

**Untersuchungen zur Funktion der RNA Polymerase Untereinheit E'
und des Transkriptionsfaktors E**



Dissertation

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

vorgelegt von

Sebastian Grünberg

aus Limburg an der Lahn

Regensburg, im November 2007

Promotionsgesuch eingereicht: 13.11.2007

Diese Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. M. Thomm

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:

1. Gutachter und Prüfer:

2. Gutachter und Prüfer:

3. Prüfer:

Prof. Dr. R. Wirth

Prof. Dr. M. Thomm

Prof. Dr. H. Tschochner

Prof. Dr. R. Sterner

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
I Einleitung	5
1. Die RNA Polymerase von <i>Pyrococcus furiosus</i>	6
1.1 Der E'/F-Subkomplex	7
1.2 Die Untereinheit H	8
2. Der Transkriptionsfaktor B (TFB)	9
3. Der Transkriptionsfaktor E (TFE)	10
4. Die Initiation der Transkription	11
5. Der Übergang von der Initiation in die Elongation	13
II Material	15
1. Bezugsquellen von Proteinen und Chemikalien	15
1.1 Chemikalien	15
1.2 Enzyme und andere Protein	16
1.3 Verwendete Kits	16
2. Bakterien- und Archaeenstämmen	16
3. Plasmide	16
4. Oligonukleotide	17
III Methoden	18
1. Reinigung von Oligonukleotiden mittels PAGE	18
2. Reinigung der endogenen RNA Polymerase aus <i>Pyrococcus furiosus</i>	18
3. Immobilisierung von <i>gdh</i>-C Kassetten für <i>in vitro</i> Transkriptions- und KMnO₄-Footprinting-Experimente	19
4. <i>In vitro</i> Transkription an linearisierter Plasmid-DNA	19
5. <i>In vitro</i> Transkription an Heteroduplex <i>gdh</i>-Promotor-DNA	20
6. Immobilisierte <i>in vitro</i> Transkription	20
6.1 Pausierte Transkription an immobilisierten <i>gdh</i> -C Kassetten zur Herstellung von RNA-Markern	20
6.2 Immobilisierte <i>in vitro</i> Transkription pausierter ternärer Komplexe	21
7. Direkte Kaliumpermanganat (KMnO₄)-Footprints	21

7.1 Herstellung von Sequenzleitern der KMnO ₄ -Footprinting DNA-Matrizen	21
7.2 KMnO ₄ -Footprints von Initiationskomplexen	22
7.3 KMnO ₄ -Footprints von Initiationskomplexen und Elongationskomplexen.....	22
8. Bestimmung der Heparin-Stabilität offener Komplexe	23
9. Photochemisches Protein-DNA-Cross-Linking von Initiations- und pausierten Elongationskomplexen.....	23
9.1 Herstellung der immobilisierten Oligonukleotid-Matrize.....	23
9.2 Synthese linearer doppelsträngiger DNA mit einer spezifisch positionierten Phosphorothioat Modifikation und angrenzender radioaktiven Markierung	24
9.3 Derivatisierung Phosphorothioat-modifizierter DNA mit Azidophenazyl Bromid (APB)	24
9.4 Photochemisches DNA/Protein-Cross-Linking	25
9.5 Nuklease-Behandlung der Cross-Linking Reaktionen.....	25
10. Photochemisches DNA/Protein-Cross-Linking an Heteroduplex-DNA	26
10.1 Native endRNAP-Shifts	26
10.2 Photochemisches DNA-Protein-Cross-Linking von TFE und endRNAP an Heteroduplex-DNA	26
10.3 Transkription an photoaktivierbarer Heteroduplex-DNA-Matrize	26
11. Photochemisches DNA-Protein-Cross-Linking von TFE an einzelsträngiger DNA.....	27
IV Ergebnisse.....	28
1. Charakterisierung der stimulierenden Wirkung des E'/F-Heterodimers auf die Transkription des Core-Enzyms der RNA Polymerase bei niedrigen Temperaturen	28
1.1 Die Untereinheit E' stimuliert die Transkription bei niedrigen Reaktions- Temperaturen	28
1.2 Die stimulierende Wirkung von E' auf die Transkription basiert auf Vorgängen während der Initiation	29
1.3 TFE verstärkt die E' induzierte Aktivierung der Transkription.....	30
2. Die RNAP-Untereinheit E' und TFE stimulieren die Ausbildung des offenen Komplexes.....	33
3. TFE stabilisiert offene Komplexe.....	35
4. Sequenzanalyse von TFE	37

5. Wechselwirkungen von TFE mit Nukleinsäuren.....	39
5.1 TFE interagiert mit einzelsträngiger DNA.....	39
5.2 TFE bindet mit hoher Affinität an Heteroduplex-DNA-Bereiche	40
6. TFE stimuliert die Bildung kurzer, abortiver RNA-Produkte	41
7. TFE erhöht die Wiederaufnahme-Effizienz der Transkription von pausierten Elongationskomplexen.....	43
8. TFE stabilisiert die Transkriptionsblase von pausierten ternären Komplexen.....	45
9. TFE ist Teil des Elongationskomplexes.....	47
9.1 Topographie der Untereinheiten pausierter Elongationskomplexe an den Positionen +9, +11, +16 und +21.....	50
9.2 TFE Interaktionen mit DNA in pausierten Elongationskomplexen.....	50
10. RNAP Untereinheit H interagiert in pausierten Elongationskomplexen im Bereich des aktiven Zentrums mit der DNA des kodierenden Stranges.....	50
11. TFB2 induzierte Transkriptionskomplexe weisen einen spezifischen Defekt in der Ausbildung des offenen Komplexes auf, der von TFE teilweise kompensiert wird	51
11.1 Ausbildung des offenen Komplexes durch TFB1 und TFB2.....	52
11.2 TFB1 und TFB2 induzierte Transkription an Heteroduplex- und Duplex-DNA.....	52
V Diskussion.....	55
1. Das Rpb7 Ortholog E' stimuliert die Transkriptionsaktivität der RNAP bei niedrigen Temperaturen durch die Ausbildung des vollständigen offenen Komplexes.....	55
2. Der duale Effekt von TFE auf die Initiation	57
3. Wechselwirkungen der Faktoren E', F und TFE während der Initiation	58
4. Eine vollkommen neuartige Funktion von TFE in der Elongation	62
5. Umstrukturierung der <i>Pfu</i> RNAP-Untereinheit H während des Übergangs von Initiation zu Elongation	64
6. Die Rolle des B-Fingers in der TFIIIB-Familie.....	66
7. Wechselwirkungen von TFB mit TFE	68
8. Die Rolle von mehreren TFB-Versionen in Archaea	69
VI Zusammenfassung	70

VII Summary.....	72
VIII Literaturverzeichnis	74
IX Anhang.....	84
1. Abkürzungen	84
2. Danksagung	86
3. Erklärung	87

I Einleitung

Die RNA-Synthese in Archaeen erfolgt wie in Bakterien durch eine einzige RNA-Polymerase (RNAP), während eukaryotische Zellen drei spezialisierte RNAP-Typen besitzen (I, II und III) (zusammengefasst von Thomm, 2007 und 1996; Bell und Jackson, 2001). Trotz der morphologischen Ähnlichkeiten von Archaeen und Bakterien stellt die Transkriptionsmaschinerie der Archaeen eine vereinfachte Form des eukaryotischen Transkriptionssystems dar, bei dem die RNA-Synthese durch eine für Eukaryoten typische RNAP katalysiert wird (Langer et al., 1995). Während die Untereinheiten dieser RNAPs Homologien zu allen fünf Untereinheiten der bakteriellen RNAP ($\alpha_2\beta\beta'\omega$) aufweisen, ist für eine effiziente und spezifische Transkriptionsinitiation das Vorhandensein von zusätzlichen Transkriptionsfaktoren charakteristisch für die RNAPs von Eukaryoten und Archaeen. Die RNA-Synthese von Bakterien wird hingegen von RNAPs, die einen Sigma-Faktoren (σ) enthalten initiiert (Murakami et al., 2002; Cassylyev et al., 2002). Für die *in vitro* Transkription im archaeellen RNAP-System sind zwei zusätzliche Transkriptionsfaktoren für die spezifische Promotor-gerichtete Initiation der RNA-Synthese essentiell: das TA-TA-Box-Bindeprotein (TBP) und der Transkriptionsfaktor B (TFB) (zusammengefasst von Thomm, 2007; Bartlett, 2005; Geiduschek und Ouhammouch, 2005), während in den eukaryotischen RNAP-Systemen zusätzlich zu den Homologen der archaeellen TBP und TFB weitere Transkriptionsfaktoren für die spezifische *in vitro* Transkription nötig sind (Woychik und Hampsey, 2002).

Die große Ähnlichkeit der an der Transkription beteiligten Faktoren sowie des Hauptenzym der RNA-Synthese, der aus einer Vielzahl von Untereinheiten bestehenden RNAP, in Archaeen und Eukaryoten bedingt einen ähnlichen Aufbau der Promotor-Elemente, den bestimmenden Faktoren für die Initiationsreaktion. Die DNA-Sequenz des Promotors definiert den Transkriptionsstartpunkt sowie die Initiationsfrequenz der RNAP und ist durch zwei Hauptelemente (TATA-Box und Factor B Recognition Element (BRE)) charakterisiert (zusammengefasst von Bartlett, 2005). Eine A/T-reiche Sequenz ungefähr 25 Basenpaare stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes bildet die TATA-Box und ist für die Promotorerkennungseffizienz und -bindung durch TBP verantwortlich (Hausner et al., 2001). Die Bindung des TFIIB Orthologs an das BRE, einer Purin-reichen DNA-Sequenz sieben Basenpaare stromaufwärts der TATA-Box, bestimmt die Orientierung des Initiationskomplexes auf der DNA und somit auch die Richtung der Transkription (Bell et al., 1999; Littlefield et al., 1999; Hausner et al., 1996; Palmer und Daniels, 1995; Thomm und Wich, 1988).

Der Vorgang der archaeellen Transkription kann in mehrere Schritte eingeteilt werden: zunächst erfolgt die Erkennung und Bindung der TATA-Box durch TBP (Gohl et al., 1995; Rowlands et al., 1994; Hausner et al., 1996; Littlefield et al., 1999). Im Folgenden erkennt TFB den TBP/DNA-Komplex und stabilisiert diesen durch direkte Bindung an TBP und die Promotor-DNA (Hausner et al., 1996; Littlefield et al., 1999; Qureshi et al., 1995). Diese Promotorplattform aus TBP/TFB/Promotor-DNA vermittelt die Assoziation der RNAP mit diesem Komplex, was in der Ausbildung des Initiationskomplexes resultiert (Hausner et al., 1996; Bell und Jackson, 1998). Die Ausbildung des offenen Komplexes, die mit einer Umstrukturierung des Komplexes, dem Öffnen der DNA und der Positionierung des kodierenden DNA-Strangs zu dem aktiven Zentrum der RNAP (Hausner und Thomm, 2001) überein geht, ist das zentrale Thema der vorliegenden Arbeit und durch das funktionelle Zusammenspiel der RNAP-Untereinheiten A', E'/F und den Transkriptionsfaktoren TBP, TFB und TFE gekennzeichnet (Naji et al., 2007; Grünberg et al., 2007; Micorescu et al., 2007).

1. Die RNA Polymerase von *Pyrococcus furiosus*

Archaeelle RNAPs sind Protein-Komplexe und bestehen aus 10 bis 12 unterschiedlichen Untereinheiten (zusammengefasst von Thomm und Hausner, 2006; Langer et al., 1995; Darcy et al., 1999), die große Sequenzähnlichkeiten zu den Untereinheiten der eukaryotischen RNAPII (polII) aufweisen. Mit Ausnahme der RNAPII Untereinheiten Rpb8 und Rpb9 (Kaine et al., 1994), konnten in allen bisher bekannten archaeellen Genomen Homologe zu entsprechenden Untereinheiten der RNAPII identifiziert werden. *In silico* Vergleiche von Konsensus-Sequenzen der *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*) RNAP-Untereinheiten mit den entsprechenden Sequenzen der eukaryotischen RNAPII-Untereinheiten ergaben eine in hohem Maße ausgeprägte Konservierung der Domänen der RNAP, die für die Ausbildung der großen Spalte und des aktiven Zentrums des Enzyms verantwortlich sind sowie ein gleiches Muster für die Interaktionen der einzelnen Untereinheiten untereinander (Goede et al., 2006). Die größte Untereinheit des 11-Untereinheiten-Komplexes der *Pfu* RNAP ist B (127 kDa), dem archaeellen Homolog zu der RNAPII Rpb2 Untereinheit und der bakteriellen β Untereinheit. Die Untereinheiten A' und A'' entsprechen den C- und N-terminalen Hälften von Rpb1 (der größten Untereinheit der polII), bzw. β' bei den Bakterien. B, A' und A'' stellen die katalytischen Untereinheiten der RNAP dar, die auch das aktive Zentrum des Enzyms und das aktive Zentrum umgebende Strukturen wie die RNAP-Klammer bilden. Die Untereinheiten D und L sind die Homologen zu Rpb3 und Rpb11 der polII und entsprechen dem N-Terminus der bakteriellen α Untereinheit (Eloranta et al., 1998, Werner et al., 2000). Die Untereinheit K ist homolog zu der C-terminalen Hälfte von Rpb6 und der bakteriellen ω Untereinheit.

Die verbleibenden Untereinheiten weisen ausschließlich Homologien zu Untereinheiten der Mitglieder polII-ähnlicher RNAPs auf. So stellen die Untereinheiten N und P die Homologen zu Rpb10 und Rpb12 dar, die mit D und L einen Subkomplex bilden, der dem eukaryotischen Rpb3/10/11/12 entspricht (Werner und Weinzierl, 2002). Werner und Weinzierl, 2002 zeigten für den Methanogenen *Methanocaldococcus jannaschii*, dass der makromolekulare Komplex aus B', B'', A', A'', D, L, N und P der minimale Komplex ist, der in unspezifischen Transkriptionsversuchen noch Aktivität aufweist.

