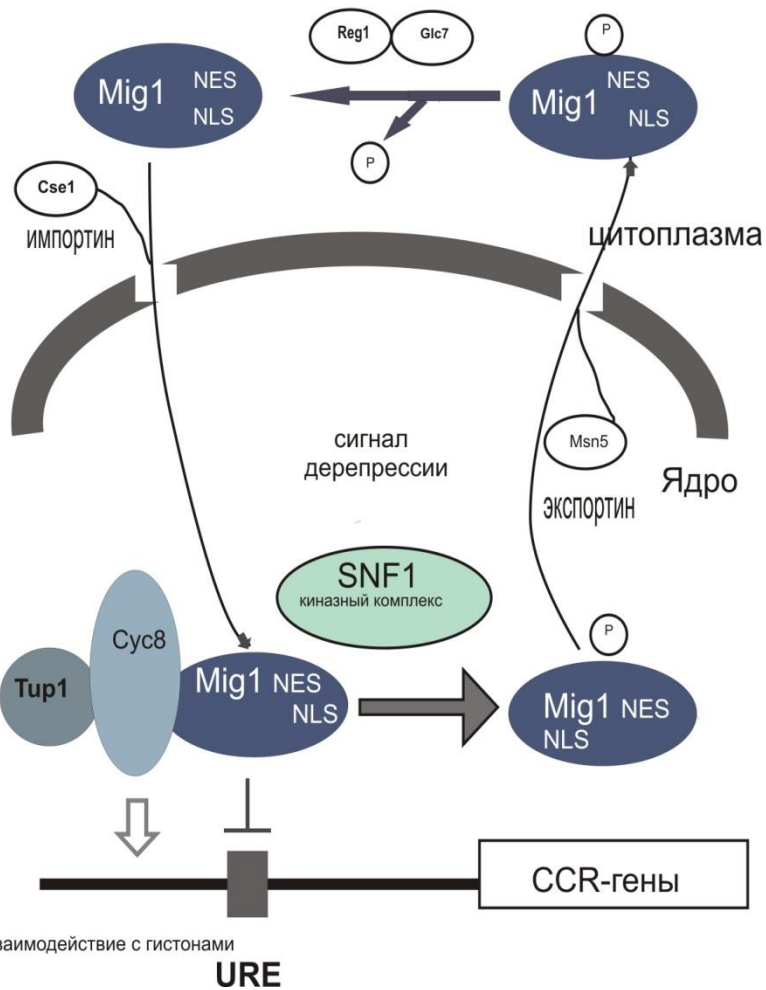
Snf1-Snf4 = комплекс киназы SNF1

Mig1 – Ssn6-Tup1 – комплекс репрессора

Репрессор Mig1

- *MIG1* - кодирует белок, репрессор генов ГКР .
- Мутации в этом гене являются супрессорами мутаций *snf1* и *snf4*.
- Белок Mig1p имеет цинксодержащий домен C_2P_2 и связывается с последовательностью ДНК «GC-бокс»-(G/C)₂(C/T)GGGG
- Гибридный белок LexA-Mig1 регулирует экспрессию репортерных генов, находящихся под контролем нескольких Lex –операторов, в зависимости от концентрации глюкозы. При росте на глюкозе их транскрипция репрессирована, снижение концентрации глюкозы приводит к ослаблению репрессии, а на среде с галактозой репрессии нет.
- Mig1p фосфорилируется протеинкиназой Snf1p. В штаммах, содержащих мутацию *snf1*, гены ГКР репрессированы даже на среде без глюкозы.
- В то же время, по-видимому, Snf1p является не единственной киназой, которая фосфорилирует Mig1p (Schuller, 2003).
- Mig1p привлекает к промоторам репрессивный комплекс Tup1p-Cyc8 (Ssn6) и, тем самым, блокирует транскрипцию

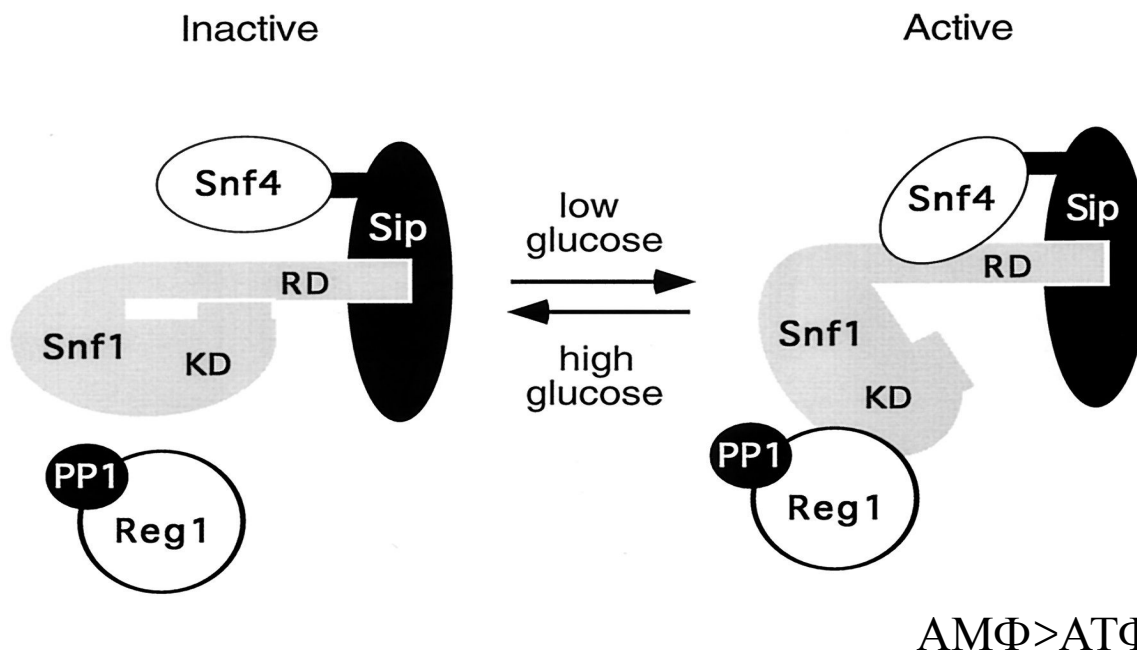
Сигнал репрессии



Модель регуляции активности репрессора Mig1 в зависимости от наличия глюкозы в среде (Schuller, 2003)

NLS – (nuclear localization sequence) последовательность, обеспечивающая ядерную локализацию,
NES – (nuclear export sequence) последовательность, необходимая для экспорта белка из ядра

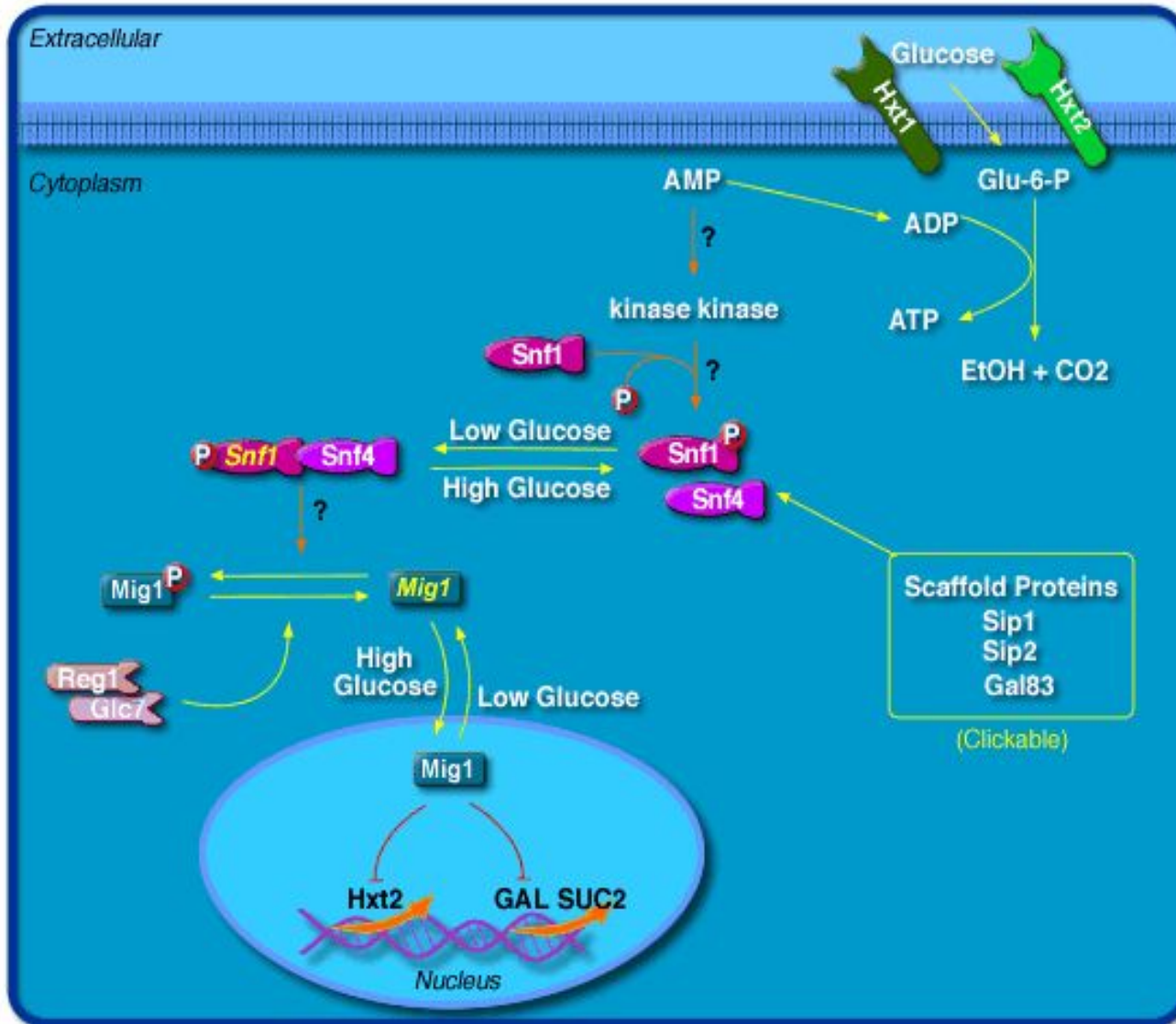
Регуляция активности комплекса SNF1



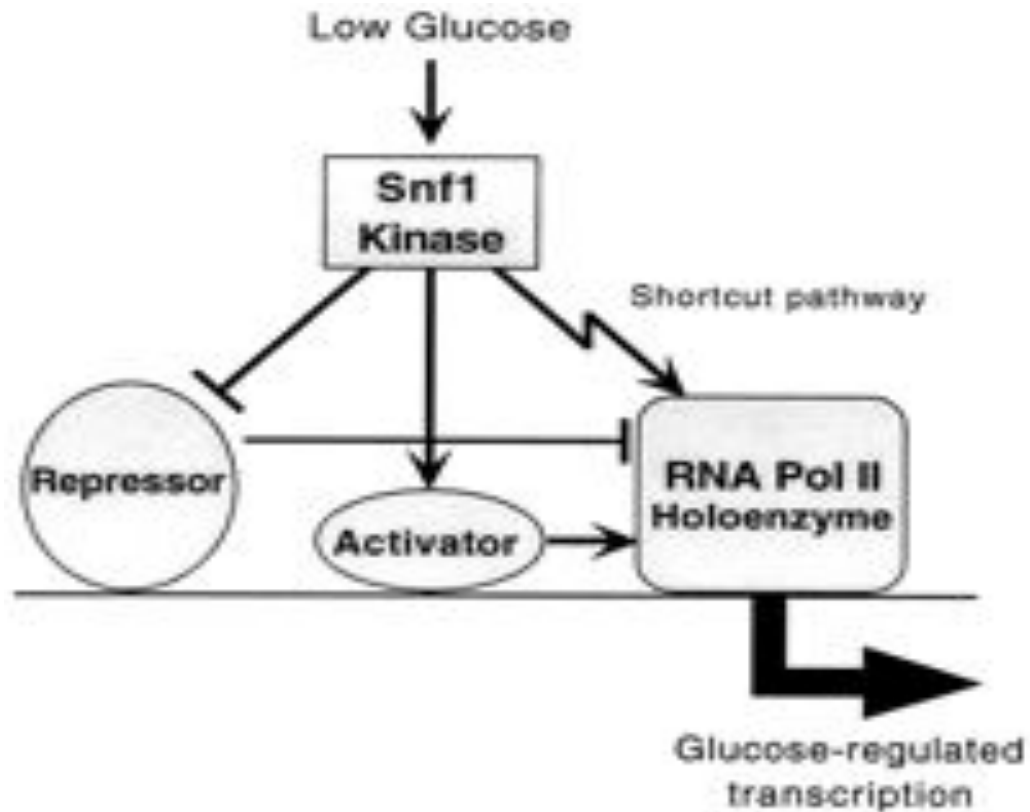
Snf1 – каталитическая субъединица (альфа)