Die eukaryotische RNAPII besteht aus 12 Untereinheiten, die sich auf zwei funktionelle Subkomplexe verteilen: Das Rpb7/4 Heterodimer (I.1.1) und das aus den verbleibenden 10 Untereinheiten aufgebaute Core-Enzym (Cramer et al., 2000 und 2001), das für eine basale RNA-Synthese ausreichend ist (Ruet et al., 1980; Edwards et al., 1991). Auch das Core-Enzym der archaeellen RNAP ist in der Lage, spezifisch die Transkription zu initiieren (Werner und Weinzierl, 2002; Naji et al., 2007; Ouhammouch et al., 2004). Obwohl das Auflösen der Kristallstruktur der archaeellen RNAP bislang erfolglos war, kann aufgrund der großen Ähnlichkeit der Untereinheiten von polII und der archaeellen RNAP zueinander und deren Wechselwirkungen miteinander angenommen werden, dass die RNAP-Struktur der Struktur der eukaryotischen polII entspricht, im Besonderen im Bereich des katalytischen Zentrums (Goede et al., 2006; Cramer et al., 2000). In der Core-Struktur der polII bilden die Untereinheiten Rpb1 und Rpb2 die entgegen gesetzten Seiten einer zentralen Spalte, während die acht kleineren Untereinheiten (ohne Rpb7/4) in der Peripherie angeordnet sind. Die Spalte beinhaltet das aktive Zentrum der RNAP und wird auf einer Seite durch eine Wand begrenzt. Die andere Seite der Spalte wird durch eine mobile Klammer gebildet, die zwei Konformationen annehmen kann. Die Kristalle des Core-Enzyms weisen auf einen geöffneten Zustand der Klammer hin (Cramer et al., 2000 und 2001), während in dem ternären Komplex des Core-Enzyms mit gebundener DNA und synthetisierter RNA die Klammer in geschlossenem Zustand vorliegt (Gnatt et al., 2001). Die Mobilität der Klammer beruht auf fünf Protein-„Switch-Regionen“, welche die Klammer mit dem Rest des Kern-Enzyms verbinden (Cramer et al., 2001; Gnatt et al., 2001). Eine flexible „Linker-Region“ liegt

exponiert an der Oberfläche des polIII-Core unterhalb der Klammer (Abb. 1 B) und ist mit der C-terminalen „Repeat“ Domäne (CTD) der Rpb1 Untereinheit verbunden.

Die Bindung des Rpb7/4 Subkomplexes an das Core-Enzym hat die Ausbildung des aus 12 Untereinheiten bestehenden Holo-Enzyms zur Folge. Auf die Interaktion des Core-Enzyms mit dem Heterodimer wird im Folgenden genauer eingegangen.

1.1 Der E'/F-Subkomplex

Das E'/F-Heterodimer und die entsprechenden eukaryotischen Orthologen Rpb7/4 (polII), Rpc25/17 (polIII) und Rpa43/14 (polI) sind charakteristisch für alle nicht-bakteriellen RNAPs, die aus mehreren Untereinheiten bestehen (Sadhale und Woychik, 1994; Shpakovski und Shematorova, 1999; Werner et al., 2000; Peyroche et al., 2002; Siaut et al., 2003). Die Struktur des Rpb7/4 Komplexes entspricht der des E'/F-Komplexes (Todone et al., 2001; Cramer et al., 2001) und der des entsprechenden polIII-Komplexes (Rpc17/25; Siaut et al., 2003; Jasiak et al., 2006). Die strukturelle Konservierung des Heterodimers ist ein deutlicher Hinweis auf eine gleiche und konservierte Funktion.

Die Interaktion des Subkomplexes mit dem Core-Enzym der RNAP erfolgt über die „Tip“-Region mit zwei so genannten, hoch konservierten „Tip-Loops“ der Rpb7 Untereinheit an die „Linker-Region“ der größten Untereinheit der polIII, Rpb1 (Abb. 1 A; Armache et al., 2003 und 2005). Rpb7 wirkt dabei wie ein Keil, der zwischen die Klammer der RNAP und die „Linker-Region“ geschoben wird und die Klammer in einem geschlossenen Zustand hält (Abb. 1 B; Armache et al., 2003). Rbp4 ist an diesen Interaktionen mit dem Core-Enzym der RNAP nicht beteiligt und ist für die Bindung von Rpb7 an die RNAP nicht notwendig (Armache et al., 2005; Bushnell und Kornberg, 2003). Unter normalen Wachstumsbedingungen ist in *Saccharomyces cerevisiae* Rpb7 essentiell, während die Deletion von Rpb4 keinen Einfluss auf das Wachstum hat (zusammengefasst von Choder, 2004). Erst unter bestimmten Stressbedingungen, wie z.B. suboptimalen Wachstumstemperaturen spielt Rbp4 eine wichtige Rolle und wird unter diesen Bedingungen für effektives Zellwachstum benötigt (Sheffer et al., 1999; Maillet et al., 1999).

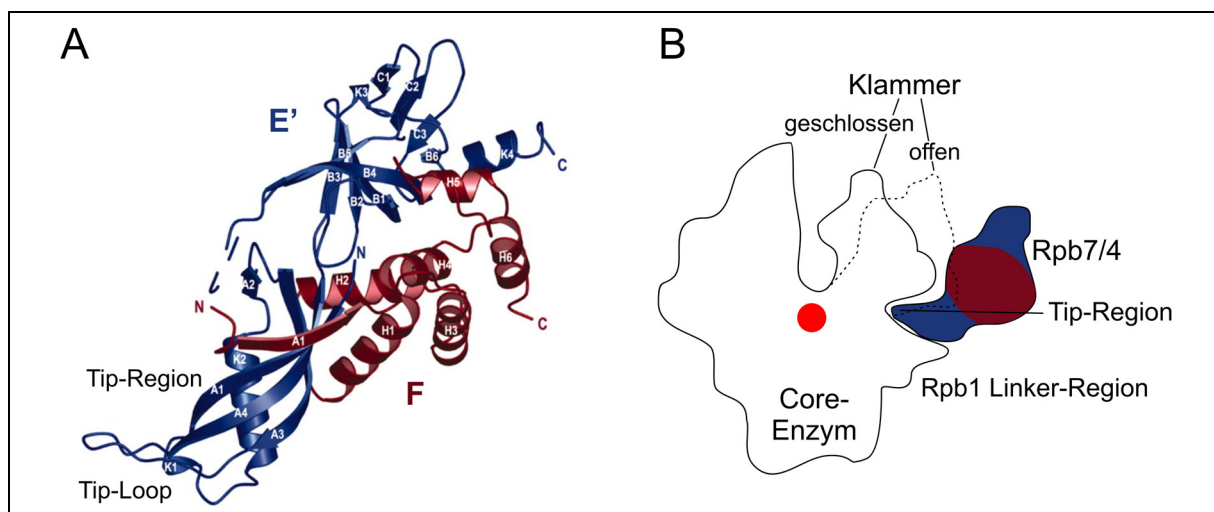


Abb. 1: Die Struktur und Funktion des E'/F-Subkomplexes. A, (verändert nach Armache et al., 2005) Die Struktur des archaeellen E'/F-Subkomplexes. E' ist blau markiert, F rot. Die „Tip“-Region und die „Tip-Loops“ sind gekennzeichnet. B, Schematische Darstellung der Interaktion des Rpb7/4, bzw. E'/F Heterodimers mit dem Core-Enzym der RNAPII (verändert nach Armache et al., 2003). Die Farbgebung der E' und F Untereinheiten entspricht A, das aktive Zentrum ist durch einen roten Punkt gekennzeichnet. Die von der Rpb1/bzw. A' Untereinheit gebildete Klammer des Enzyms ist in beiden möglichen Konformationen dargestellt: die gestrichelte Line entspricht der Position der Klammer im geöffneten Zustand, die durchgezogene Line entspricht der Positionierung der Klammer im geschlossenen Zustand, der durch die Bindung von E'/F induziert wird.

Rpb7, bzw. der Subkomplex Rpb7/4 ist für die Assoziation der RNAPII an den Promotorkomplex nicht erforderlich (Orlicky et al., 2001) und Experimente mit den rekonstituierten Core-Enzymen der RNAPs aus *M. jannaschii* und *P. furiosus* zeigten in spezifischen Transkriptionsversuchen, dass E'/F für die Transkription unter optimalen *in vitro* Bedingungen nicht essentiell sind (Werner und Weinzierl, 2002; Naji et al., 2007).

Des Weiteren ist der Rpb7/4-Komplex wahrscheinlich an dem Transport der wachsenden RNA aus der Polymerase beteiligt (Orlicky et al., 2001; Újvári und Luse, 2006; Meka et al., 2003). So besitzt das archaeele Rpb7 Homolog E' zwei potentielle Nukleotid-Bindestellen: ein S1-Motiv, das durch ein fünfsträngiges, antiparalleles β -Fass (OB-Faltung) charakterisiert ist (K3, B3, B2, B1, B4, B5, B6; Abb. 1 A; Bycroft et al., 1997; Worbs et al., 2001) und eine verkürzte RNP-Domäne (Varani und Nagai, 1998; Todone et al., 2001). Außerdem wurde gezeigt, dass unter bestimmten Stressbedingungen die Untereinheit Rpb4 für den mRNA-Transport benötigt wird (Farango et al., 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass für die Promotor-abhängige Transkriptionsaktivität des RNAP-Core-Enzyms unter niedrigen Temperaturen das Vorhandensein von E' essentiell ist. Des Weiteren wird ein Model vorgestellt, das anhand der präsentierten Daten die Rollen des Core-Enzyms, E' und des Transkriptionsfaktors E (TFE; I.3) bei Ausbildung des offenen Komplexes definiert.

1.2 Die Untereinheit H

Wie alle Untereinheiten der archaeeellen RNAP hat auch die Untereinheit H ein Homolog in der eukaryotischen polII, und zwar die Untereinheit Rpb5 (Langer et al., 1995). Allerdings beschränkt sich die Sequenzähnlichkeit der beiden homologen Untereinheiten auf den C-terminalen Bereich von Rpb5, das zusätzlich eine für Eukaryoten spezifische N-terminale Domäne besitzt (Todone et al., 2000). Der C-terminale Bereich ist für Rpb5 und alle nicht bakteriellen Homologe in den drei eukaryotischen RNAPs sowie der archaeeellen RNAP hoch konserviert (Langer et al., 1995; Buhler et al., 1976; Woychik et al., 1990) und steht in dem Core-Enzym der RNAPII in engem Kontakt mit der Rpb1-Untereinheit (Cramer et al., 2001). Dieser enge Kontakt der C-terminalen Domäne mit der RNAP bedingt auch eine Funktion von Rpb5 für die Transkription, nämlich das Zusammenbringen und Stabilisieren wichtiger Strukturen in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums der DNA, die eine stark komprimierte DNA-bindende Falte um die Transkriptionsblase ausbilden und charakteristisch für alle RNAPII-ähnliche Enzyme sind (Zaros et al., 2007).

Die Kristallstruktur der polII zeigt die für die eukaryotische Transkription essentielle N-terminale Region von Rpb5 (Zaros et al., 2007) als stromabwärts der Transkriptionsblase liegenden, abschließenden Teil des DNA-Kanals durch die RNAP (Cramer et al., 2001), der aufgrund seiner exponierten Lage Interaktionen mit spezifischen Partnern der polII, wie z.B. TFIIF oder spezifischen Gen-Regulatoren eingehen kann (Wei et al., 2001; Le et al., 2005). Photochemische DNA/Protein-Cross-Linking Versuche für polII Initiationskomplexe haben Rpb5 Interaktionen mit der Promotor-DNA in dem Bereich von +4 bis +15 ergeben (Kim et al., 1997 und 2000). Ähnliche Versuche mit Initiationskomplexen aus *P. furiosus* zeigen DNA/H-Interaktionen an den Positionen +12 bis +20, also der stromabwärts gelegenen Grenze der RNAP (Bartlett et al., 2004). Anhand von in dieser Arbeit durchgeführten photochemischen Cross-Linking Studien an pausierten Elongationskomplexen der *Pfu* RNAP konnte eine Umpositionierung der H-Untereinheit von der stromabwärts-Grenze der RNAP in Initiationskomplexen zu dem Bereich direkt stromabwärts des aktiven Zentrums nachgewiesen werden, einer Position, die der Position des eukaryotischen Homologs in polIII-Komplexen entspricht.

2. Der Transkriptionsfaktor B (TFB)

Der Transkriptionsfaktor B spielt in Archaeen (TFB) sowie Eukaryoten (TFIIB) eine zentrale Rolle für die Assoziation der RNAP mit der Promotorplattform und ist vermutlich an der Umstrukturierung des Transkriptionskomplexes beteiligt, die letztendlich zu der Initiation der Transkription führt. Wie das eukaryotische Homolog TFIIB weist TFB einen strukturell komplexen und konservierten N-terminalen Bereich auf, der über einen „Linker“ mit der C-terminalen Domäne verbunden ist. Dieser C-terminale Bereich von TFB nimmt etwa zwei Drittel des Proteins ein und enthält ein Helix-Turn-Helix Motiv, das die Sequenz-spezifische Erkennung des BRE vermittelt. Des Weiteren bilden die Proteinoberflächen des C-terminalen Bereichs Sequenz-unspezifische Kontakte zu der Promotor-DNA stromabwärts der TATA-Box aus (Littlefield et al., 1999). Der N-Terminus von TFB ist in Initiationskomplexen durch photochemische Cross-Linking Experimente nahe dem Transkriptionsstartpunkt identifiziert worden (Bartlett et al., 2004; Renfrow et al., 2004).