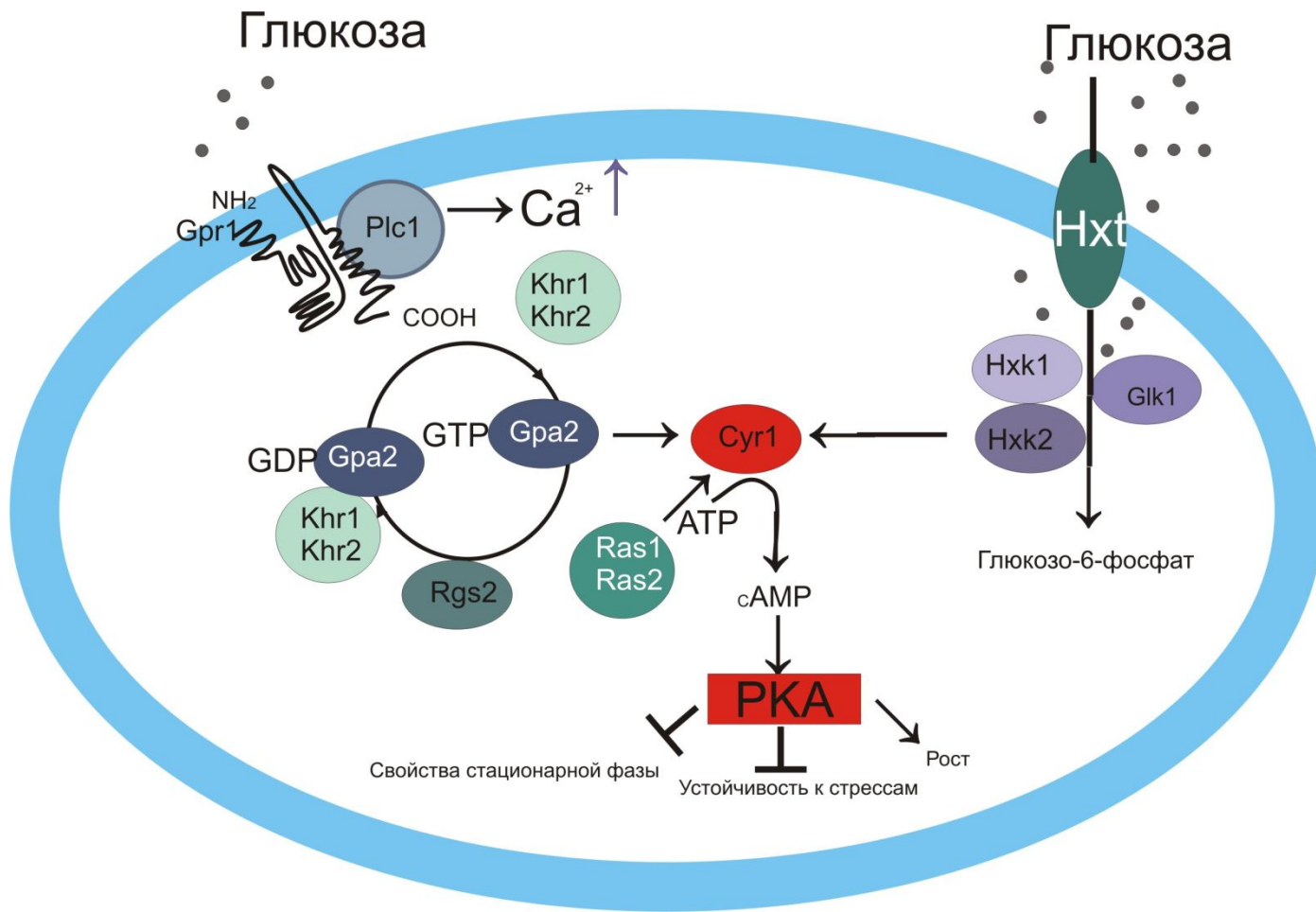
Sip1, Sip2, Gal83 (бета-субъединицы) – необходима для распознавания субстратов киназы

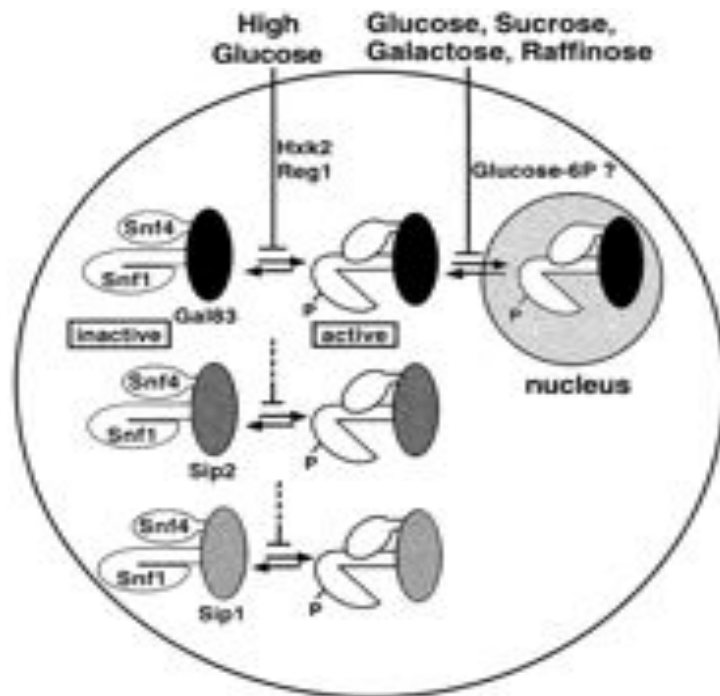
Snf4 – (гамма субъединица) – связывается с производными аденозина, сигнал для прекращения автоингибирования (AMФ:ATФ)

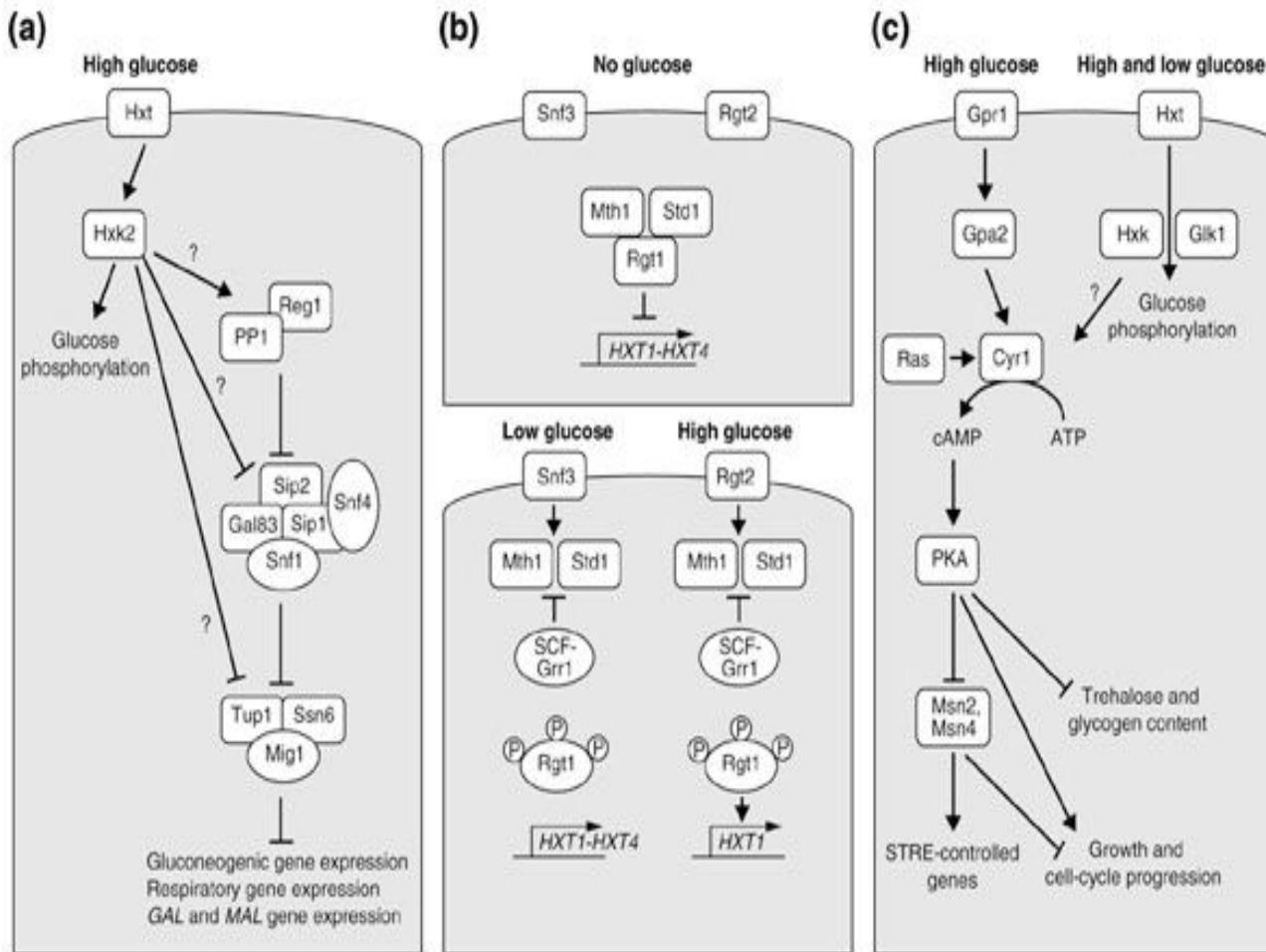


Роль Snf1 в активации генов, регулируемых CCR



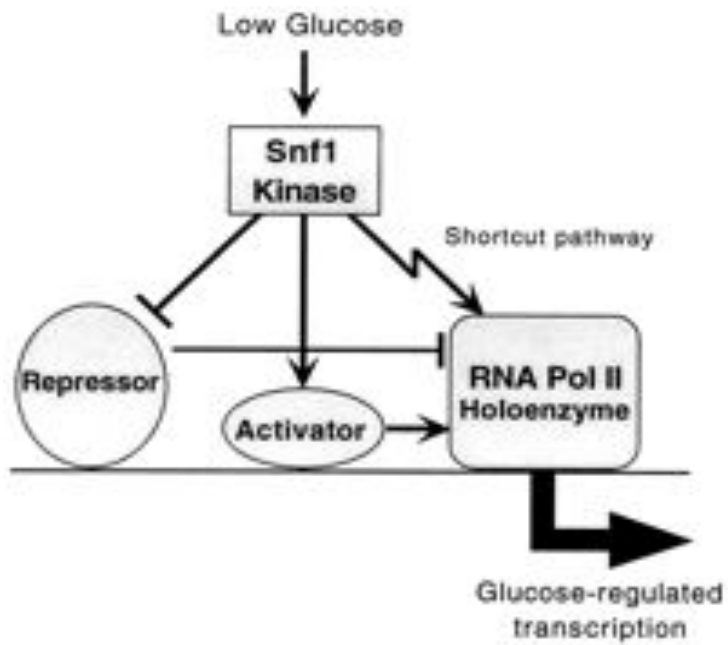


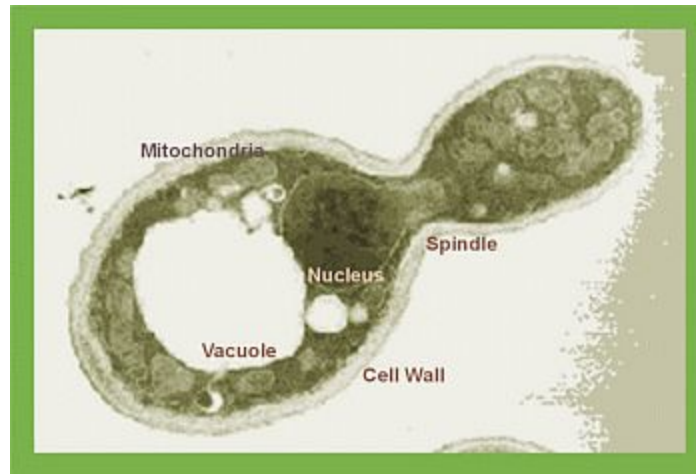


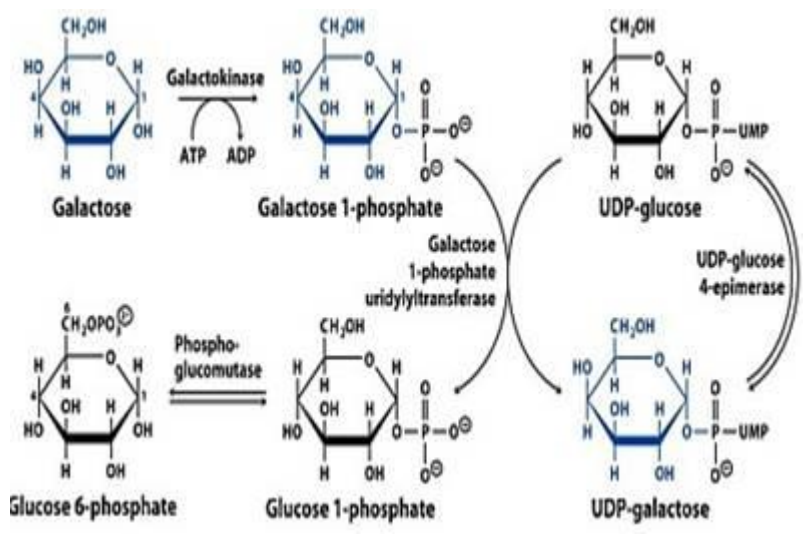
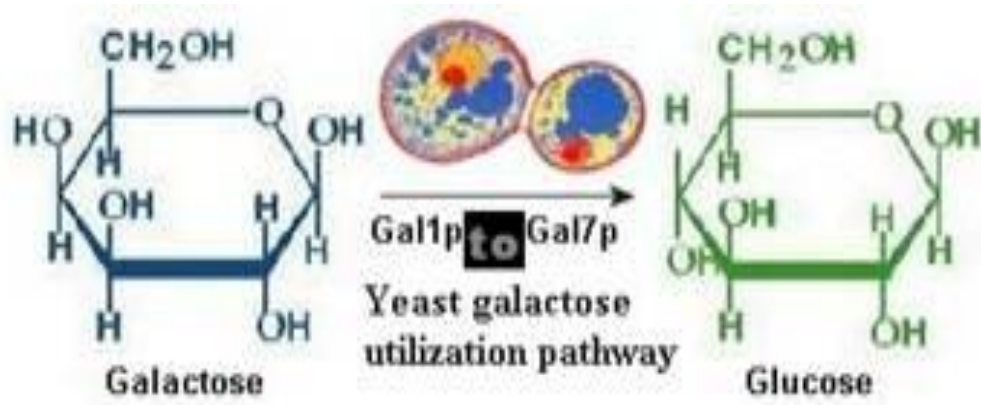


A simplified schematic representation of the three well-characterized glucose-response pathways in *S. cerevisiae*. (a) The main glucose repression pathway. In response to high glucose concentrations, the complex containing the Snf1 kinase inhibits the Mig1 repressor-containing complex and thus represses genes involved in respiration, gluconeogenesis and the metabolism of alternative carbon sources, such as galactose (*GAL* genes) and maltose (*MAL* genes). Protein phosphatase type 1 (PP1) acts in a complex with Reg1 to down-regulate Snf1 in low-glucose conditions. Glucose phosphorylation by Hxk2 is required for this pathway, but the step at which it acts is not known. (b) The Snf3/Rgt2 glucose-sensing pathway. In the absence of glucose, Rgt1 acts in a complex with Std1 and Mth1 as a transcriptional repressor of the *HXT1-HXT4* genes. When glucose is present, the transcription factor Rgt1 is inactivated through SCF-Grr1-mediated inactivation and degradation of Mth1 and Std1, and hyperphosphorylation by an unknown kinase, resulting in dissociation of Rgt1 from the *HXT* promoters. Snf3 triggers the induction of *HXT1-HXT4* in response to low glucose concentrations. High glucose concentrations further enhance *HXT1* expression through Rgt2 in a process that involves conversion of Rgt1 into a transcriptional activator. (c) The Gpr1/Gpa2 glucose-sensing pathway. High glucose concentrations activate cAMP synthesis by the adenylate cyclase Cyr1 (which is dependent on Ras) through the Gpr1/Gpa2 G-protein-coupled receptor system in a glucose-phosphorylation-dependent manner. The resulting activation of protein kinase A (PKA) affects a wide variety of target genes involved in, for example, carbon metabolism and stress resistance. Some of these effects are mediated by the Msn2 and Msn4



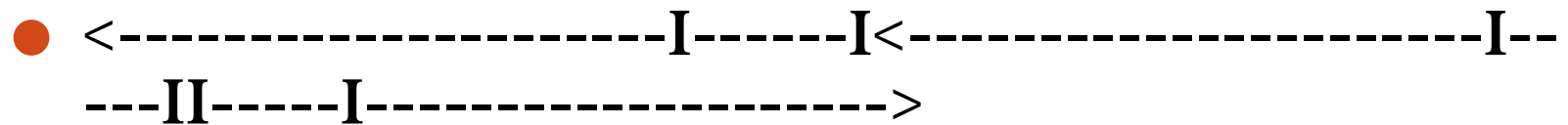


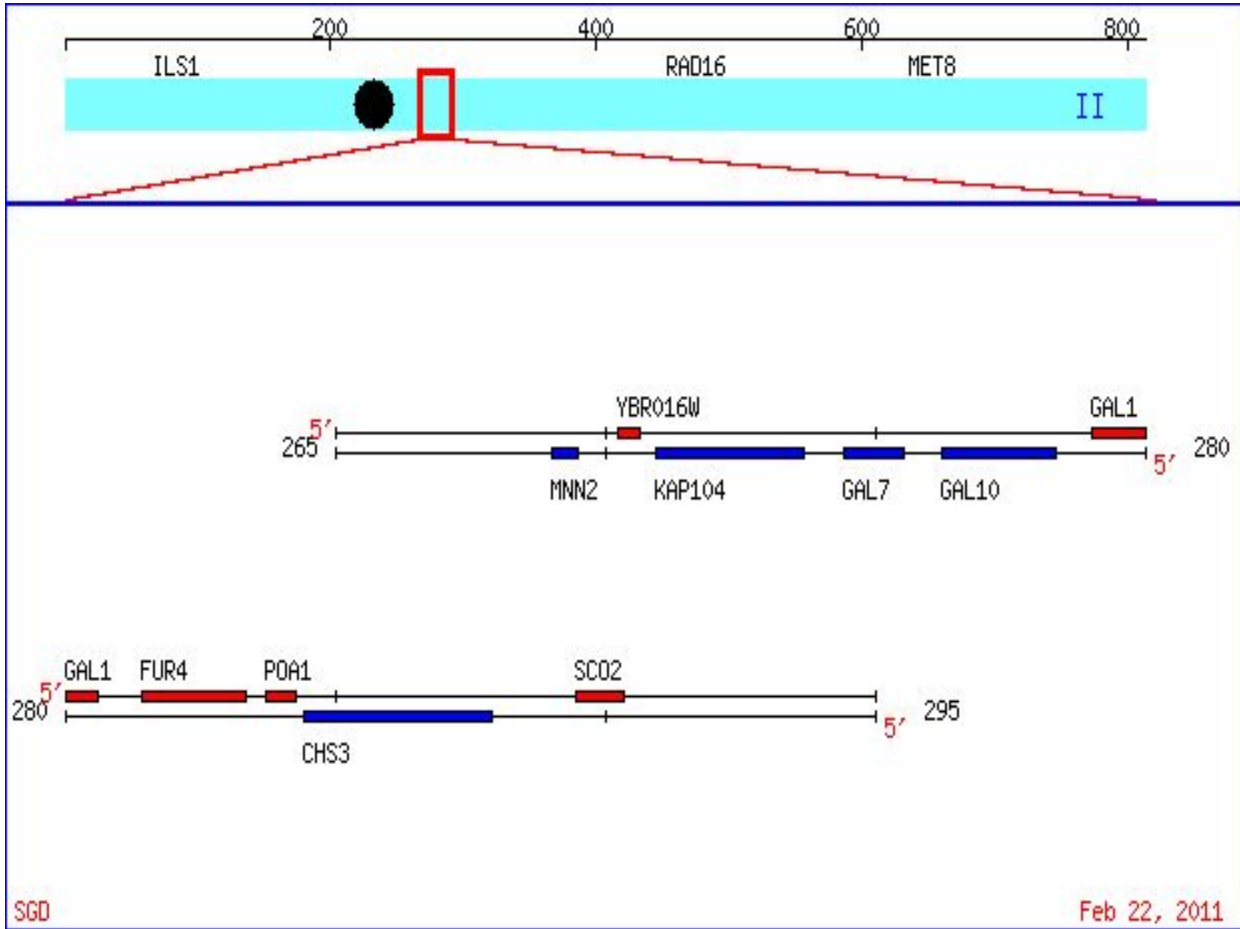




Galactose transport= Gal 2p,
 Galactose to galactose1-p = Galactose kinase,(GAL 1)
 Galactose1-p to UDP-Glucose= GAL-UDP transferase (Gal 10)
 UDP Glucose is converted to Glucose 1-p by epimerase (GAL7)
 Glucose1-p is converted to Glucose6-p by GAL5-p.