Für den N-terminalen Bereich von archaeellem TFB und eukaryotischem TFIIB sind normalerweise zwei konservierte Motive charakteristisch: Der Zink-Finger und der B-Finger, die beide entscheidend für die Bindung der RNAP sowie die Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts sind (Bell und Jackson, 2000; Pinto et al., 1994). Die Assoziation der RNAP an die Promotorplattform erfolgt durch die Bindung des Zink-Finger Motivs an die „Docking“-Domäne der RNAP (Bushnell et al., 2004; Chen und Hahn, 2003; Werner und Weinzierl, 2005), während die Funktion des B-Finger Motivs noch nicht geklärt werden konnte. Ein kristallographisch dokumentierter RNAPII/TFIIB-Komplex und DNA-abhängige Fe-BABE Protein-Spaltungs-Studien weisen auf eine Positionierung der B-Finger Struktur in der Spalte der RNAP in direkter Nähe zu dem kodierenden DNA-Strang stromaufwärts des Transkriptionsstartpunkts hin (Bushnell et al., 2004; Miller und Hahn, 2006). Diese Positionierung lässt eine Funktion dieser in TFB und TFIIB konservierten Struktur bei der Ausbildung des offenen Komplexes und/oder der Loslösung der RNAP von der Promotorplattform vermuten.

Das Genom von *Pyrococcus furiosus* kodiert für zwei TFB Paraloge, TFB1 und TFB2, von denen bisher nur TFB1 auf seine Transkriptionsaktivität untersucht wurde. Hitzeschock induziert wird das zelluläre Level der TFB2 Transkripte gesteigert, während TFB1 unverändert transkribiert wird (Shockley et al., 2003), was eine potentielle Rolle des exprimierten TFB2 Proteins in der Hitzeschockantwort der Zelle vermuten lässt.

Das *tfb2* Gen kodiert für ein Protein aus 283 Aminosäuren, einer Größe, die der von TFB1 und anderen Mitgliedern der TFIIB-Familie entspricht (Micorescu et al., 2007). Der C-terminale Teil von TFB2 ist zu 63% identisch mit dem entsprechenden Teil von TFB1 und weist eine hohe Konservierung des Bereichs auf, der das BRE-erkennende Helix-Turn-Helix Motiv ausbildet. Im Gegensatz dazu ist die N-terminale Domäne deutlich weniger konserviert. Die Region des Zink-Finger Motivs zeigt eine 45%ige Übereinstimmung, während das B-Finger Motiv bei TFB2 überhaupt nicht vorhanden ist (Micorescu et al., 2007). Ein Analogon zu dem *Pfu* TFB2 stellt Brf, ein RNAPIII-Transkriptionsfaktor dar, der homolog zu der N-terminalen Domäne von TFIIB ist und wie diese ein N-terminales Zink-Finger Motiv, aber keine konservierte B-Finger Sequenz enthält (Huang et al., 2003).

Manche Archaeen kodieren auf ihren Genomen mehrere TFB-Derivate, die größtenteils das B-Finger Motiv enthalten. *Thermococcus kodakaraensis* z.B. kodiert für zwei TFBs, die beide einen B-Finger besitzen und funktionell *in vitro* keinen Unterschied aufweisen und *in vivo* unter den getesteten Bedingungen die Anwesenheit von jeweils nur einem der beiden TFBs für das Zellwachstum ausreichend ist (Santangelo et al., 2007). Dadurch, dass *Pfu* TFB2 von Natur aus kein B-Finger Motiv aufweist, konnte unter anderem im Rahmen dieser Arbeit die Funktion dieses hoch konservierten Elements der Transkription untersucht und bestimmt werden.

3. Der Transkriptionsfaktor E (TFE)

Alle bekannten archaeellen Genome kodieren für ein Protein mit großer Sequenzähnlichkeit zu der N-terminalen Domäne der α Untereinheit von TFIIE, das in Eukaryoten als Heterotetramer aus zwei α und zwei β Untereinheiten vorliegt (Ohkuma et al., 1990). Diese N-terminale Domäne entspricht genau dem Bereich von TFIIE α , der für eine basale Transkriptionsaktivität der RNAPII im eukaryotischen polII-System essentiell ist (Ohkuma et al., 1995). Dementsprechend ist zu vermuten, dass es sich bei der archaeellen Version von TFIIE um die evolutionäre Vorform des eukaryotischen TFIIE handelt, welche die ursprünglichen Funktionen dieses Transkriptionsfaktors besitzt.

TFIIE ist ein genereller und essentieller polII-Transkriptionsfaktor, der nach seiner Assoziation mit dem Präinitiationskomplex die Bindung des polII-Transkriptionsfaktors H (TFIIH) an den binären Komplex induziert (Maxon et al., 1994; Ohkuma et al., 1995; Holstege et al., 1996; Flores et al., 1992) und diesen gemeinsam mit TFIIH stabilisiert (zusammengefasst von Ohkuma, 1997). TFIIE ist in der Lage, einzelsträngige DNA zu binden (Kuldell und Buratowski, 1997) und induziert die ATP-abhängige Helicase-Aktivität von TFIIH (Ohkuma und Roeder, 1994), die für die Aufschmelzung der Promotor-DNA verantwortlich ist (zusammengefasst von Drapkin und Reinberg, 1994). Ein weiterer Hinweis auf die Wichtigkeit von TFIIE und TFIIH bei der Ausbildung des offenen Komplexes ist, dass beide Faktoren bei der Verwendung von Negativ-, „Supercoiled“-DNA-Matrizen oder topologisch entspannten DNA-Matrizen mit kurzen Basenfehlpaarungen im Bereich des Transkriptionsstarts für die Initiation der Transkription nicht mehr benötigt werden (Holstege et al., 1996 und 1997; Pan und Greenblatt, 1994; Tantin und Carey, 1994; Goodrich und Tijan, 1994; Parvin und Sharp, 1993; Parvin et al., 1994; Tyree et al., 1993). Neben der Helicase-aktivierenden Wirkung von TFIIE auf TFIIH induziert TFIIE außerdem die Kinase-Aktivität von TFIIH, die für die Phosphorylierung der C-terminalen Domäne der polII verantwortlich ist (Ohkuma und Roeder, 1994). Bei dem ATP-abhängigen Loslösen der RNAP von dem Promotorkomplex sind die Faktoren TFIIE und TFIIH auch an Negativ-Supercoiled-DNA-Matrizen essentiell (Holstege et al., 1996; Goodrich und Tjian, 1994). Trotz der Freisetzung von TFIIE von dem RNAPII-Komplex vor dem Erreichen der Position +10 relativ zum Transkriptionsstartpunkt (Zawel et al., 1995), spielt TFIIE demnach für den Übergang von Initiation zu Elongation der Transkription eine wichtige Rolle.

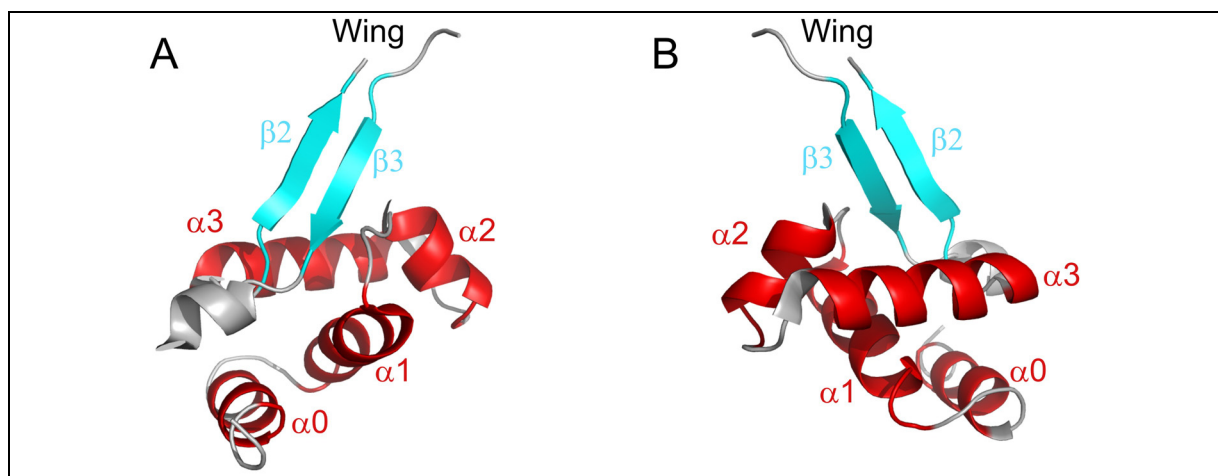


Abb. 2: Darstellung der „Winged-Helix“ Struktur von *Sulfolobus solfataricus* (PDB 1qlh; Meinhart et al., 2003). *A*, Für „winged-helix-turn-helix“ Motive ist das Vorhandensein von vier α -Helices ($\alpha 0$ -3) und zwei β -Faltblättern ($\beta 2$ -3) charakteristisch, die durch eine „Wing“-Region verbunden sind. *B*, Die Struktur entspricht *A* um 180° gedreht.

Photochemische Cross-Linking Studien von polII-Initiationskomplexen haben Protein/DNA-Interaktionen der TFIIE Untereinheiten mit der Promotor-DNA in und direkt stromabwärts des Bereichs der Transkriptionsblase (Kim et al., 2000) nachgewiesen, während eine andere Studie TFIIE/DNA-Interaktionen stromaufwärts der Transkriptionsblase identifiziert hat (Robert et al., 1996), die kürzlich von Miller und Hahn, 2006 mittels Fe-BABE Protein-Spaltungs-Studien bestätigt wurden. In dieser Studie wurde auch der Bereich von TFIIE identifiziert, der die Bindung mit der DNA eingeht. In dem Bereich und stromaufwärts der Transkriptionsblase interagiert der N-terminale Bereich von TFIIE α mit der Promotor-DNA, also der Bereich, der dem archaeellen TFE entspricht und durch eine konservierte „Winged-Helix“ Struktur charakterisiert ist (Abb. 2). Die „Winged-Helix“ Struktur ist ein typisches Merkmal für DNA-bindende Proteine wie z.B. Transkriptionsregulatoren (Liu et al., 2007; Vierke et al., 2003; Gajiwala und Burley, 2000). TFIIE, bzw. TFE sind jedoch aufgrund der teilweise negativ geladenen DNA-bindenden Spalte, einer ungewöhnlich langen „Wing“-Region und der fehlenden DNA-bindenden Aktivität *in vitro* keine typischen DNA-bindende Proteine (Meinhart et al., 2003).

Da der Transkriptionsapparat der Archaeen eine stark vereinfachte Version des eukaryotischen polII-Systems darstellt (zusammengefasst von Bartlett, 2005) und für die Ausbildung des offenen Komplexes kein TFIIH-ähnliches Protein benötigt wird, können die ursprünglichen Funktionen von TFE als Vorläufer des eukaryotischen TFIIEs in dem archaeellen System eindeutig analysiert werden. TFE in Archaeen ist nicht essentiell für *in vitro* Transkriptionsreaktionen, kann aber die Initiationsrate an manchen schwach exprimierten Promotoren stimulieren (Hanzelka et al., 2001). Des Weiteren führen Mutationen der TATA-Box Sequenz von starken Promotoren oder suboptimale TBP-Konzentrationen zu einer TFE-Abhängigkeit der Transkription (Bell et al., 2001).

Über den Transkriptions-aktivierenden Mechanismus von TFE ist wenig bekannt. Werner und Weinzierl, 2005 haben gezeigt, dass TFE einen durch Mutationen im N-terminalen Bereich von TFB hervorgerufenen Transkriptionsdefekt teilweise aufheben und Präinitiationskomplexe mit TFB-Mutanten in EMSAs signifikant stabilisieren kann. Auch der Befund, dass TFE die Rekrutierung der RNAP an Heteroduplex-DNA-Matrizen erleichtert, die nicht effizient von dem TBP/TFB/RNAP-Promotorkomplex gebunden werden (Werner und Weinzierl, 2005) weist auf eine TFE-vermittelte Stabilisierung von Präinitiationskomplexen hin, die durch die in dieser Arbeit dokumentierten Ergebnisse detailliert analysiert und entschlüsselt werden konnte.

4. Die Initiation der Transkription

Die Initiation der Transkription bei Archaeen beginnt mit der Bindung von TBP an die TATA-Box (Rowlands et al., 1994; Hausner et al., 1996; Gohl et al., 1995). Wie das eukaryotische Pendant bindet *Pfu* TBP in die kleine Furche der DNA, was eine signifikante Krümmung der DNA zur Folge hat (Kosa et al., 1997). Studien mit eukaryotischem TBP haben gezeigt, dass TBP in zwei verschiedenen Orientierungen an die TATA-Box binden kann und keine Präferenz für die korrekte Ausrichtung aufweist (Patikoglou et al., 1999; Liu und Schepartz, 2001). Da auch archaeelles TBP nicht in der Lage ist, die Orientierung des Initiationskomplexes zu bestimmen, erfolgt dieser entscheidende Schritt durch die Bindung von TFB (Bell et al., 1999). Der C-terminale Bereich von TFB erkennt die TBP-induzierte Krümmung der DNA und bindet an das BRE stromaufwärts der TATA-Box und an Bereiche stromabwärts der TATA-Box (Hausner et al., 1996; Bell et al., 1999). Eine detaillierte Übersicht über die TBP/TFB/Promotor-DNA-Kontakte bieten photochemische Cross-Linking Studien (Bartlett et al., 2000 und 2004; Renfrow et al., 2004), die Interaktionen von TFB mit der DNA fast bis zu dem aktiven Zentrum der RNAP zeigen (Abb. 3).