- GAL 1, GAL 7, GAL 10 - Chr. II
- Регуляторы: GAL4 - Chr. XVI,
- GAL80 - Chr. XIII
- GAL3 - Chr. IV
- Регуляторные белки регулируют более 22 генов





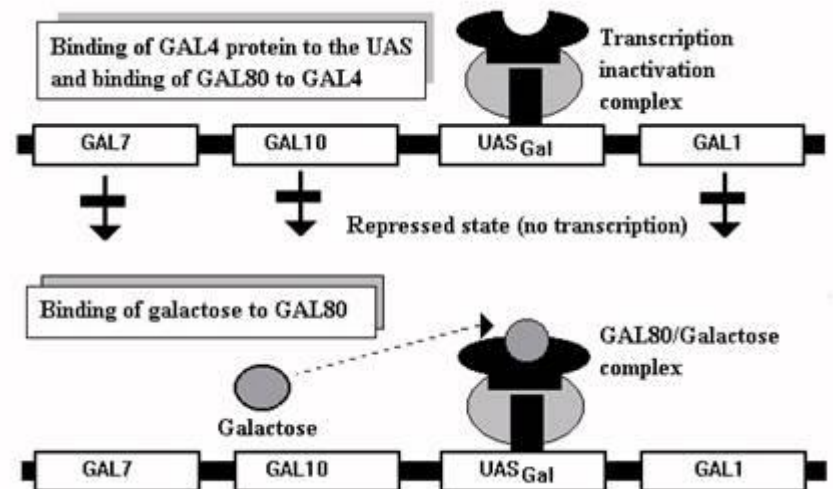
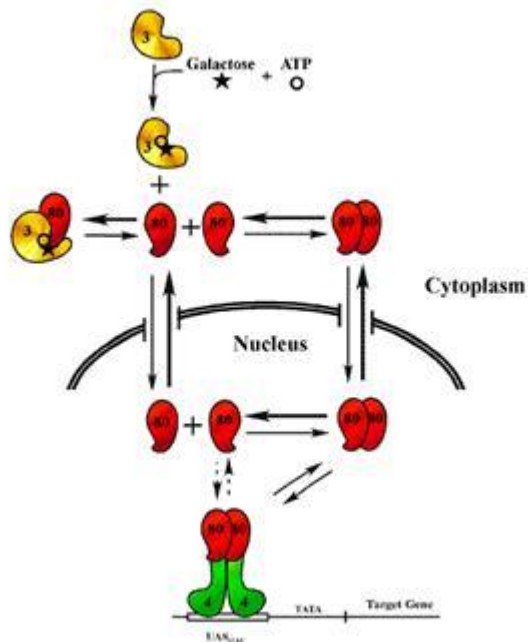
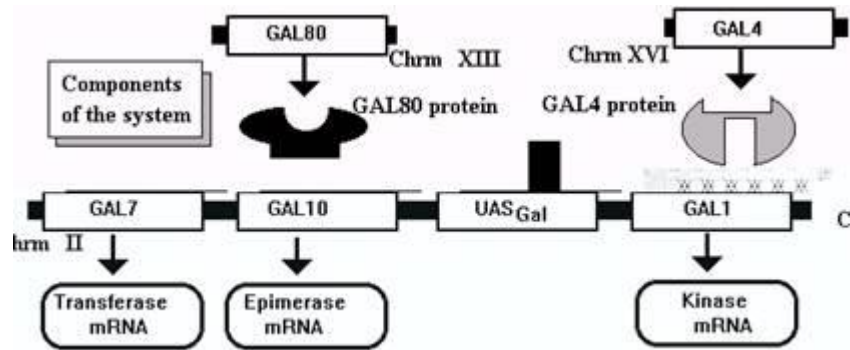
-
- **GAL1 promoter elements:**
-
-

-----UAS1-UAS2-UAS3-UAS4----URS-----TAT
A---InR---DPE

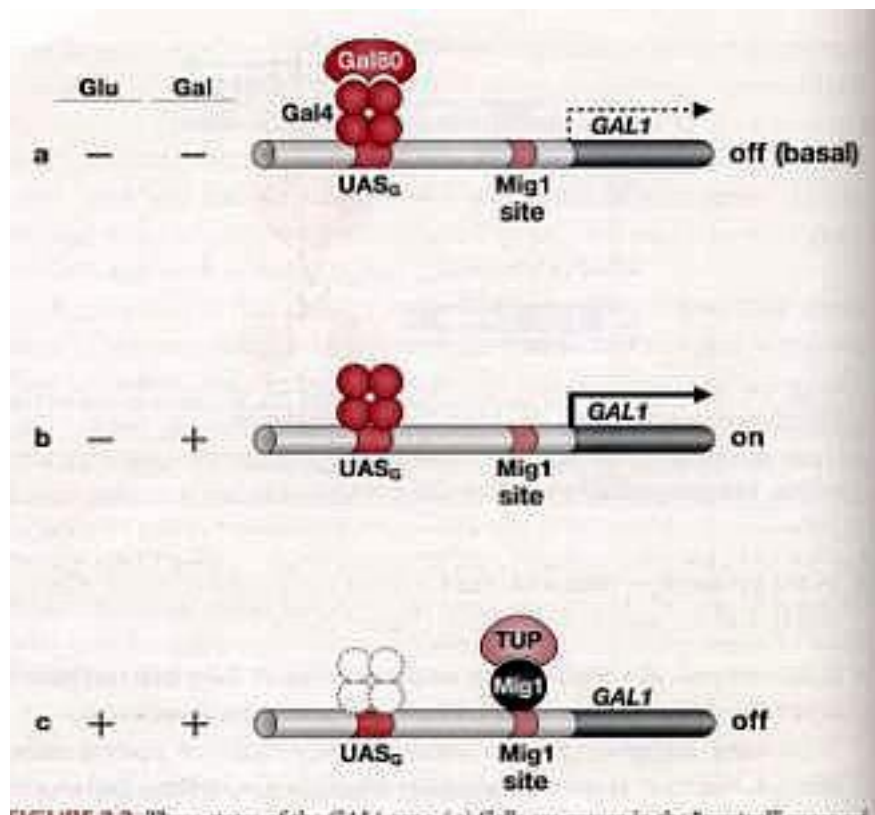
-
- **GAL4 gene promoter elements:**
-

-----UAS-----UES-----urs(Mig)-----
-----+1>-----DPE---

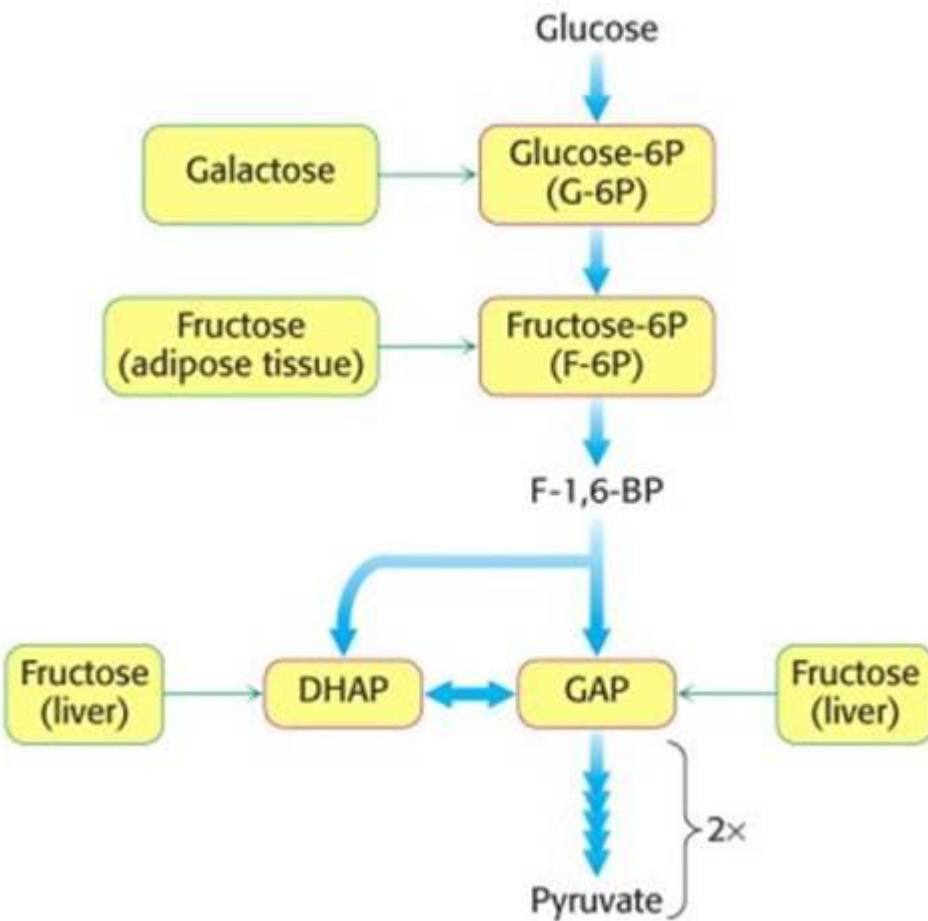
-
- **UAS = Upstream activator sequences,**
- **URS = Upstream regulator / repressor sequences,**



Механизм глюкозной репрессии



73 In the presence of glucose the GAL1 gene is blocked Mig1 which binds to Tup.



Galactose transport= Gal 2p,
 Galactose to galactose1-p =
 Galactose kinase,(GAL 1)
 Galactose1-p to UDP-Glucose=
 GAL-UDP transferase (Gal 10)
 UDP Glucose is converted to
 Glucose 1-p by epimerase (GAL4)
 Glucose1-p is converted to
 Glucose6-p by GAL5-p.

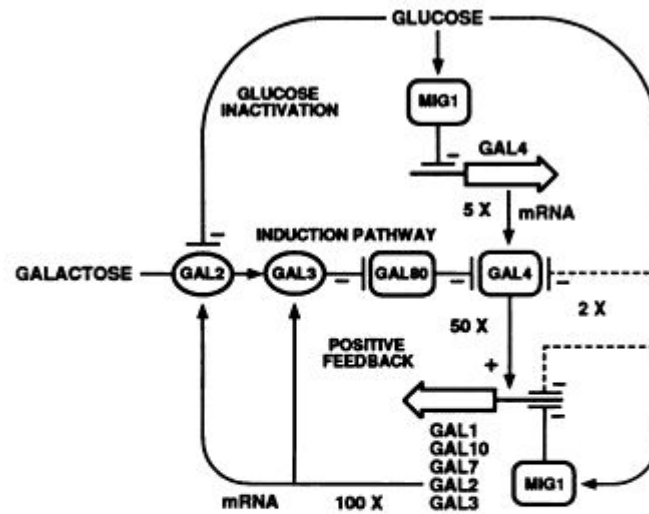
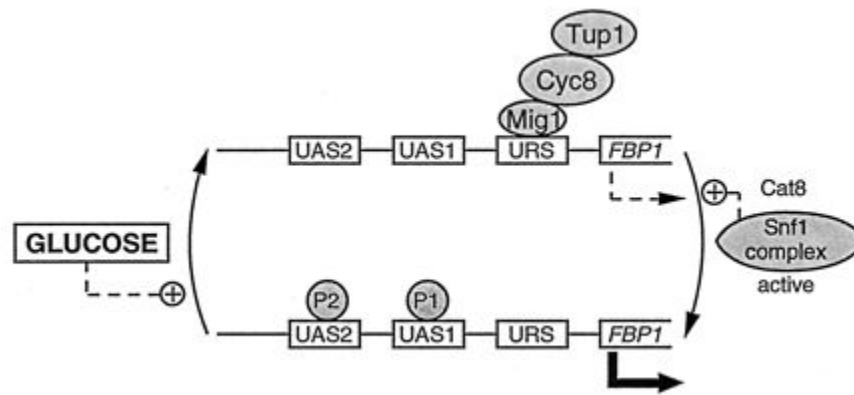
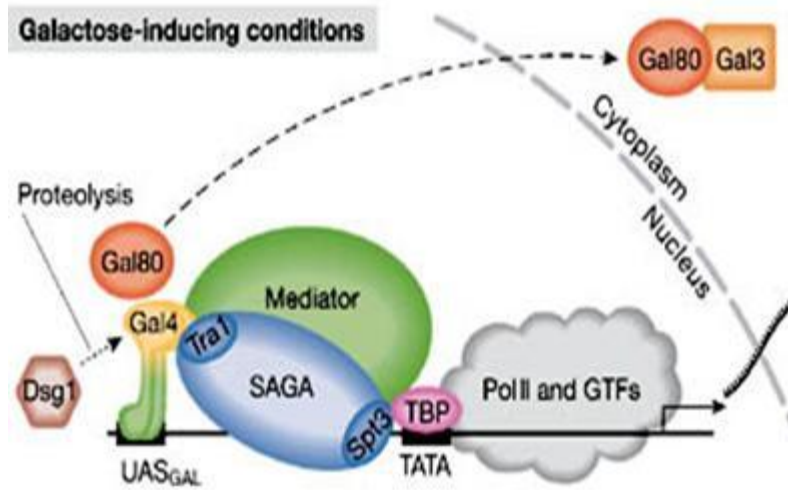
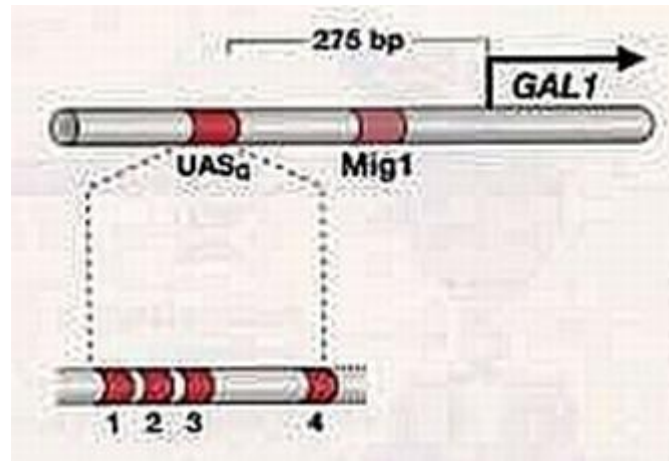


Fig. 5. Model for glucose repression of the *GAL* genes. The numbers shown refer to the effect of glucose at various levels of regulation. Thus, *GAL4* is repressed 5-fold by MIG1 in the presence of glucose. The MIG1/*GAL4* signal is amplified by a *GAL80*-dependent mechanism that involves down-regulation of the induction pathway. Together, *MIG1* and *GAL80* account for a 50-fold repression of *GAL1*. An ~2-fold repression of the *GAL* genes is independent of both *MIG1* and *GAL80*, and may reflect the action of other pathways (dashed lines). The final result is a 100-fold repression of the *GAL* genes by glucose.