Die Bindung von TFB an den Promotorkomplex ermöglicht die Rekrutierung und die Positionierung der RNAP. Die Orientierung der Transkriptionsfaktoren und der RNAP zu der Promotor-DNA wurde anhand von photochemischen Cross-Linking Daten dokumentiert (Bartlett et al., 2000 und 2004; Renfrow et al., 2004) und ist in Abb. 3 schematisch zusammengefasst. TBP bindet im Bereich der TATA-Box und TFB interagiert mit der BRE-Sequenz stromaufwärts der TATA-Box. Die RNAP-Untereinheit B interagiert hauptsächlich mit dem DNA-Bereich zwischen der TATA-Box und dem Transkriptionsstartpunkt, während die Untereinheiten A', A'' und H überwiegend stromabwärts der Position +1 positioniert sind. Die Orientierung der archaeellen RNAP und der Transkriptionsfaktoren zu der Promotor-DNA entspricht mit geringen Abweichungen der Orientierung in eukaryotischen und bakteriellen Transkriptionskomplexen (Murakami et al., 2002; Kim et al., 2000; Korzheva et al., 2000; Gnatt et al., 2001).

Anhand von chemischen Spaltungs- und Protein/Protein-Cross-Linking Experimenten konnten für die Rekrutierung der RNAP essentielle Interaktionen des TFIIB Zink-Finger Motivs mit der „Docking-Region“ der Rpb1-Untereinheit der polII nachgewiesen werden, die in hoch konservierter Form der Untereinheit A' der archaeellen RNAP entspricht. Des Weiteren wurde der TFIIB B-Finger in der Spalte der RNAPII nahe des aktiven Zentrums und den „Fork-Loops“ der eukaryotischen polII-Untereinheit Rpb2 lokalisiert, dem Homolog zu der archaeellen B Untereinheit (Bushnell et al., 2004; Chen und Hahn, 2003 und 2004). Die unmittelbare Nähe des B-Finger Motivs zu wichtigen Strukturen in der Spalte der RNAP (zusammengefasst von Trinh et al., 2006; Naji et al., 2007 *Nucleic Acids Res.*) lässt für den N-terminalen Bereich von TFIIB, bzw. des archaeellen Homologs TFB eine entscheidende Rolle für die Initiation der Transkription vermuten, die im Rahmen dieser Arbeit erstmals dokumentiert werden konnte.

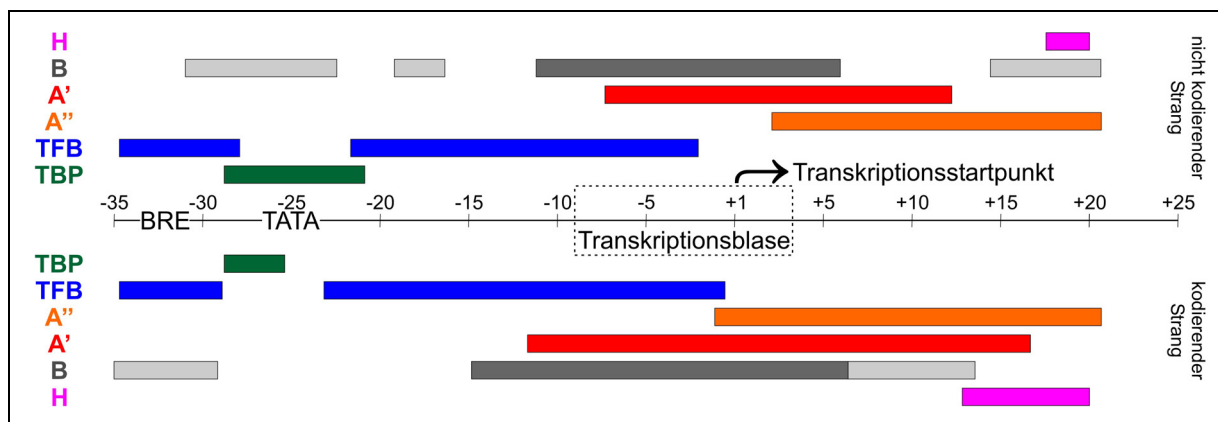


Abb. 3: Zusammenfassung der photochemischen Cross-Linking Studien von Initiationskomplexen aus *Pyrococcus furiosus*. Die Interaktionen der RNAP-Untereinheiten H (pink), B (grau), A' (rot), A'' (orange) und der Transkriptionsfaktoren TBP (grün), TFB (blau) mit dem kodierenden (unten) und dem nicht kodierenden Strang der Promotor-DNA sind durch farbige Balken angegeben (Bartlett et al., 2000 und 2004; Renfrow et al., 2004). Die hellgrauen Balken für Interaktionen von B mit der DNA geben Bereiche an, für die nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Signale von inkorrekt gebildeten Initiationskomplexen stammen (Bartlett et al., 2004). Die Position der Promotor-Elemente TATA-Box (TATA) und Faktor-B-Recognition-Element (BRE) ist angegeben, genauso der durch einen Pfeil gekennzeichnete Transkriptionsstartpunkt bei Position +1 und die Transkriptionsblase (Hausner und Thomm, 2001; Spitalny und Thomm, 2003).

Nach der Ausbildung des Promotorkomplexes erfolgt der Übergang von einem geschlossenen in einen offenen Komplex. In dem polII-System geht die Ausbildung des Präinitiationskomplexes mit einer topologischen Umstrukturierung überein, die eine Verbiegung und Anlagerung der Promotor-DNA um den Protein-Kern des Komplexes zur Folge hat (Forget et al., 1997; Kim et al., 1997; Langelier et al., 2001; Oelgeschlager et al., 1996; Rivetti et al., 2003; Robert et al., 1998). Diese Umlagerung der DNA während der Initiation ist

entscheidend für die korrekte Positionierung des kodierenden DNA-Strangs mit dem Transkriptionsstartpunkt zu dem aktiven Zentrum des Enzyms. Das Einführen von topologischen Spannungen ist essentiell für das Aufschmelzen der Promotor-DNA (Douziech et al., 2000; Rivetti et al., 2003).

In einem nächsten Schritt wird die Promotor-DNA in einem Bereich von -9 bis +2 aufgeschmolzen und somit für die RNA-Synthese zugänglich (Holstege et al., 1997 und 1996; Jiang et al., 1994; Yan und Gralla, 1997). Neben der polII spielen auch die Transkriptionsfaktoren IIE und IIF eine Rolle bei der Ausbildung des offenen Komplexes (Holstege et al., 1995; Pan und Greenblatt, 1994). Die Ausbildung des vollständigen offenen Komplexes benötigt die ATP-abhängige DNA-Helikase-Aktivität von TFIIH (Holstege et al., 1997 und 1996). Im Gegensatz dazu erfordert die Ausbildung des offenen Komplexes durch die archaeelle RNAP unabhängig von der Topologie der DNA-Matrize keine ATP-Hydrolyse (Bell et al., 1998; Hausner und Thomm, 2001). Übereinstimmend damit konnte in keinem der bisher sequenzierten archaeellen Genome ein TFIIH-ähnlicher Faktor identifiziert werden. Die Transkriptionsblase in vollständigen und transkriptionsfähigen Initiationskomplexen umfasst bei Archaeen wie bei Eukaryoten und Bakterien einen Bereich von ~ 10 Basen (Hausner und Thomm, 20001; Spitalny und Thomm, 2003; Yan und Gralla, 1997; deHaseth und Helmann, 1995). Im Rahmen dieser Arbeit konnte der Vorgang des Aufschmelzens der Promotor-DNA während der Ausbildung des offenen Komplexes in drei Stadien unterteilt werden, die durch eine schrittweise Ausweitung der Transkriptionsblase gekennzeichnet sind, für die jeweils unterschiedliche Faktoren des Initiationskomplexes verantwortlich sind.

5. Der Übergang von der Initiation in die Elongation

Der Übergang von initiierten Komplexen in die Phase der produktiven RNA-Synthese ist durch zwei Vorgänge geprägt, die eng miteinander verknüpft sind: Die Phase der abortiven Transkription und die Phase des endgültigen Loslösens der RNAP von der Promotorplattform, verbunden mit dem Beginn der effektiven Transkription. Der Beginn der Synthese naszierender RNA durch die polII leitet die Abtrennung der RNAP von dem Promotorkomplex ein. Dieses kritische Stadium beginnt mit der Ausbildung der ersten Phosphordiesterbindung, geht einher mit einer physikalischen und funktionellen Instabilität des Initiationskomplexes und endet, wenn das Transkript eine Länge von 14-15 Nukleotiden erreicht und ist durch abortive Transkription und Promotor nahes Arretieren der RNAPII gekennzeichnet. Während abortive Transkripte dadurch gekennzeichnet sind, dass sie direkt nach der Synthese aus dem Initiationskomplex freigesetzt werden, bleibt die RNA in arretierten Komplexen in den ternären Komplexen gebunden. Charakteristisch für die abortive Phase der polII ist die Akkumulation eines 4 nt Transkripts. Die Transkriptionskomplexe gewinnen erst ab einer RNA-Länge von 10-11 nt an Stabilität und verlassen die abortive Phase der Initiation (zusammengefasst von Dvir, 2002). Bis zu dem Erreichen einer Transkript-Länge von ~ 15 nt neigen polII-Transkriptionskomplexe in Abwesenheit von ATP, TFIIH oder stromabwärts verlängerter Matrizen-DNA zum Pausieren und Arretieren, wobei TFIIH aber ab einer RNA-Länge von 4 nt nicht mehr essentiell für die Transkription ist (Stelzer et al., 1994; Holstege und Timmers, 1997 *Methods*). Erst ab einer RNA-Länge von 15+ nt gelten die Komplexe als stabile frühe Elongationskomplexe (Dvir et al., 1997 *J. Biol. Chem.* und 1997 *Proc. Natl. Acad. Sci.*). Spitalny und Thomm, 2003 haben Transkriptionskomplexe der *Pfu* RNAP an verschiedenen Positionen spezifisch pausiert und anhand von Permanganat- und ExonukleaseIII-Footprinting Studien analysiert und für den Übergang von Initiation zu Elongation zwei bedeutende strukturelle Veränderungen dokumentiert. Eine dieser Veränderungen tritt auf, wenn die RNAP die Position +6/+7 erreicht hat. Während die stromabwärts-Grenze der RNAP unverändert an der gleichen Position wie in ursprünglich gebildeten offenen Komplexen liegt, ist bei an Position +7

pausierten RNAPs erstmals eine stromaufwärts gelegene Grenze des von der Promotorplattform abgelösten Enzyms zu sehen. Die zweite entscheidende Veränderung ist die Verschiebung der stromabwärts gelegenen Grenze, wenn die RNAP die Position +10/+11 erreicht hat. Mit der Verschiebung der stromabwärts-Grenze geht auch das Schließen des anfänglich gebildeten offenen Komplexes – vermutlich durch eine Vertreibung des B-Finger Motivs von TF(II)B durch die wachsende RNA – einher, was das Loslösen der polII, bzw. der archaeellen RNAP von dem Promotorkomplex bestimmt (Pal et al., 2005; Naji et al., 2007 *Nucleic Acids Res.*; Hieb et al., 2006). Das Lösen der RNAPII von dem Promotor-Komplex ist begleitet von der Dissoziation der Transkriptionsfaktoren IIF, IIE, IIB und nach der RNA-Synthese von 30-68 nt auch von TFIIH, während das eukaryotische Homolog von TBP an die TATA-Box gebunden bleibt (Zawel et al., 1995). Wie das eukaryotische Homolog wird archaeelles TFB während des Übergangs von Initiation zu Elongation freigesetzt, während TBP an die TATA-Box gebunden bleibt (Xie und Reeve, 2004), was einmal mehr eine große funktionelle Ähnlichkeit des archaeellen und eukaryotischen Transkriptionssystems vermuten lässt.

Nach dem Loslösen von dem Promotorkomplex tritt die RNAP in die Phase der frühen Elongation ein. In diesem Stadium dehnt sich die RNAP in dem archaeellen, bakteriellen und den eukaryotischen Transkriptionssystemen über einen Bereich von ~ 30 Basenpaaren der DNA aus (Spitalny und Thomm, 2003; Metzger et al., 1989; Kahl et al., 2000; Samkurashvili und Luse, 1998; Fiedler und Timmers, 2001). Die stromabwärts-Grenze der archaeellen RNAP ist in Elongationskomplexen 12 Basenpaare vor dem 3'-Ende der naszierenden RNA gelegen und die Transkriptionsblase entspricht mit einer Ausdehnung von 15-17 Nukleotiden der Blase der elongierenden polII (18 Nukleotide). Die Länge des RNA/DNA-Hybrids beträgt – wie in bakteriellen und eukaryotischen ternären Komplexen – 9 Basenpaare (Fiedler und Timmers, 2001; Zaychikov et al., 1995; Gnatt et al., 2001; Westover et al., 2004; Samkurashvili und Luse, 1998).

Trotz der großen Ähnlichkeit des polII- mit dem archaeellen RNAP-System konnte in dieser Arbeit ein bedeutender Unterschied dokumentiert werden, indem archaeelles TFE – anders als sein eukaryotisches Homolog – nicht während des Übergangs von der Initiation in die Elongation von der RNAP dissoziiert, sondern als Teil früher Elongationskomplexe vorliegt und in der Stabilisierung der Transkriptionsblase von ternären Komplexen eine wichtige funktionelle Rolle übernimmt.