- Upstream UAS is ~ 118bp long, consists of 17bp long GAL4 binding sites



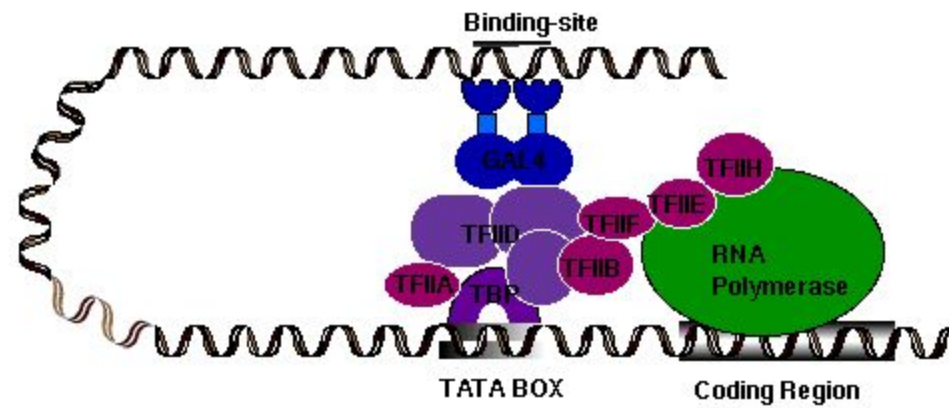
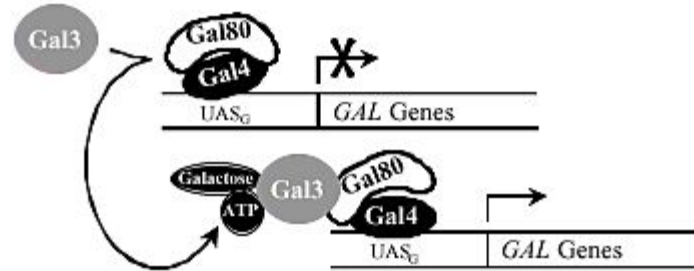
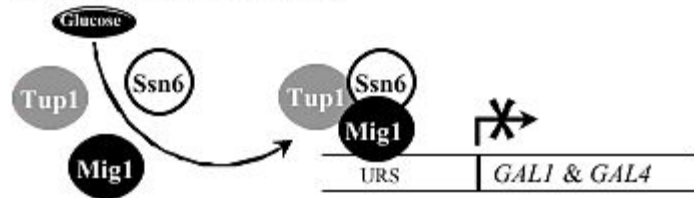


Figure 2.2. Schematic representation of Gal4 transcriptional complex.

Galactose induction

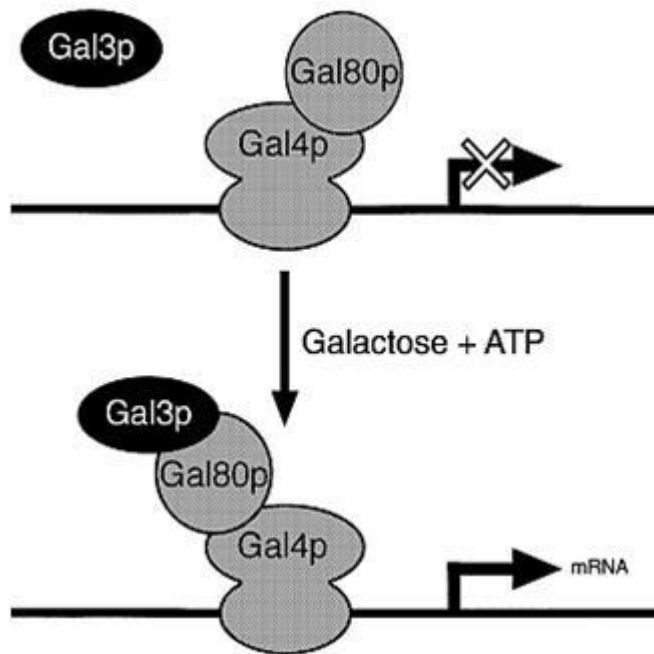


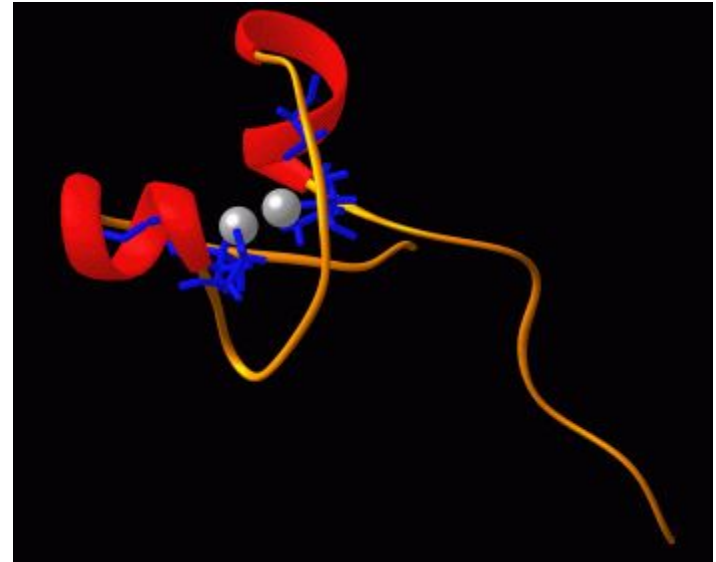
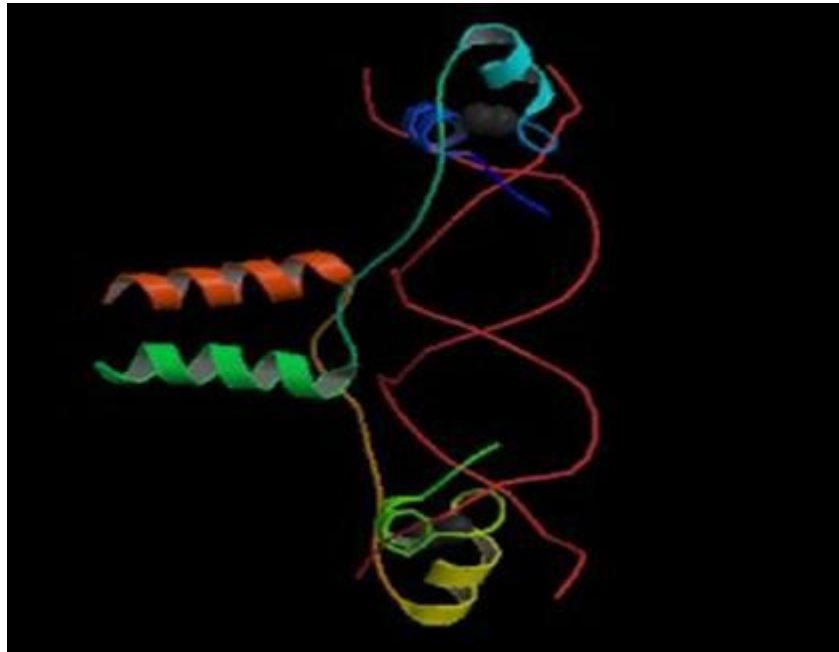
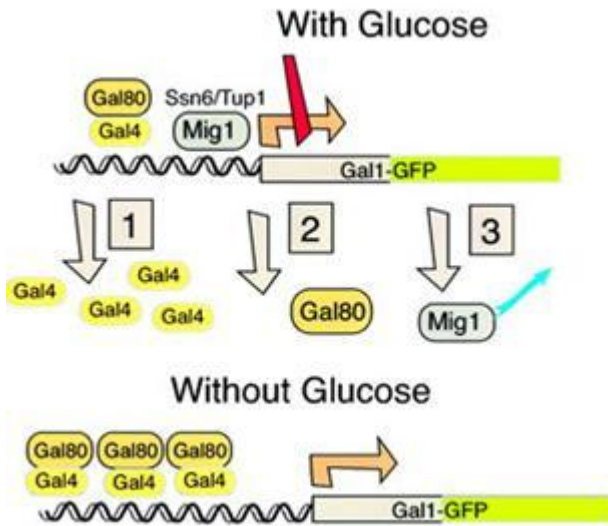
Glucose repression



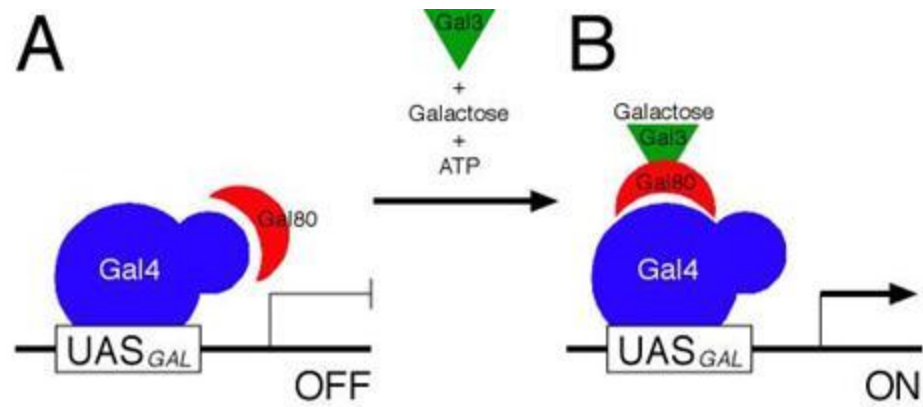
Gal6-mediated control

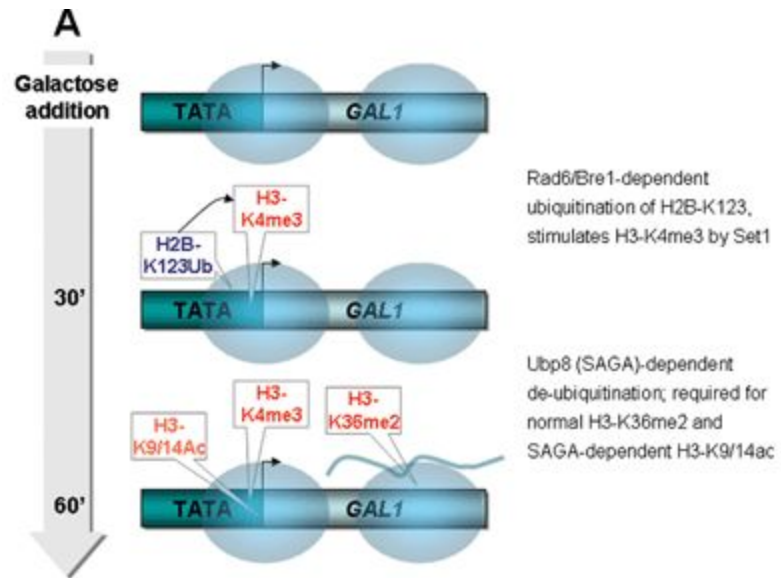






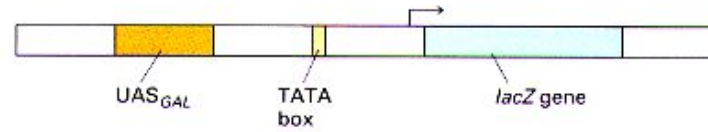
GAL protein dimmers bound to to their dyad UAS sequences