II Material

1. Bezugsquellen von Proteinen und Chemikalien

1.1 Chemikalien

Acetonitril	Sigma, St. Louis (USA)
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Serva, Heidelberg
APS	Serva, Heidelberg
Azidophenacyl Bromid	Sigma, St. Louis (USA)
Bacto-Agar	Difco, Michigan (USA)
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Michigan (USA)
Bacto-Trypton	Difco, Michigan (USA)
Bis-Acrylamid	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
DC-AF Kieselgel 60 F ₂₅₄	Merck, Darmstadt
Dynabeads M-280	Invitrogen, Karlsruhe
dNTPs	MBI Fermentas, Wilna (Litauen)
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure (rauchend)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Formamid	Merck, Darmstadt
GF/F Glass Filter	3MM, Maidstone (UK)
Glycerin (87%)	Sigma, St. Louis (USA)
Glycin	Merck, Darmstadt
Glycogen	Roche, Mannheim
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Heparin	Sigma, St. Louis (USA)
HEPES	Sigma, St. Louis (USA)
Hering Sperma DNA	Promega, Madison (USA)
Isotope ([α - ³² P]-NTPs, [α - ³² P]-dNTPs, [γ - ³² P]-ATP)	Hartmann Analytic, Braunschweig oder GE Healthcare, Uppsala (Schweden)
Kaliumpermanganat	Fluka, St. Gallen (Schweiz)
Leupeptin	Sigma, St. Louis (USA)
β -Mercapthoethanol	Roth, Karlsruhe
Mineralöl	Fluka, St. Gallen (Schweiz)
NTPs	MBI Fermentas, Wilna (Litauen)
Oligonukleotide	Operon, Köln
Pepstatin	Sigma, St. Louis (USA)
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 30 & 40	Roth, Karlsruhe
SDS	Serva, Heidelberg
Sigmacote	Sigma, St. Louis (USA)
Streptavidin Magnet-Particles	Roche, Mannheim
TEAB	Sigma, St. Louis (USA)
TEMED	Sigma, St. Louis (USA)
Tris	USB, Cleveland (USA)

Whatman-Papier	3MM, Maidstone (UK)
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

Der Reinheitsgrad der verwendeten Chemikalien war in der Regel p. A. Nicht aufgeführte Chemikalien wurden entweder von der Firma Merck, Darmstadt oder Sigma, St. Louis (USA) bezogen.

1.2 Enzyme und andere Protein

BSA	Roche, Mannheim
DNaseI, RNase free	Roche, Mannheim
Klenow Fragment (3' - 5' exo ⁻)	New England Biolabs, Ipswich (USA)
<i>Micrococcus</i> (S 7) Nuklease	MBI Fermentas, Wilna (Litauen)
Phusion-Taq-DNA-Poylmerase	Finnzymes, Espoo (Finnland)
Proteinstandards	Bio-Rad, Hercules (USA) oder MBI Fermentas, Wilna (Litauen)
Restriktionsenzyme (<i>NdeI</i> , <i>XbaI</i> , <i>PstI</i> , <i>EcoRI</i>)	New England Biolabs, Ipswich (USA)
S1 Nuklease	MBI Fermentas, Wilna (Litauen)
T4 DNA Polymerase	New England Biolabs, Ipswich (USA)
T4 Polynukleotid Kinase	New England Biolabs, Ipswich (USA)
Taq-DNA-Polymerase	New England Biolabs, Ipswich (USA) oder OLS, Hamburg

RNA Polymerase und Transkriptionsfaktoren:

Die Transkriptionsfaktoren TFE, TFB1, TFS und TBP von *Pyrococcus furiosus* lagen bereits gereinigt im Labor vor (Hethke et al., 1996). Rekonstituierte RNA Polymerasen (rekonstituierte Wildtyp RNA Polymerase (rekRNAP) und rekonstituierte RNA Polymerase ohne die RNA Polymerase-Untereinheiten E'/ F (RNAPΔE'F)) sowie die rekombinanten RNA Polymerase-Untereinheiten E'/F wurden freundlicherweise von Souad Naji bereitgestellt (Naji et al., 2007). TFB2 von *Pyrococcus furiosus* wurde im Rahmen von Andreas Frankes Diplomarbeit gereinigt.

1.3 Verwendete Kits

QIAquick Plasmid Maxi	Qiagen, Hilden
QIAquick Spin Miniprep	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification	Qiagen, Hilden

2. Bakterien- und Archaeenstämmen

<i>Escherichia Coli</i> , Stamm JM109	Yanish-Peron et al., 1985
<i>Pyrococcus furiosus</i> DSM3638	Fiala und Stetter, 1986

3. Plasmide

pUC19/ <i>gdh</i> -C5, -C10, -C20, -C45	Spitalny und Thomm, 2003
pUC19/ <i>gdh</i>	Hethke et al., 1996
pUC19	MBI Fermentas, Wilna (Litauen)

4. Oligonukleotide

M13F	5'-GCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA-3'
M13R	5'-GAGCGGATAACAATTTACACAGG-3'
Mat1	5'-GCTCGGTACCCGGGGATCCG-3'
Mat2	5'-CCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCG-3'
Mat3	5'-GGATTTCCACTCTTGTTTACCGA-3'
Cl+21_nt	5'-GGATTTCCACTCTTGTTTACCGAAAGCTTTATATAGGCTATTGCCC AAAAATGTATCGTTAATGAGGTAATTTGGAGC*A-3'
Cl+21_t	5'-CCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCCATA TG*C-3'
Cl+16_nt	5'-GGATTTCCACTCTTGTTTACCGAAAGCTTTATATAGGCTATTGCCC AAAAATGTATCGTTAATGAGGTAATTT*G-3'
Cl+16_t	5'-CCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCCATA TGCTCCA*A-3'
Cl+11_nt	5'-GGATTTCCACTCTTGTTTACCGAAAGCTTTATATAGGCTATTGCCC AAAAATGTATCGTTAATGAGGT*A-3'
Cl+11_t	5'-CCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCCATA TGCTCCAAATTA*C-3'
Cl+9_nt	5'-GGATTTCCACTCTTGTTTACCGAAAGCTTTATATAGGCTATTGCCC AAAAATGTATCGTTAATGAG*G-3'
Cl+9_t	5'-CCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCCATA TGCTCCAAATTACC*T-3'
ssTFE+5	5'-TTTAT*ATAGGCTATTGCCCCAAAAATGTATCGTTAA-3'
ssTFE+10	5'-TTTATATAGG*CTATTGCCCCAAAAATGTATCGTTAA-3'
ssTFE+15	5'-TTTATATAGGCTATT*GCCCCAAAAATGTATCGTTAA-3'
ssTFE+20	5'-TTTATATAGGCTATTGCCCC*AAAATGTATCGTTAA-3'
ssTFE+25	5'-TTTATATAGGCTATTGCCCCAAAAAT*GTATCGTTAA-3'
ssTFE+30	5'-TTTATATAGGCTATTGCCCCAAAAATGTATC*GTAA-3'
bubble-3_nt,	5'-CGACGGCCAGTGAATTCCGAAAGCTTTATATAGGCTATTGCCCCA TGGCACAT*A-3'
bubble_tmm	5'-CCGGACTACCTCATTAACGATACAGCCATGGGCAATAGCCTATAT AAAGCTTTCGGAATTCCTGGCCGTCG-3'
bubble_t	5'-CCGGACTACCTCTAATTGCTATGTGCCATGGGCAATAGCCTATAT AAAGCTTTCGGAATTCCTGGCCGTCG-3'
bubble1_nt	5'-ACCGAAAGCTTTATATAGGCTATTGCCCCAAAAATGTATCGCCAAT CACCTAATTTGGAG-3'
bubble1_t	5'-CTCCAAATTAGGTGATTCCGCTATGTAAAATGGGCAATAGCCTAT ATAAAGCTTTCGGT-3'
clbubble1_t	5'-CTCCAAATTAGGTGATTGGCGATACATTTTTGGGCAATAGCCTAT ATAAAGCTTTCGGT-3'
bubble10/0_nt	5'-ACTCTTGTTTACCGAAAGCTTTATATAGGCTATTGCCCCAAAAATG TATCGCCAATCACCTAATTTGGAG-3
bubble10/0_t	5'-CTCCAAATTAGGTGATTCCGCTATGTAAAATGGGCAATAGCCTAT ATAAAGCTTTCGGTAAACAAGAGT-3'

Alle mit (*) gekennzeichnete Nukleotide trugen eine Phosphorothioat Modifikation. Alle Oligonukleotide wurden mit dem Reinheitsgrad „salt free“ bestellt und nachträglich über Polyarcylamid-Gelelektrophorese (PAGE) gereinigt.

III Methoden

1. Reinigung von Oligonukleotiden mittels PAGE

Die mit dem Reinheitsgrad „salt free“ und dehydriert bestellten Oligonukleotide wurden auf eine OD von 0.2/μl in 10 mM Tris/Cl pH 8.0 resuspendiert. 20 μl dieser Lösung (entspricht einer OD von 4.0) wurden mit 6 μl 3x Auftragspuffer versetzt und einer Gelelektrophorese in einem 12% Harnstoff-PA-Gel unterzogen. Nach erfolgtem Gellauf wurde das Gel auf eine Plastikfolie transferiert und mit der Folienseite auf DC-Alufolie Kieselgel 60 F₂₅₄ positioniert. Durch Beleuchtung des Gels mit einer UV-Lampe mit Wellenlänge 254 nm konnten die Oligonukleotide in dem Gel sichtbar gemacht werden. Die Banden mit den entsprechenden Primern wurden ausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß (RG) mit vorgelegten 360 μl TE' (10:0.1) und 40 μl 3 M NaAc pH 5.2 überführt und auf einem RG-Schüttler über Nacht bei 37 °C eluiert. Nachfolgend wurde eine Standard Ethanol-Fällung durchgeführt und die pelletierten Oligonukleotide in 75 μl TE' aufgenommen. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte über ein Spectrophotometer (NanoDrop, ND-1000).

2. Reinigung der endogenen RNA Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*

100 g in einem 100 l Fermenter mit simulierten Meerwasser- und unter anaeroben Bedingungen gezüchtete und anschließend bei -80 °C eingefrorene *Pyrococcus furiosus* Zellen wurden bei 4 °C in 200 ml Lösungspuffer resuspendiert. Nach Homogenisierung mittels Ultraturrax T-25 (Janke & Kunkle) wurden die Zellen zuerst mit Ultraschall 3 x 30 s (Sonifier, Branson, USA) und anschließend mechanisch mit der French Press (2 x 1200 psi, French Pressure Cell, American Instruments Company, USA) aufgeschlossen. Nach Ultrazentrifugation (100.000 x g, 90 min bei 4 °C; OptimaTMLE-80K, Beckmann, USA) wurde der Überstand gegen Biorex+10 Puffer dialysiert und dann auf eine mit BioRex[®]70 (Bio-Rad, USA) gepackte und mit Biorex+10 Puffer äquilibrierte FPLC XK50/30-Säule aufgetragen. Die Probe wurde mit 3 Säulenvolumen (SV) Biorex+10 Puffer gewaschen und durch einen linearen Gradienten von 10 mM auf 1M KCl eluiert. Fraktionen, die in Promotor unabhängigen *in vitro* Transkriptionsansätzen DNA-abhängige RNA Polymerase Aktivitäten aufwiesen wurden vereinigt und gegen H+50 Puffer dialysiert. Nach Äquilibration einer Heparin-Sepharose HiPrep 16/10FF Säule mit H+50 Puffer erfolgte der Auftrag der dialysierten Probe. Nach Waschen der Säule mit drei SV H+50 Puffer, erfolgte die Elution mittels linearem Salzgradienten von 50 mM auf 1 M KCl in H+1000 Puffer über 15 SV. Fraktionen mit nachgewiesener RNAP-Aktivität wurden vereinigt und gegen TMK₁₀+10 Puffer dialysiert und einer Anionenaustauschchromatographie durch eine mit TMK₁₀+10 Puffer äquilibrierte MonoQTM 5/50 GL-Säule unterzogen. Die Elution erfolgte wiederum mittels linearem Salzgradienten über 20 SV von 50 mM auf 1 M KCl. Aktive Fraktionen enthielten konzentrierte und reine RNAP. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch den Bradford-Test gegen BSA (Bradford, 1976). Aliquots der RNAP wurden bei -80 °C gelagert. Alle aufgeführten Säulen stammten, wenn nicht anders angegeben, von Amersham Biosciences, UK.

Lösungspuffer:	50 mM Tris/Cl pH 8.0, 50 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 20% v/v Glycerin, 1 mM PMSF, 10 mM β-Mercaptoethanol, Complete Protease Inhibitor
Biorex+X Puffer:	40 mM KHEPES pH 7.8, X mM KCl, 2.5 mM MgCl ₂ , 20% v/v Glycerin, 1 mM PMSF, 10 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM EDTA, Complete Protease Inhibitor
H+X Puffer:	50 mM Tris/Cl pH 7.5, X mM KCl, 2.5 mM MgCl ₂ , 20% v/v Glycerin, 1 mM PMSF, 10 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM EDTA, Complete Protease Inhibitor
TMK₁₀+X Puffer:	50 mM Tris/Cl pH 8.0, X mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10% v/v Glycerin, 1 mM PMSF, 10 mM β-Mercaptoethanol, Complete Protease Inhibitor

3. Immobilisierung von *gdh*-C Kassetten für *in vitro* Transkriptions- und KMnO₄-Footprinting-Experimente

Für die *in vitro* Transkription und KMnO₄-Footprinting Experimente wurden unter Anderem immobilisierte DNA-Matrizen verwendet. Diese werden über eine 5'-Biotin Modifizierung an Streptavidin ummantelte Magnetpartikel (MP; Roche) gebunden. Diese Kopplung ermöglicht die Isolierung von ternären Transkriptionskomplexen und eine vollständige Änderung von Pufferbedingungen in nur einem Schritt. *Gdh*-C Kassetten wurde durch Amplifizierung des modifizierten *Glutamat-Dehydrogenase* Gens mittels PCR gewonnen. Dafür dienten jeweils aus *E. coli* JM109 gereinigte Plasmide pUC19/*gdh*-C5, -C10, -C20, -C45 (Spitalny und Thomm, 2003) zu je 5 ng pro PCR-Ansatz als DNA-Matrize. Des Weiteren enthielten die Ansätze jeweils 0.5 µM M13F oder Mat1 und 0.5 µM M13R oder Mat2 Primer, wobei jeweils ein Primer des Primerpaars 5'-Biotin modifiziert war. Die dNTP-Konzentration betrug 100 µM pro dNTP und die Pufferbedingungen und PCR-Programme entsprachen den empfohlenen Bedingungen der jeweils verwendeten DNA Polymerasen. Für die Bindung wurden 0.5 mg der MP mit 90 µl Waschpuffer A vermischt, die MP mittels eines Magnetpartikelseparators (MPS; Dynal) separiert und der Überstand abgenommen. Der Waschvorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt, wobei nach dem dritten Waschschrift das MP-Pellet in 90 µl Bindepuffer und 50 µl PCR-Produkt aufgenommen wurde. Es folgte eine Inkubation von 30 min bei RT auf einem Schüttler (Mixer 5432, Eppendorf) mit anschließender Separierung der MP und Abnahme des Überstands. Das Pellet wurde in 90 µl Bindepuffer und weiteren 50 µl PCR-Produkt aufgenommen und wiederum geschüttelt. Nach 30 min wurden die MP isoliert und in 90 µl Waschpuffer B aufgenommen. Nach 1 min Inkubation bei RT wurden die MP mit 90 µl Waschpuffer B gewaschen und endgültig in 100 µl TE' aufgenommen. Die so immobilisierten DNA-Matrizen konnten bei 4 °C für mehrere Monate gelagert werden. Aufgrund der Bindekapazität und Kontrolle der Absättigung der MP nach dem letzten Bindschritt auf einem Agarosegel konnte eine DNA-Konzentration ca. 56 fmol/µl vorausgesetzt werden.

Waschpuffer A: 10 mM Tris/Cl pH 7.5, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl

Bindepuffer: 50 mM Tris/Cl pH 7.5, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl

Waschpuffer B: 10 mM Tris/Cl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 M NaCl

4. *In vitro* Transkription an linearisierter Plasmid-DNA

In vitro Transkriptionsversuche wurden im zellfreien Transkriptionssystem für *Pyrococcus furiosus* nach Hethke et al., 1996 mit aufgereinigter, DNA-abhängiger endogener RNA Polymerase (endRNAP; 10 nM) oder rekonstituierten RNA Polymerasen (rekRNAP, RNAPΔE'F; 65 nM) und rekombinanten Transkriptionsfaktoren TFB1 und TBP aus *Pyrococcus furiosus* durchgeführt. 100 ng durch *Xba*I-Restriktion linearisiertes pUC19/*gdh* Plasmid (II.3) dienten als DNA-Matrize. Des Weiteren bestand ein Standard Transkriptionsansatz aus 285 nM TBP, 60 nM TFB1, jeweils 40 µM ATP, GTP, CTP, 2 µM UTP und 0,15 MBq [α-³²P]UTP (110 TBq/mmol). Wenn angegeben, enthielten die Ansätze zusätzlich variable Konzentrationen rekombinanten TFE (100 nM – 1 µM) sowie rekombinante RNAP-Untereinheiten E' (92 nM – 553 nM) und/oder F (284 nM – 1.42 µM) in Transkriptionspuffer und einem Gesamtvolumen von 25 µl. Die Inkubation erfolgte bei 70 °C, bzw. 60 °C für 30 min in einem Thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf) mit anschließender Aufreinigung der RNA-Produkte durch Phenol-Chloroform-Extraktion. Die Ansätze wurden mit Auftragspuffer versetzt und 3 min bei 95 °C denaturiert. Die Auftrennung der Transkripte erfolgte in 6%igen Polyacrylamid-Harnstoffgelen mit folgender Analyse durch Phosphoimaging (FLA-5000, Fuji, Japan).

Transkriptionspuffer: 40 mM NaHEPES pH 7.3, 250 mM NaCl, 5 mM β -Mercaptoethanol, 0.1 mM EDTA, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.1 mg/ml BSA
Auftragspuffer: 98% Formamid, 0.1% Bromphenolblau, 0.1% Xylencyanol, 10 nM EDTA, pH 8.0

5. *In vitro* Transkription an Heteroduplex *gdh*-Promotor-DNA

Um den Einfluss der beiden in *Pyrococcus furiosus* auftretenden Varianten des Transkriptionsfaktors TFB auf die Rekrutierung der RNA Polymerase an den Promotorbereich, bzw. die Rolle von TFB beim Öffnen der Transkriptionsblase bei dem Initiationsvorgang zu untersuchen, wurden *gdh*-Promotor-DNA-Matrizen verwendet, die von Dr. Michaela Bertero (Labor Prof. Cramer, LMU-Gene Center München) designiert wurden (Abb. 4, Duplex-DNA-Matrize). Außerdem wurde eine Variation dieser Matrize getestet, die strangaufwärts um 10 Nukleotide verlängert war (Abb. 4, Heteroduplex-DNA-Matrize). Für die Herstellung der Duplex-DNA-Matrize wurden die Oligonukleotide bubble1_{nt} + clbubble1_t und für die Heteroduplex-DNA-Matrize die Oligonukleotide bubble10/0_{nt} + bubble10/0_t (II.4) kombiniert. Die Hybridisierung erfolgte jeweils mit 77 pmol je eingesetztem Oligonukleotid in TE⁺ + 1 M NaCl für 3 min bei 85 °C, 15 min bei 45 °C und 15 min bei 40 °C. Danach wurden die Hybride kurz abzentrifugiert, 3 min bei 40 °C inkubiert, mittels PAGE unter nativen Bedingungen gereinigt (III.1) und anschließend bei 4 °C gelagert.

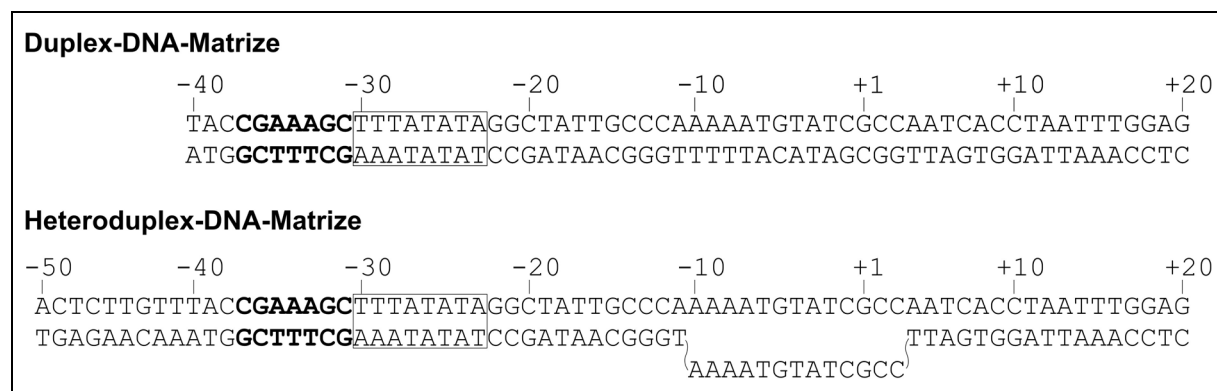


Abb. 4: Sequenz der Heteroduplex *gdh*-Promotor-DNA-Matrize mit vorgeöffneter Transkriptionsblase und der Duplex *gdh*-Promotor-DNA-Matrize. Die TATA-Box ist eingekastelt, während die Sequenz des Faktor B Recognition Elements (BRE) fett markiert ist.

Ein Transkriptionsansatz entsprach dem der „*In vitro* Transkription an linearisierter Plasmid-DNA“ (III.4), mit den Ausnahmen, dass 5 pmol Hybrid die DNA-Matrize bildeten, 11 nM endRNAP und, wenn angegeben, 47 nM TFB1, bzw. 47 nM TFB2, 285 nM TBP und 500 nM TFE eingesetzt wurden. Die Transkriptionsreaktion erfolgte bei 70 °C für 15 min und wurde Zugabe von Auftragspuffer und Hitzedenaturierung gestoppt. Die Analyse der gebildeten RNA-Produkte erfolgte durch 28%ige PA-Harnstoffgel-Elektrophorese.

6. Immobilisierte *in vitro* Transkription

6.1 Pausierte Transkription an immobilisierten *gdh*-C Kassetten zur Herstellung von RNA-Markern

Um den dynamischen Vorgang der Transkription *in vitro* pausieren zu können, wurden C-minus Kassetten des *gdh*-Promotors verwendet, die über eine Biotin-Streptavidin Bindung am 5'-Ende entweder des kodierenden oder des nicht kodierenden DNA-Strangs an Magnetpartikel gekoppelt waren. In diesen Kassetten wurden alle CTPs des kodierenden Strangs von dem Transkriptionsstartpunkt +1 bis zu den jeweiligen Positionen, an denen die Transkription pausieren sollte (+5, +10, +20 und +45), ausgetauscht (Spitalny & Thomm,

2003). In einem Transkriptionsansatz ohne CTP ermöglicht dies eine RNA-Synthese bis zu den jeweiligen Stopp-Positionen. Ein Transkriptionsansatz bestand aus 167 fmol immobilisierter DNA-Matrize (III.3), 70 nM endRNAP, 285 nM TBP, 60 nM TFB1 und 40 μ M GTP, ATP, 2 μ M UTP und 0.15 MBq [α - 32 P]UTP (110 TBq/mmol) in Transkriptionspuffer (III.4). Nach 5 min Inkubation bei 70 °C wurden die Magnetpartikel mit den ternären Komplexen isoliert, der Überstand abgenommen, das Pellet in 50 μ l Transkriptionspuffer (70 °C) gewaschen und dann in 25 μ l Transkriptionspuffer aufgenommen. Nach Zugabe von Auftragspuffer und Hitzedenaturierung wurden die Reaktionen als RNA-Marker für die entsprechenden Längen verwendet.

6.2 Immobilisierte *in vitro* Transkription pausierter ternärer Komplexe

Die Untersuchung früher Elongationskomplexe erfolgte an immobilisierten *gdh*-C20 Matrizen. 168 fmol immobilisierte DNA-Matrize wurde für 30 min bei 70 °C in Transkriptionspuffer (siehe Abschnitt III.4) mit 40 μ M GTP, ATP, 2 μ M UTP und 0.15 MBq [α - 32 P]UTP (110 TBq/mmol), 204 nM TBP, 42 nM TFB1 und entweder 45 nM recRNAP, 50 nM RNAP Δ E'F oder 23 nM endRNAP in einem Volumen von 35 μ l inkubiert. Wenn in den Abbildungen extra angegeben, wurden TFE (36 nM – 500 mM), E' (184 nM – 260 nM) und F (405 nM – 1 μ M) hinzugefügt. Nach dem Pausieren der Komplexe wurden diese mittels MPS separiert, der Überstand abgenommen und die Pellets in 35 μ l Transkriptionspuffer (70 °C) aufgenommen. Dann wurden die Reaktionen in zwei Ansätze à 15.5 μ l geteilt. In einer Hälfte wurde direkt nach Zugabe von Transkriptionspuffer (70 °C) auf 20 μ l Ansatzvolumen die Reaktion durch Zugabe von Auftragspuffer mit anschließender Denaturierung für 3 min bei 95 °C gestoppt. Die zweite Hälfte des Ansatzes wurde mit Transkriptionspuffer (70 °C), der jeweils 40 μ M GTP, CTP, UTP und ATP enthielt, auf ein Volumen von 20 μ l ergänzt. Dieser Reaktion wurde, wenn vermerkt, zusätzlich E' (Endkonzentration in 20 μ l 184 nM) oder TFE (Endkonzentration in 20 μ l 500 nM) zugegeben. Nach weiterer Inkubation für 3 min bei 70 °C wurde dieser Ansatz ebenfalls durch Hinzufügen von Auftragspuffer mit anschließender Hitzedenaturierung gestoppt. Die Analyse der RNA-Produkte erfolgte anhand von 28%iger PA-Harnstoffgel-Elektrophorese.

Die Analyse abortiver Transkripte an immobilisierten DNA-Matrizen erfolgte aus dem Überstand der separierten ternären Komplexe.

7. Direkte Kaliumpermanganat (KMnO₄)-Footprints

7.1 Herstellung von Sequenzleitern der KMnO₄-Footprinting DNA-Matrizen

Um die durch KMnO₄-Footprinting gewonnenen Daten analysieren zu können, musste ein Standard in Form von radioaktiv markierten Sequenzleitern der DNA-Matrizensequenz durch Zuhilfenahme des CycleReader™ DNA Sequencing Kits (MBI Fermentas, Wilna (Litauen)) hergestellt werden. Bei der Sequenzreaktion wird die Technik des Cycle Sequencing in Verbindung mit einer thermostabilen Reader™ Taq DNA-Polymerase verwendet, bei der durch den Einbau von Didesoxynukleotiden sequenzspezifische Kettenabbrüche erzeugt werden (Sanger et al., 1977). Als Matrize diente das Plasmid pUC19/*gdh*-C20. Als Primer wurde das Oligonukleotid [32 P] markiert, das auch bei der Herstellung der Matrize radioaktiv markiert wurde (siehe III.7.2). Der Markierungsansatz enthielt 1 μ M des entsprechenden Oligonukleotids, 10 Units (U) T4 Polynukleotid Kinase (PNK), 0.46 MBq [γ - 32 P]ATP (220 TBq/mmol) in 10 μ l PNK-Reaktionspuffer. Die Reaktion erfolgte für 30 Minuten bei 37°C mit anschließender Hitzedenaturierung. Zum Herstellen der Sequenzleitern wurde eine Stammlösung angesetzt, die 2.5 μ l des markierten Oligonukleotids, 400 ng des pUC19/*gdh*-C20 Plasmids, 2 U der Reader™ Taq-Polymerase in 30 μ l 1.3x PCR-Puffer enthielt. Jeweils

12 µl dieser Stammlösung wurden zu 4 µl vorgelegtem ddATP und ddTTP-Terminations-Mix gegeben und eine Sequenzreaktion nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Auftragspuffer mit folgender Hitzedenaturierung gestoppt.