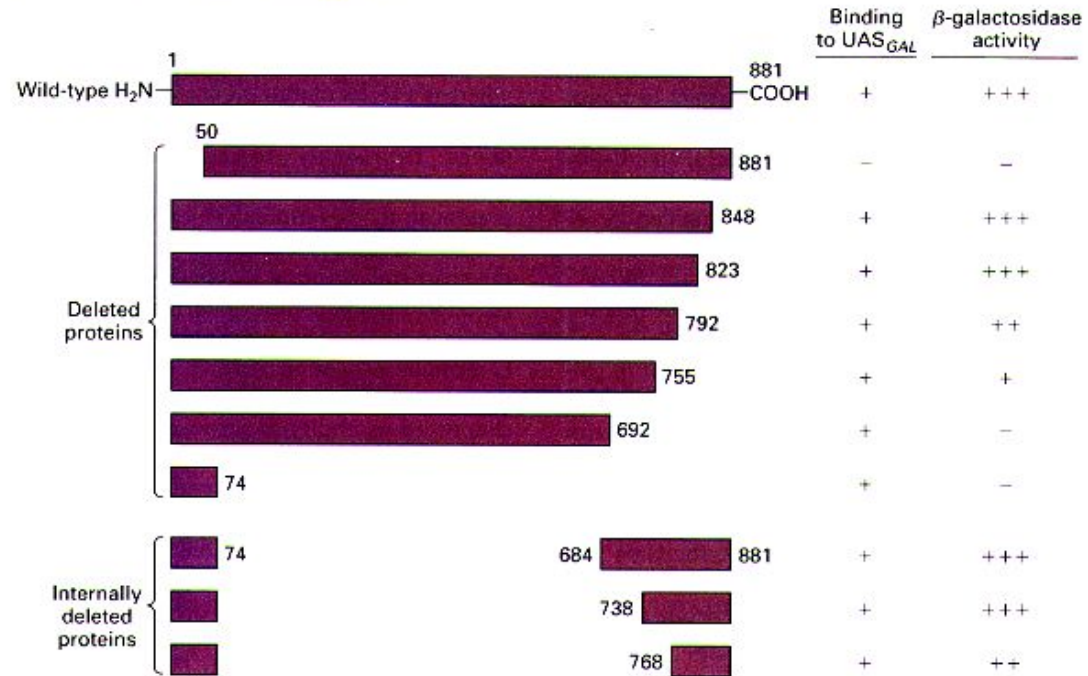


GAL4 protein functional domains

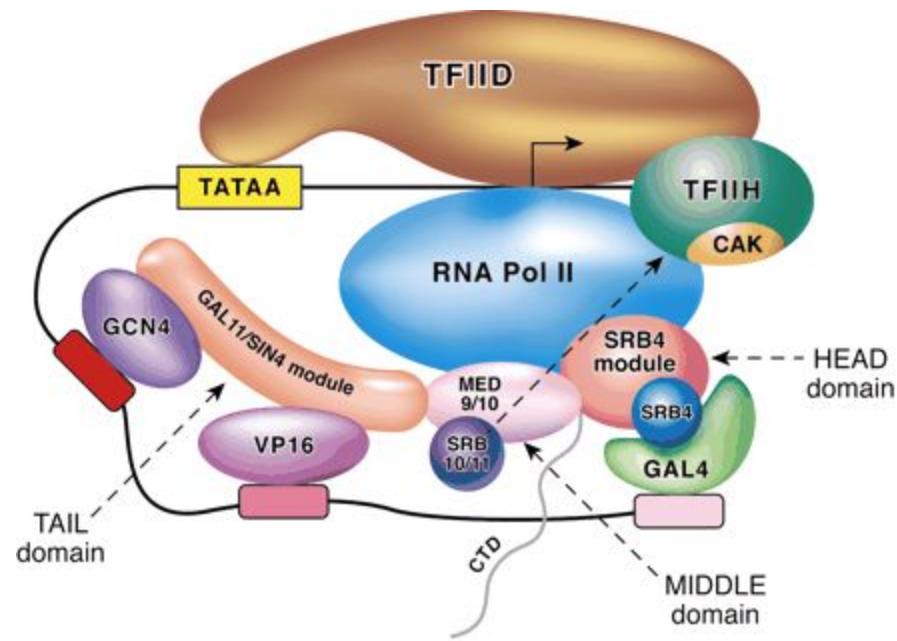
(a) Reporter-gene construct



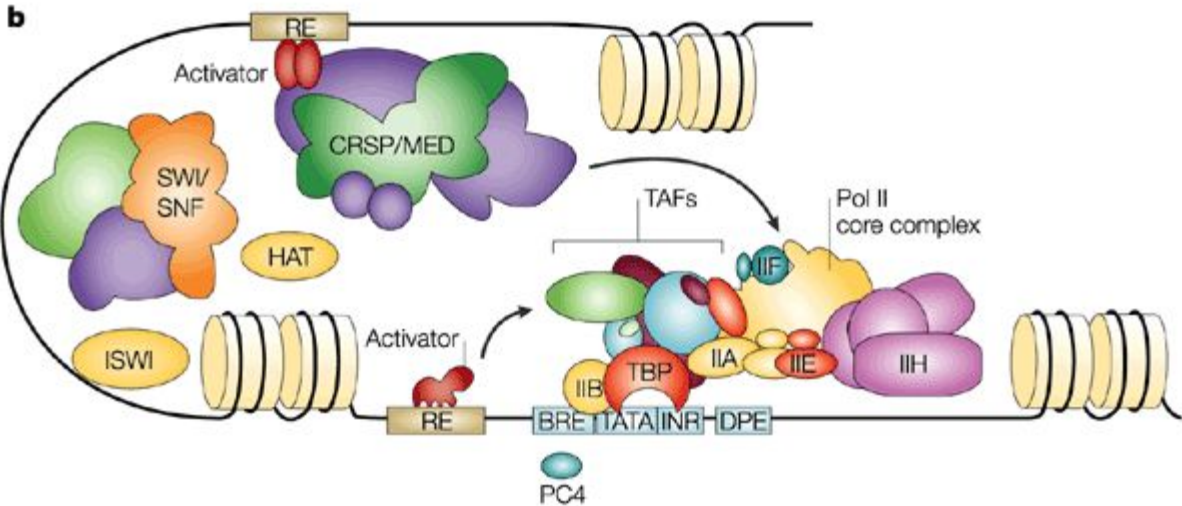
(b) Wild-type and mutant Gal4 proteins



promoter region and activates the genes.

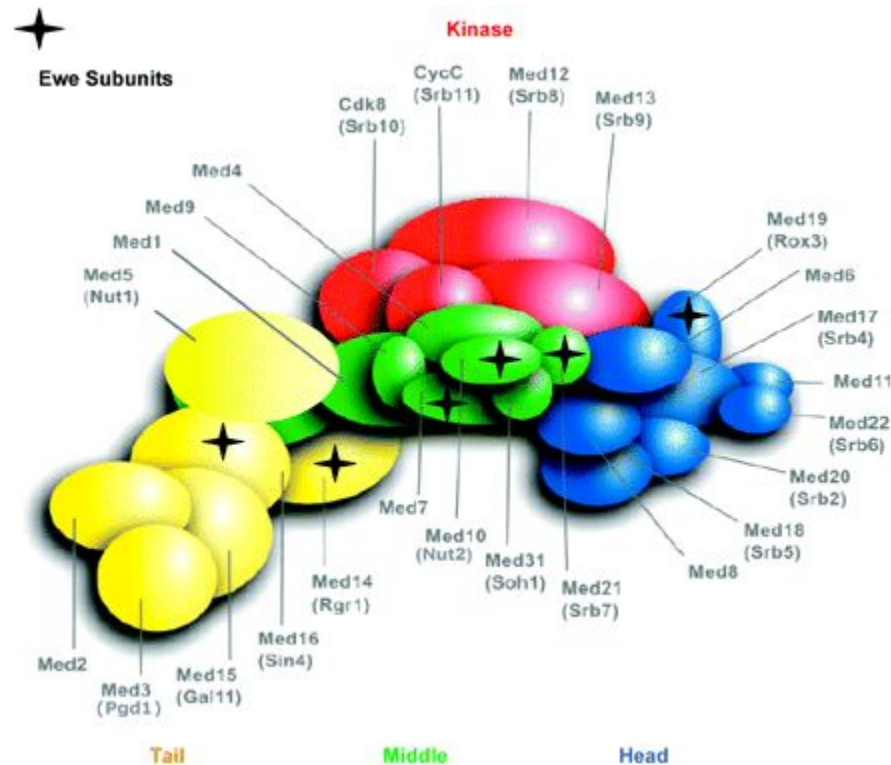


This is a grand diagram showing various components of promoter elements and the assembly of all transcriptional components.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

There are 254 mediator complex subunits; they are organized into head, middle and tail complexes



Glucose-Responsive Regulators of Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae* Function at the Nuclear Periphery via a Reverse Recruitment Mechanism

**Nayan J. Sarma, Terry M. Haley, Kellie E. Barbara, Thomas D. Buford,
Kristine A. Willis and George M. Santangelo¹**

Department of Biological Sciences, University of Southern Mississippi, Hattiesburg, Mississippi 39406

Manuscript received November 27, 2006

Accepted for publication January 4, 2007

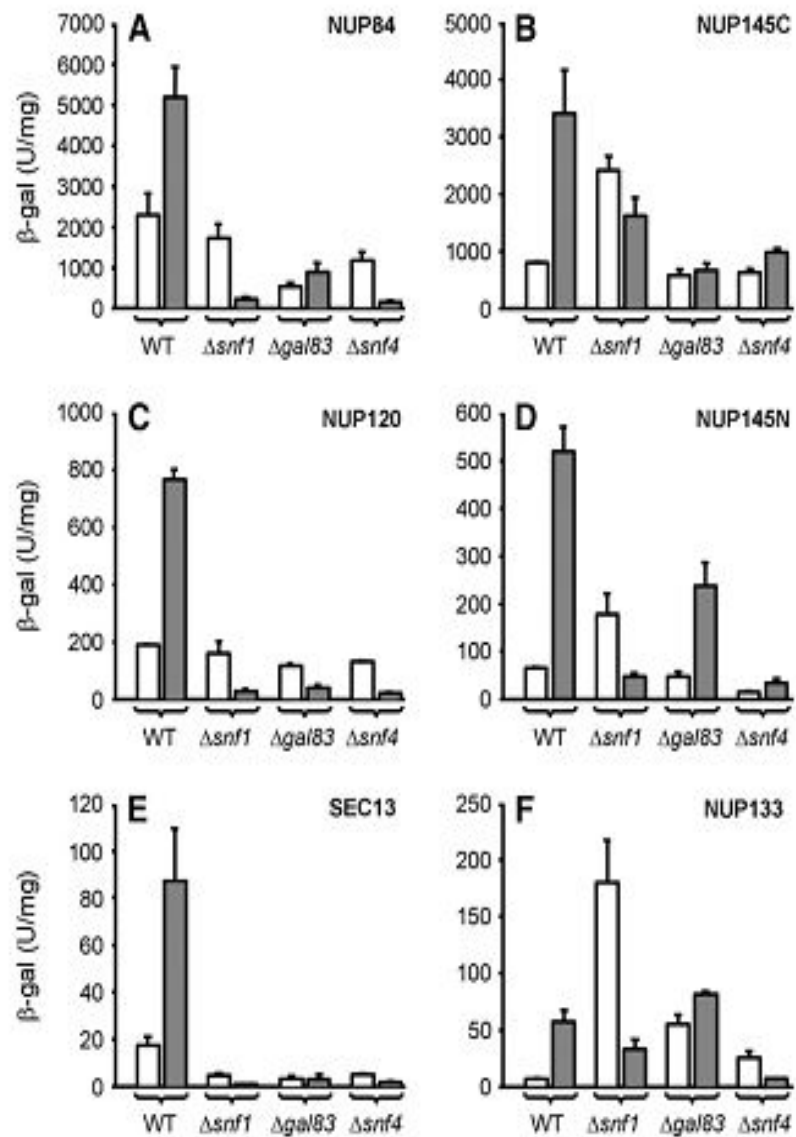


FIGURE 1.—Derepression of nucleoporin-mediated transcription requires the Snf1 kinase complex. Wild type (WT), $\Delta snf1$, $\Delta gal83$, and $\Delta snf4$ strains containing a chromosomally integrated *lexA*-driven reporter gene were transformed with nucleoporin-*lexA* fusion genes as described previously and assayed for β -galactosidase activity after growth in either the presence (open bars, repression) or the absence (shaded bars, derepression) of glucose. Each of the nucleoporin-*lexA* fusion genes tested in this assay was expressed at normal levels, *i.e.*, was driven by its native promoter. *LexA* fusion genes are (A) *NUP84*, (B) *NUP145C*, (C) *NUP120*, (D) *NUP145N*, (E) *SEC13*, and (F) *NUP133*. Error bars represent the standard deviation of four independent determinations. Reporter expression driven by control proteins, which included *Ste12-lexA* and *Gcn4-lexA* chimeras, was similar in the presence or absence of Snf1 kinase subunits.