7.2 KMnO₄-Footprints von Initiationskomplexen

Für KMnO₄-Footprinting Versuche dienten immobilisierte *gdh*-C20 Kassetten (III.3) als DNA-Matrize, die jeweils an dem freien 5'-Ende entweder des kodierenden oder des nicht kodierenden Strangs mit [γ -³²P]ATP durch PNK radioaktiv markiert wurde. Dafür wurden ungefähr 1.6 pmol immobilisierte DNA-Matrize mit 40 U PNK und 1.11 MBq [γ -³²P]ATP (220 TBq/mmol) in PNK-Puffer bei 37 °C inkubiert. Nach 30 min wurden die DNA-Matrizen separiert und der Überstand abgenommen. Die Pellets wurden mit 50 µl H₂O gewaschen und in einem Volumen H₂O aufgenommen, so dass die DNA-Konzentration 56 fmol/µl betrug. 168 fmol dieser markierten DNA-Kassetten dienten als DNA-Matrize in der KMnO₄-Footprinting Reaktion. 70 nM endRNAP oder RNAPΔE'F, 285 nM TBP, 60 nM TFB1 oder TFB2 komplettierten den Transkriptionsansatz in 25 µl Transkriptionspuffer (III.4) ohne NTPs. Außerdem enthielt der Transkriptionspuffer bei allen Schritten kein β-Mercaptoethanol. Des Weiteren war der für Wasch- oder Resuspendierungsschritte verwendete Transkriptionspuffer immer auf 70 oder 60 °C vorgeheizt. Wenn gesondert angegeben, enthielten die Reaktion zusätzlich 368 nM E' und/oder 500 nM TFE. Die Inkubation erfolgte für 5 min bei 70 oder 60 °C. Dem folgend wurden die Komplexe isoliert, mit 50 µl vorgeheiztem Transkriptionspuffer gewaschen und in 25 µl Transkriptionspuffer resuspendiert. KMnO₄ wurde auf eine Endkonzentration von 23 nM dazugegeben und die Ansätze bei der entsprechenden Transkriptionstemperatur inkubiert. Nach 5 min erfolgte die Zugabe von β-Mercaptoethanol auf eine Endkonzentration von ~ 6 % und 20 µl KMnO₄-Stoppuffer. Dann wurden die Komplexe isoliert, der Überstand verworfen, die Pellets in 18 µl H₂O und 2 µl 100% Piperidin aufgenommen und bei 90 °C für 30 min inkubiert. Der Überstand nach Separierung der Magnetpartikel wurde in ein RG mit vorgelegten 30 µl H₂O überführt, gefolgt von einer Standard Ethanol-Präzipitation. Die Resuspendierung der Pellets erfolgte mit 10 µl H₂O. Anschließend wurden die Ansätze mit Auftragspuffer versetzt und Hitzedenaturiert. Die Analyse der Reaktionen erfolgte auf einem 6%igen, bzw. 8%igen PA-Harnstoff-Sequenzgel (Sequi-Gen GT, Bio-Rad, USA).

7.3 KMnO₄-Footprints von Initiationskomplexen und Elongationskomplexen

Die Reaktionsbedingungen für KMnO₄-Footprints von Initiationskomplexen und Elongationskomplexen entsprachen mit wenigen Modifikationen denen der unter Abschnitt III.6.1 aufgeführten Bedingungen, nur dass der Transkriptionspuffer zusätzlich 10 µM ATP, GTP und 1.5 µM UTP enthielt. Außerdem wurden ausschließlich DNA-Matrizen verwendet, deren 5'-Ende des nicht kodierenden Strangs [γ -³²P]ATP markiert und über das biotinylierte 5'-Ende des kodierenden Strangs an Streptavidin ummantelte Magnetpartikel gekoppelt waren. Nach 5minütiger Inkubation bei 70 °C und Waschen der ternären Komplexe mit auf 70 °C vorgeheiztem Transkriptionspuffer erfolgte das Resuspendieren der Pellets in entweder 25 µl Transkriptionspuffer oder 25 µl Transkriptionspuffer mit 500 nM TFE. Nach einer weiteren Inkubation für 2 min bei 70 °C wurde KMnO₄ auf eine Endkonzentration von 23 nM zugegeben. Das weitere Vorgehen entspricht dem unter III.6.1 beschriebenen Ablauf.

KMnO₄-Stoppuffer: 125 mM EDTA, 1.25 % SDS

8. Bestimmung der Heparin-Stabilität offener Komplexe

In diesen kompetitiven Heparin-DNA Versuchen wurde Heparin als negativ geladenes Analogon zur eingesetzten DNA-Matrize eingesetzt. 26 nM endRNAP oder 58 nM RNAP $\Delta E'$ F wurden in einem Volumen von 50 μ l mit 285 nM TBP, 60 nM TFB1, wenn angegeben 368 nM E' und/oder 500 nM TFE und 200 ng linearisiertem pUC19/*gdh*-Plasmid in Transkriptionspuffer (III.4) bei 60 oder 70 °C vorinkubiert. Nach 5 min wurde der Reaktion Heparin auf eine Endkonzentration von 800 μ g/ml dazugegeben, um „single-round“-Bedingungen zu schaffen. 5, 15 und 60 min nach der Heparin-Zugabe wurden 10 μ l Aliquots der Startreaktion in RG mit vorgelegten 5 μ l NTP-Mix (40 μ M ATP, GTP, CTP, 2 μ M UTP, 0.09 MBq [α - 32 P]UTP (110 TBq/mmol)) in Transkriptionspuffer überführt und bei 60 oder 70 °C transkribiert. Nach 10 min wurden die Reaktionen durch das Versetzen der Proben mit Auftragspuffer und zusätzlicher Hitzedenaturierung gestoppt. Um die ursprüngliche Ausgangsaktivität aller gebildeten offenen Komplexe vor der Heparin-Zugabe zu erhalten, wurde direkt vor der Zugabe ein Aliquot von der Startreaktion genommen und mit dem NTP-Mix inkubiert wie die nach Heparin-Zugabe entnommenen Aliquots. Die Analyse der von den verbliebenen aktiven Initiationskomplexen gebildeten RNA-Produkte erfolgte in 8%igen PA-Harnstoffgelen. Der schematische Versuchsablauf ist in Abb. 5 dargestellt.

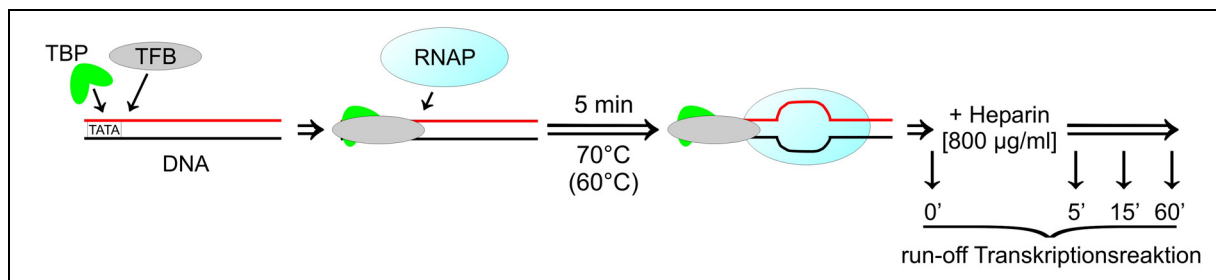


Abb. 5: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Bestimmung der Heparin-Stabilität offener Initiationskomplexe. Aliquots von gebildeten offenen Komplexen wurden vor dem Einstellen von „single-round“-Bedingungen sowie 5, 15 und 60 min nach Zugabe von Heparin entnommen und die Aktivität in run-off Transkriptionsreaktionen getestet.

9. Photochemisches Protein-DNA-Cross-Linking von Initiations- und pausierten Elongationskomplexen

9.1 Herstellung der immobilisierten Oligonukleotid-Matrize

Für die Herstellung photoaktivierbarer, doppelsträngiger DNA-Matrize diente das pUC19/*gdh*-C20 Plasmid als Amplifizierungsvorlage für die folgende PCR. Die Wahl der Primer war abhängig von dem zu untersuchenden Strang. Sollten Protein-DNA Wechselwirkungen des nicht kodierenden Stranges untersucht werden, wurde eine Kombination aus Biotin-modifiziertem Mat2 und nicht modifiziertem Mat3 Oligonukleotid verwendet. Aus dieser Kombination resultierte ein PCR-Fragment mit einer Länge von 123 bp und einer *Pst*I-Schnittstelle in dem Bereich des Mat2-Primers. Eine Untersuchung des kodierenden Stranges erforderte folgende Oligonukleotid-Kombination: biotinylierter M13F Primer und nicht-modifizierter Mat2 Primer mit einer daraus resultierenden DNA-Matrizen-Länge von 231 bp und einer *Eco*RI-Schnittstelle 21 bp stromabwärts des M13F-Primers. Die PCR-Produkte wurden gereinigt (QIAquick PCR Purification, Qiagen) und nach Herstellerangaben an Streptavidin ummantelte Magnetpartikel gebunden (Dynabeads M-280, Invitrogen). Nachfolgend wurden die DNA-Stränge mittels NaOH-Behandlung denaturiert und der immobilisierte DNA-Strang durch Separierung der Magnetpartikel isoliert und in TE' + 0.1% BSA auf eine Konzentration von 1 pmol/ μ l resuspendiert.

9.2 Synthese linearer doppelsträngiger DNA mit einer spezifisch positionierten Phosphorothioat Modifikation und angrenzender radioaktiven Markierung

Der immobilisierte Einzelstrang (III.9.1) wurde mit einem kurzen Oligonukleotid hybridisiert, das mit einer spezifischen 3' Phosphorothioat Substitution versehen war. Dieses kurze Oligonukleotid wurde im Folgenden durch den Einbau von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -dNTP und dNTPs auf die vollständige Länge des immobilisierten Oligos verlängert. Dafür wurden jeweils 10 pmol des immobilisierten und des modifizierten, kurzen Oligos hybridisiert (90 °C 2 min, 45 °C 15 min, 40 °C 15 min, kurze Zentrifugation, 40 °C 3 min) und anschließend 2.96 MBq des entsprechend einzubauenden $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -dNTPs (6000 Ci/mmol, 20 mCi/ml) und 2.5 U Klenow Fragment 3'-5' exo^- in 22 mM Tris/Cl pH 8.0, 5 mM MgCl_2 , 35 mM KCl und 1.5 mM β -Mercaptoethanol zugegeben. Die radioaktive Markierung wurde auf einem 12% PA-Harnstoff-Gel überprüft (Abb. 6, Spur 1). Nach 10minütiger Inkubation bei 40 °C wurden ein kompletter dNTP-Mix auf eine Konzentration von jeweils 800 μM pro dNTP sowie 1 U T4 DNA Polymerase hinzugefügt. Anschließend wurde die Reaktion nach 10 min Inkubation bei 40 °C durch Zugabe von EDTA auf 15 mM gestoppt.

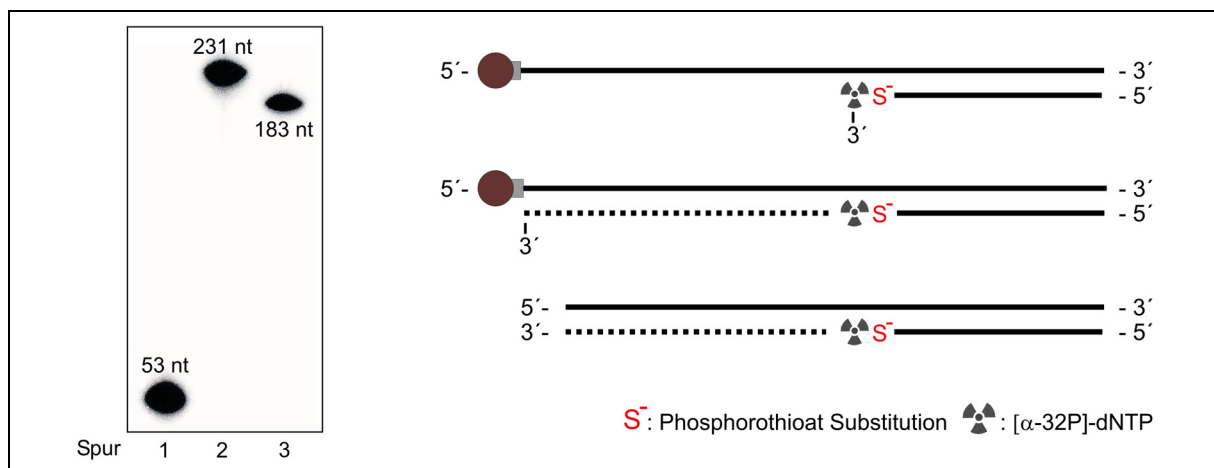


Abb. 6: Schematische Darstellung der Herstellung von DNA-Matrizen mit einer Phosphorothioat Substitution am Beispiel der Cl+16_t Matrize (rechts) mit entsprechendem Kontroll-Gelelektrophorese in einem 12%igen denaturierenden PA-Gel (links). Nach Hybridisierung des Cl+16_t Oligos wurde dieser mittels Klenow-Fragment 3'-5' exo^- und dem entsprechenden $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -dNTP radioaktiv markiert (Spur 1). Nach vollständiger Verlängerung des Oligos auf die Gesamtlänge der DNA-Matrize (231 bp) mittels T4 DNA Polymerase (Spur 2) erfolgte das Entfernen der Magnetpartikel durch Restriktionshydrolyse (Spur 3).

Die immobilisierten Matrizen wurden isoliert, der Überstand abgenommen, die Pellets mit $\text{TE}' + 0.1\%$ BSA gewaschen und in Restriktionspuffer für die folgende Restriktionshydrolyse aufgenommen, bei der die Magnetpartikel von dem DNA-Template getrennt werden.