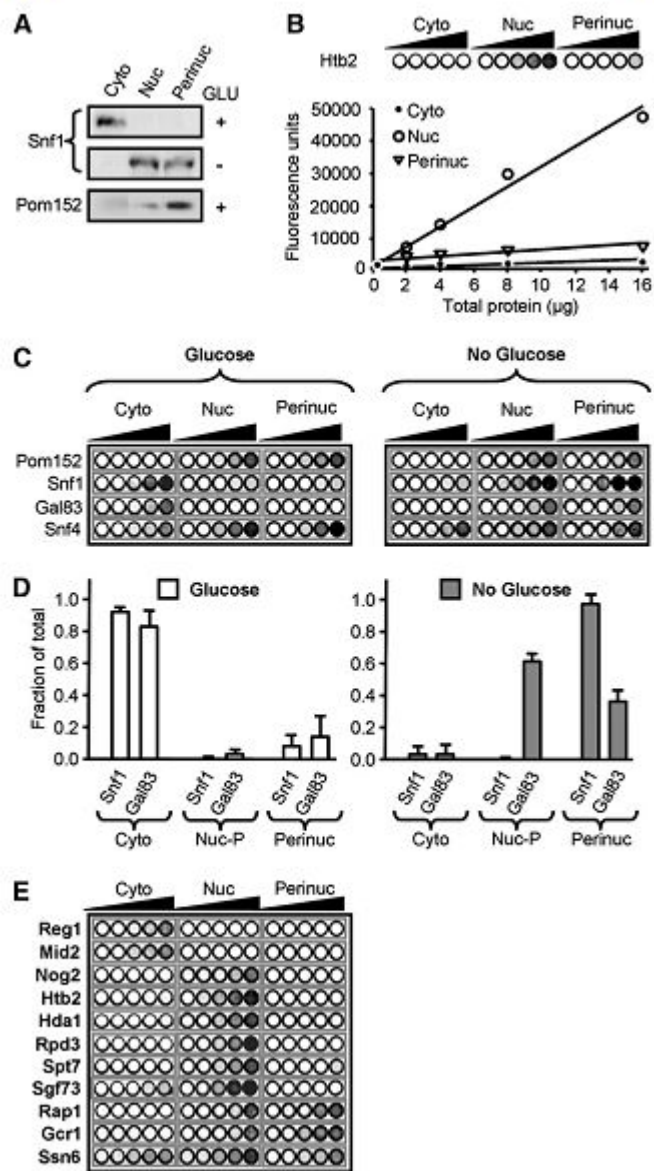
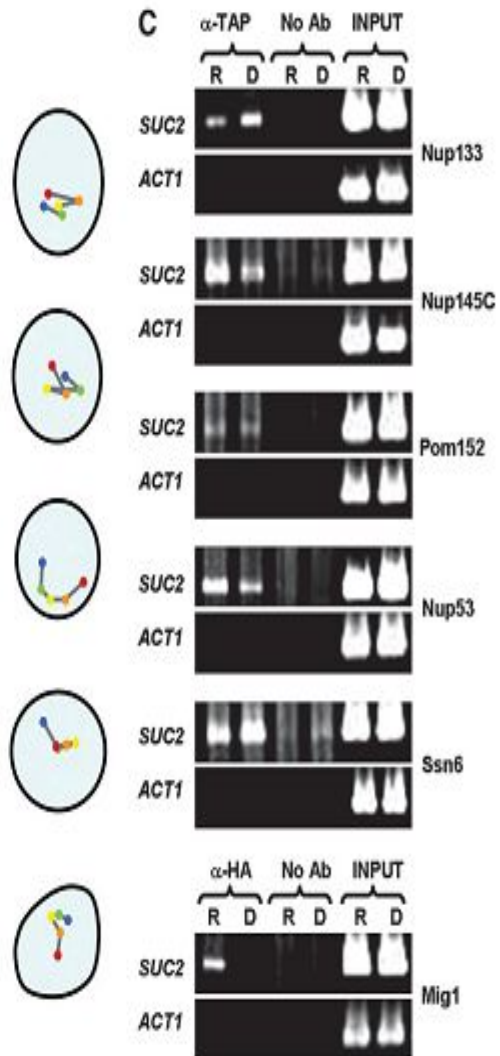
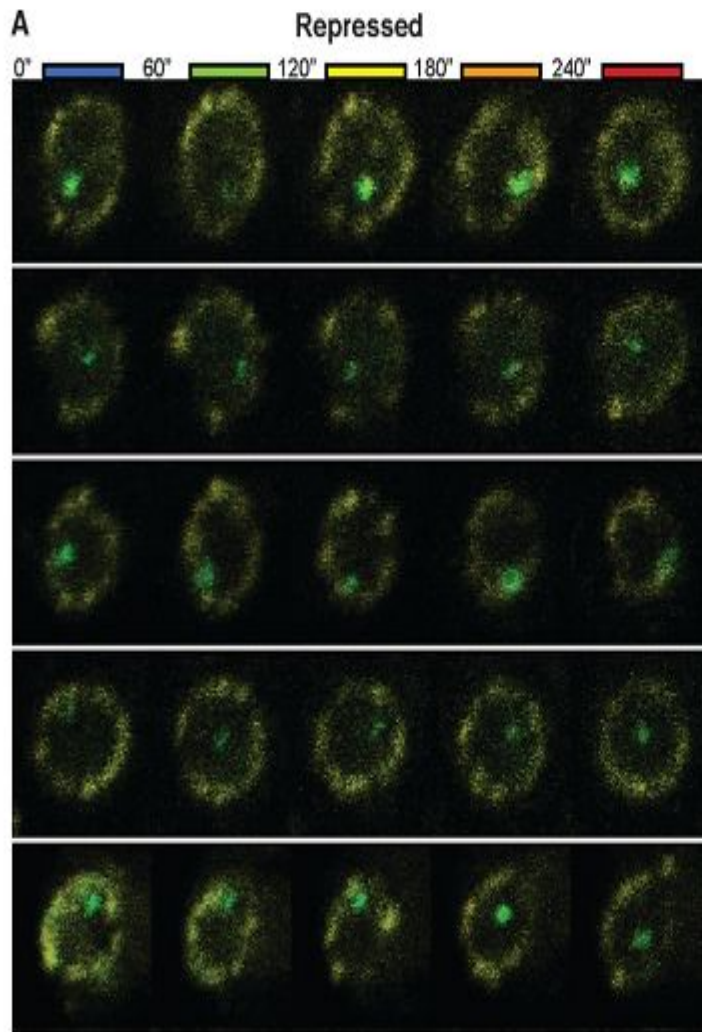


FIGURE 2.—The active Snf1 kinase complex cofractionates with perinuclear components. Cyto, cytoplasmic fraction; Nuc, combined nucleoplasmic/perinuclear fraction; Perinuc, perinuclear fraction; Glu or Glucose, extracts from glucose-grown cells. (A) (Top and middle) Western blot of Snf1; (bottom) Western blot of Pom152. (B) Quantitative fluorescent protein detection (QFPD) assay. Increasing amounts of total protein from indicated fractions containing H2B-GFP were loaded into microtiter wells (circles, left to right), and fluorescence was measured as described in MATERIALS AND METHODS; the graph shows the corresponding densitometric analysis. (C) QFPD analysis of Snf1-GFP, Snf4-GFP, and Gal83-GFP as in B above. (D) Densitometric analysis of the data shown in C. The fraction of total Snf1-GFP and Gal83-GFP fluorescence present in cytoplasmic (Cyto), nucleoplasmic (Nuc-P, total nuclear fluorescence minus perinuclear fluorescence), and perinuclear (Perinuc) fractions is represented. Open bars, glucose; shaded bars, no glucose. Error bars represent the standard error of the mean. (E) QFPD assay of nuclear proteins. Cytoplasmic Reg1 and Mid2, nucleolar Nog2, and perinuclear Rap1 and Gcr1 are shown as controls.



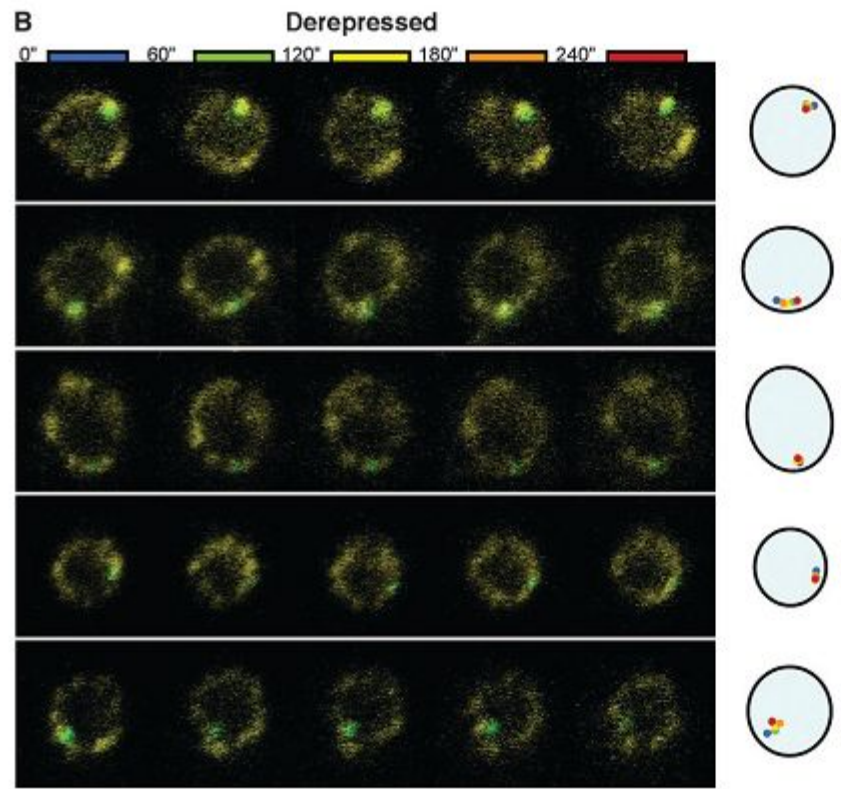


FIGURE 3.—*SUC2* exhibits carbon-source-dependent motility and associates with NPCs. Time-lapse analysis (4 min total) of the location of GFP-tagged *SUC2* in either (A) repressed or (B) derepressed cells is shown; the result for each of five different nuclei in either repressing or derepressing conditions is presented horizontally in temporal order from left to right. The cartoon on the right depicts the location of the gene within the nucleus at the time indicated, in seconds: 0 (blue), 60 (green), 120 (yellow), 180 (orange), and 240 (red). A YFP fusion to the essential NPC component Nsp1 marks the nuclear periphery. (C) ChIP analysis of association between *SUC2* and factors that represent different strata of the nuclear periphery. TAP-tagged Nup53 (NPC subunit),
 (Continued)

TABLE 2
**Increased *SUC2* expression correlates with increased
 localization of the gene to the nuclear periphery**

Genotype	<i>SUC2</i> expression ^a		% cells with peripheral <i>SUC2</i> ORF ^b	
	<i>R</i> (glucose ^c)	<i>D</i> (no glucose ^c)	<i>R</i> (glucose ^c)	<i>D</i> (no glucose ^c)
<i>WT</i>	2.6 ± 0.2	267.2 ± 31.3	45	74
$\Delta mig1$	52.8 ± 8.8	148.4 ± 1.8	60*	69
$\Delta hxx2$	65.4 ± 8.2	164.1 ± 36.6	60**	72

^a *SUC2* expression was measured with invertase assays as described in NEIGEBORN and CARLSON (1984). Error denotes the standard deviation of four determinations.

^b Percentage of cells where the *SUC2* ORF is localized to the outer third of the nucleus. *P*-values, calculated on the basis of a two-tailed Student's *t*-test, represent a significant difference in the localization of the ORF in glucose-grown *WT* cells relative to glucose-grown $\Delta mig1$ or $\Delta hxx2$ cells. *Significant ($P < 0.01$); **highly significant ($P < 0.0005$). At least 115 cells were measured for each condition.

^c See MATERIALS AND METHODS for growth conditions.

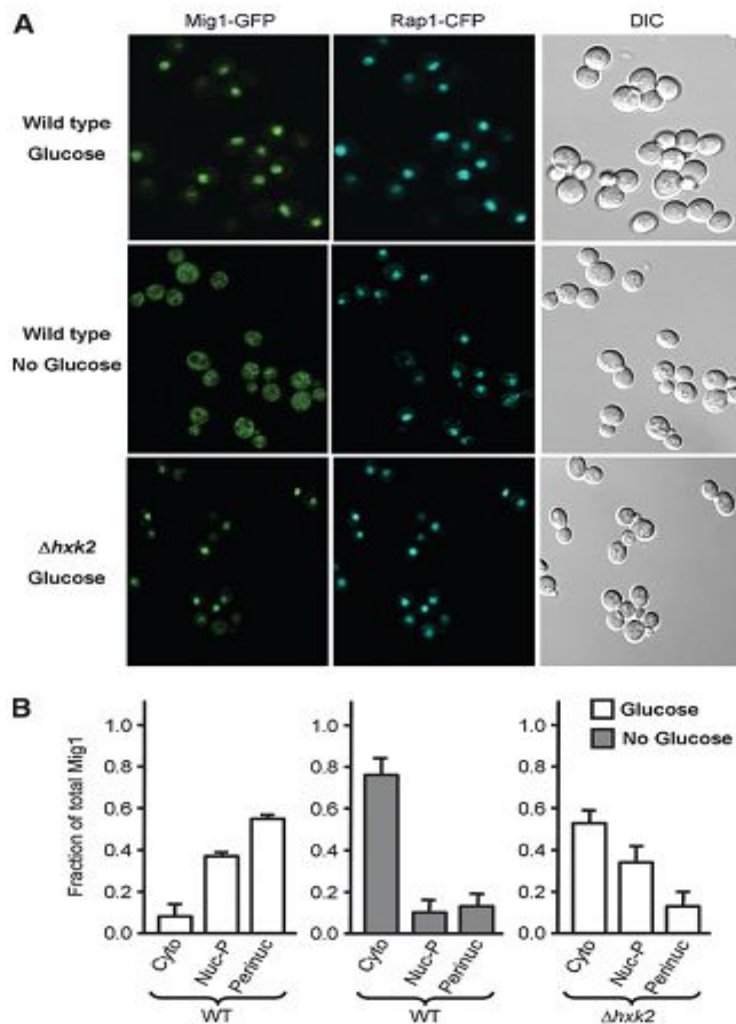


FIGURE 4.—Perinuclear localization is required for repression by Mig1. (A) Confocal laser scanning microscopy of Mig1-GFP in wild-type or $\Delta hxk2$ cells grown in either the presence or the absence of glucose, as indicated; coexpressed Rap1-CFP is shown as a nuclear marker. GFP and CFP signals were captured by using a Zeiss LSM 510 META confocal laser scanning microscope with a 63 \times Plan-Apochromat 1.4 NA oil DIC objective lens. Signals were separated with a 490-nm dichroic mirror with long pass filters adjusted to 505 and 475 nm, respectively. Pinholes were adjusted to obtain <1.8- μ m optical slices. Images were acquired with the Zeiss LSM 510 software version 3.2. (B) Graphs show the fraction of total Mig1 fluorescence present in cytoplasmic (Cyto), nucleoplasmic (Nuc-P, total nuclear fluorescence minus perinuclear fluorescence), and perinuclear (Perinuc) fractions, as determined by QFPD analysis. Open bars, glucose; shaded bars, no glucose. Error bars represent the standard error of the mean.

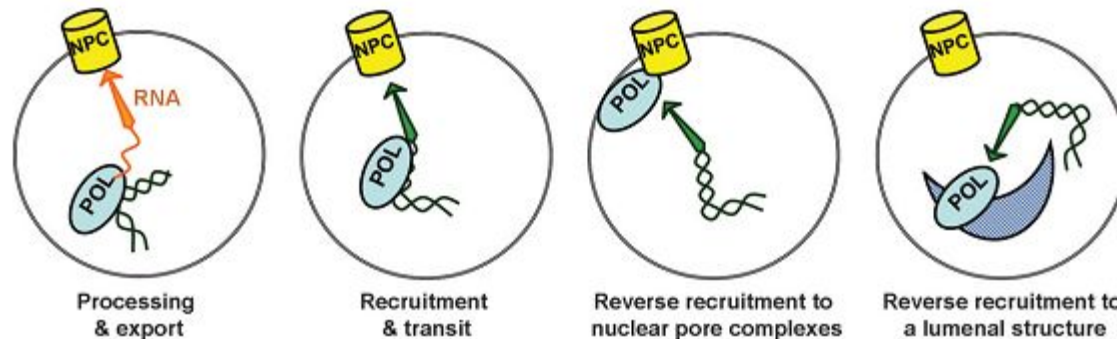


FIGURE 5.—Models for localization of induced genes to nuclear substructures. The relocation of active genes can be modeled in three distinct ways. (A) In the processing and export model, the transcript produced by active RNA polymerase II (POL) associates with a nuclear pore complex (NPC), resulting in the relocation of the active gene to the nuclear periphery. (B) Alternatively, an early event in transcriptional activation, such as promoter opening or initiation, triggers the relocation of a gene. (C) Finally, the movement of a gene may bring it into contact with a nuclear substructure, such as the NPC, where RNA polymerase II molecules are tethered. We refer to this model as reverse recruitment. The central concept of this model is that the promoter of a gene mediates both its movement to the periphery and its interaction with nuclear substructures. (D) The reverse recruitment model can also be applied to luminal substructures. It is possible that there exist subsets of eukaryotic genes that are brought to the nuclear periphery via each of the models in A–D.

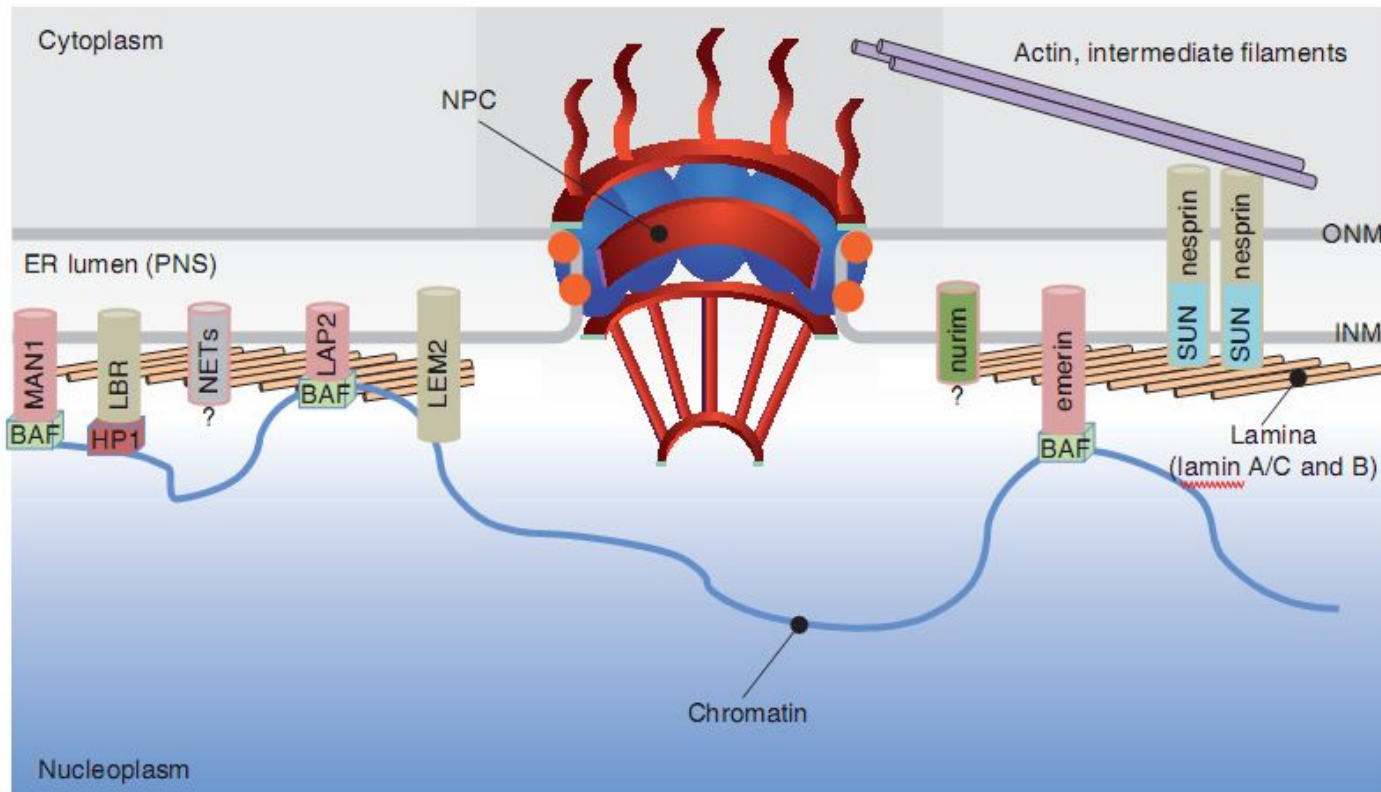


Figure 1. Topology of the NE. Inner and outer nuclear membranes (INM and ONM, respectively) are separated by the ER lumen or perinuclear space (PNS). The nuclear lamina interacts with NE proteins and chromatin. INM proteins link the NE to chromatin and the lamina. ONM proteins provide a connection from the nucleus to the cytoskeleton. The lamin B receptor (LBR) interacts both with B-type lamins and chromatin-associated heterochromatin protein 1 (HP1) in conjunction with core histones. Members of the LEM (lamina-associated protein 2 [LAP2], emerin, MAN1)-domain family (pink) bind to lamins and interact with chromatin through barrier-to-autointegration factor (BAF). SUN proteins (SUN 1 and 2) interact with nesprins in the ONM, thereby forming so-called LINC complexes that establish connections to actin and intermediate filaments in the cytoplasm. Nurim is a multi-pass membrane protein with unknown function. Proteomic approaches have identified ~60 putative transmembrane proteins (NETs), most of which remain uncharacterized.