Die Abtrennung erfolgte je nach Matrize mit 20 U *EcoRI* oder *PstI* unter den entsprechenden Pufferbedingungen. Wie die vollständige Extension des radioaktiv markierten, kurzen Oligonukleotids wurde auch die erfolgreiche Restriktionshydrolyse auf einem 12% PA-Harnstoff-Gel kontrolliert (Abb. 6, Spuren 2, 3). Anschließend wurde der Überstand nach Isolierung der Magnetpartikel sowie der Überstand eines Waschschriffs mit 50 μl TE' in ein neues RG überführt und nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion mit folgender Ethanol-Fällung in 9 μl H_2O aufgenommen.

9.3 Derivatisierung Phosphorothioat-modifizierter DNA mit Azidophenazyl Bromid (APB)

Die folgenden Schritte dienten dem Photoaktivieren der DNA-Matrize und wurden in Dunkelheit mit einer roten Sicherheits-Lichtquelle durchgeführt. Zu dem resuspendierten

Pellet aus III.9.2 wurde Triethylammonium Bicarbonat Puffer (TEAB), pH 8.0 auf eine Endkonzentration von 100 mM und 1.5 Volumen 100 mM in Acetonitril aufgenommenes APB zugegeben und die Reaktion für 3-4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden 800 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) (PCI) und 190 µl H₂O zugegeben. Nach heftigem Mischen und kurzem Abzentrifugieren wurde die wässrige Phase in ein neues Gefäß mit vorgelegten 800 µl PCI überführt. Einem weiteren Mischen und Zentrifugieren folgte eine Standard Ethanol-Fällung der wässrigen Phase mit anschließender Resuspendierung der DNA-Pellets in 20 µl TE' und Quantifizierung der radioaktiv markierten DNA mittels Szintillations-Zähler (TriCarb Liquid Scintillation Analyzer, Packard, USA).

9.4 Photochemisches DNA/Protein-Cross-Linking

Die Ansätze für photochemische DNA/Protein-Cross-Linking Experimente beinhalteten 2 nM photoaktivierbare DNA-Matrizen, 46 nM endRNAP, 20 nM TBP, 60 nM TFB1, 600 ng unspezifische Hering-Sperma-Kompetitions-DNA und, wenn zusätzlich angegeben, außerdem 140 nM oder 500 nM TFE in TP (III.4) ohne β-Mercaptoethanol und BSA. Um pausierte Komplexe zu erhalten, enthielt der Ansatz außerdem 40 µM ATP, GTP und UTP; für Untersuchungen der Initiationskomplexe erfolgte keine NTP Zugabe. Nach 3minütiger Inkubation bei 70 °C erfolgte die Zugabe von spezifischer Kompetitions-DNA (*gdh*-Promotor DNA bp -164 bis bp +113) auf 400 nM. Nach weiteren 2 min Inkubation bei 70 °C wurden die Proben bei 70 °C für 7 min mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt und danach auf Eis abgekühlt.

9.5 Nuklease-Behandlung der Cross-Linking Reaktionen

Um die DNA zu entfernen, die nicht an die endRNAP kovalent gebunden hatte, wurde diese mittels DNaseI und S1 Nuklease, bzw. DNaseI und S7 (Micrococcus-) Nuklease entfernt. In ersterem Fall wurden die Reaktionen mit 5.5 U DNaseI (verdünnt in DNaseI-Puffer) versetzt und 10 min bei 37 °C inkubiert. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von 0.8 µl 10% SDS mit anschließender Inkubation für 3 min bei 90 °C gestoppt. Nach Zugabe von 1.6 µl 12x Zn/HOAc und 8 U S1 Nuklease (verdünnt in S1 Nuklease-Puffer) wurden die Reaktionen weitere 10 min bei 37 °C inkubiert. Das Stoppen dieser Reaktion erfolgte durch Zugabe von SDS-Auftragspuffer mit anschließender Hitzedenaturierung. Die Restriktions-Reaktion mit DNaseI und S7 Nuklease erfolgte durch eine gleichzeitige Zugabe von 10 U DNaseI mit 10 U S7 Nuklease (verdünnt in Nuklease-Puffer) und einer Inkubationszeit von 20 min bei 37 °C. Auch hier erfolgte das Stoppen der Reaktion durch Zugabe von SDS-Auftragspuffer mit anschließender Hitzedenaturierung. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte in 4-19%igen SDS-PA-Gradientengelen. Nach dem Gellauf wurden die Gele in H₂O/Ethanol/Essigsäure (60:30:10) für 1 Stunde fixiert und anschließend getrocknet. Als Protein-Standards dienten „Prestained Protein Molecular Weight Marker“ und „Kaleidoscope Prestained Standards“ (II.1.2).

DNaseI-Puffer:	40 mM Tris/Cl pH 8.0, 7 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 50% Glycerin (v/v), 5 mM CaCl ₂ , 0.1 mg/ml BSA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml Pepstatin, 1 µg/ml Leupeptin
12x Zn/HOAc:	12.5 mM ZnSO ₄ , 3% Essigsäure
S1 Nuklease-Puffer:	20 mM Tris/Cl pH 7.5, 50 mM NaCl, 50% Glycerin (v/v), 0.1 mM ZnSO ₄ , 0.1 mg/ml BSA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml Pepstatin, 1 µg/ml Leupeptin
Nuklease-Puffer:	52 mM mM Tris/Cl pH 8.0, 50 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl, 20% Glycerin (v/v), 52 mM CaCl ₂ , 20 mM β-Mercaptoethanol, 1 mg/ml BSA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml Pepstatin, 1 µg/ml Leupeptin

10. Photochemisches DNA/Protein-Cross-Linking an Heteroduplex-DNA

Anders als in Abschnitt III.9 aufgeführt, dienten bei diesen Reaktionen kurze Oligos als DNA-Matrizen. Das Oligo bubble-3_nt, welches eine Cross-Linking Modifikation an Position -3 relativ zum Transkriptionsstartpunkt +1 aufwies, war 5'-biotinyliert und verfügte über eine *EcoRI*-Schnittstelle 10 Basen stromabwärts des 5'-Endes und bildete nach radioaktiver Markierung und Verlängerung den nicht kodierenden Strang des DNA-Konstrukts (Abb. 7). Dafür wurde das entsprechende Oligo nach Hersteller-Protokoll an Streptavidin ummantelte Magnetpartikel gekoppelt und anschließend mit dem Oligo bubble_t hybridisiert (III.9.2). Die Markierung mit [α - 32 P]-dNTP und Verlängerung des Oligos durch dNTPs auf die endgültige Länge erfolgte wie im Abschnitt III.9 beschrieben. Nach Waschen der DNA-Doppelstränge mit TE'+0.1% BSA wurden die Stränge durch 10minütige Behandlung mit 0.1 N NaOH bei 37 °C getrennt und der radioaktiv markierte, verlängerte und immobilisierte Strang separiert und gewaschen. Im Anschluss wurden 10 pmol dieses DNA-Strangs mit 10 pmol des Oligos bubble_tmm wie in III.9.2 beschrieben hybridisiert. Die entsprechende doppelsträngige DNA-Matrize wies daraufhin einen Heteroduplex-Bereich im Bereich -6 bis +6 relativ zu dem Transkriptionsstartpunkt bei +1 auf. Der Hybridisierung folgte das Abtrennen der Magnetpartikel durch *EcoRI*-Restriktion. Nach folgender PCI-Extraktion und Ethanol-Fällung wurde das DNA-Pellet in 9 μ l H₂O aufgenommen. Die weitere Derivatisierung der Phosphorothioat-modifizierten DNA mit APB erfolgte wie in Abschnitt III.9.3 beschrieben.

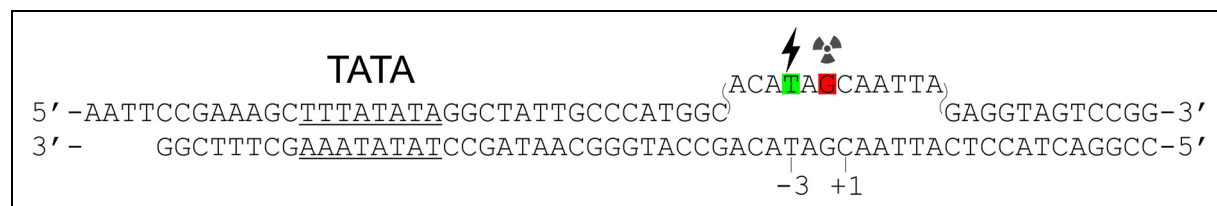


Abb. 7: *gdh*-Promotor DNA-Matrize nach *EcoRI*-Schnitt mit Heteroduplex-Bereich in der Region der Transkriptionsblase (bp -6 bis bp +6) photoreaktiver Modifikation an Position -3 mit benachbarter radioaktiver Markierung an Position -1 jeweils relativ zum Transkriptionsstartpunkt bei +1.

10.1 Native endRNAP-Shifts

2 nM der nach Abschnitt III.10 gewonnenen Heteroduplex-DNA-Matrize wurden mit unterschiedlichen Mengen endRNAP (100 – 1000 ng) bei 70 °C in TP ohne β -Mercaptoethanol und BSA inkubiert. Nach 5 min erfolgte eine 7minütige Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm) mit anschließender Zugabe von nativem Auftragspuffer und Analyse der Shifts durch 5%ige native Gelelektrophorese (Bartlett et al., 2000).

10.2 Photochemisches DNA-Protein-Cross-Linking von TFE und endRNAP an Heteroduplex-DNA

In TP ohne β -Mercaptoethanol und BSA wurden 2 nM Heteroduplex-DNA-Matrize alleine oder mit 105 nM endRNAP bei 70 °C inkubiert. Nach 3 min wurde TFE auf eine Endkonzentration von 1.9 μ M zugegeben und weitere 2 min bei 70 °C inkubiert. Das weitere Vorgehen entsprach dem in Abschnitt III.9.5.

10.3 Transkription an photoaktivierbarer Heteroduplex-DNA-Matrize

Um zu zeigen, dass die Heteroduplex-Konstrukte nicht nur von der RNAP gebunden, sondern auch spezifisch transkribiert werden, wurden Transkriptionsversuche an der Matrize durchgeführt. In 12.5 μ l Ansätzen wurden 500 ng endRNAP mit 2 nM der DNA-Matrize in

TP ohne β -Mercaptoethanol und BSA, dafür mit 600 ng unspezifischer Herings-Sperma-DNA, 40 μ M ATP, GTP, CTP, 2 μ M UTP und 0.075 MBq [α - 32 P]UTP (110 TBq/mmol) für 30 min bei 70 °C inkubiert. Dann wurde der Ansatz auf 25 μ l mit H_2O_{bd} aufgefüllt und die RNA-Produkte anschließend durch Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Die Ansätze wurden mit Auftragspuffer versetzt, 3 min bei 95 °C denaturiert und in 28%igen Polyacrylamid-Harnstoffgelen analysiert

11. Photochemisches DNA-Protein-Cross-Linking von TFE an einzelsträngiger DNA

Um unspezifische Cross-Links von TFE an einzelsträngiger DNA nachzuweisen, wurden [γ - 32 P]ATP markierte, einzelsträngige DNA Oligos (*gdh*-Promotor Basen -30 bis +4) mit jeweils einer Phosphorothioat Modifikation an spezifischen Positionen (+5, +10, +15, +20, +25, +30 relativ zu dem 5'-Ende des Oligos) (Abb. 8) an diesen Positionen mit APB derivatisiert (III.9.3). 1 μ M eines äquimolaren Gemischs aus allen sechs photoaktivierten Oligos wurde mit 1.9 μ M TFE, den RNAP-Untereinheiten F, E' oder L für 5 min in einem Volumen von 12.5 μ l bei 70 °C in TP ohne β -Mercaptoethanol und BSA inkubiert. Anschließend erfolgte eine Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm) bei 70 °C. Nach 5 min Inkubation wurden die Reaktionen mit SDS-Auftragspuffer versetzt, Hitzedenaturiert und in 4-19%igen SDS-PA-Gradientengelen analysiert.

[γ - 32 P]-ATP	5'-TTTAT [*] ATAGGCTATTGCCCAAAAATGTATCGTTAA-3'
[γ - 32 P]-ATP	5'-TTTATATAG [*] CTATTGCCCAAAAATGTATCGTTAA-3'
[γ - 32 P]-ATP	5'-TTTATATAGGCTAT [*] GCCCAAAAATGTATCGTTAA-3'
[γ - 32 P]-ATP	5'-TTTATATAGGCTATTGCCCA [*] AAAATGTATCGTTAA-3'
[γ - 32 P]-ATP	5'-TTTATATAGGCTATTGCCCAAAAAT [*] GTATCGTTAA-3'
[γ - 32 P]-ATP	5'-TTTATATAGGCTATTGCCCAAAAATGTAT [*] GTAA-3'

Abb. 8: Als Matrize für den Nachweis von unspezifischer TFE-Bindung an einzelsträngige DNA diente ein äquimolarer Mix aus 5'-radioaktiv markierten und azidophenylisierten Oligos (Positionen der photoaktiven Modifikationen sind durch Sternchen und rot gekennzeichnet).

IV Ergebnisse

1. Charakterisierung der stimulierenden Wirkung des E'/F-Heterodimers auf die Transkription des Core-Enzyms der RNA Polymerase bei niedrigen Temperaturen

Die Möglichkeit, das Core-Enzym der RNAP aus rekombinant in *E. coli* exprimierten Untereinheiten ohne die Untereinheiten E' und F in absoluter Reinheit zu rekonstituieren, ermöglichte es, die Effekte von E' und F in der Promotor-abhängigen *in vitro* Transkription zu analysieren.

Während alleine die Deletion des eukaryotischen Orthologs von E', RPB7, in Hefe unter normalen Wachstumsbedingungen letal ist (McKune et al., 1995), zeigte das Core-Enzym aus *Pyrococcus furiosus* ohne die Untereinheiten E' und F unter Standard Reaktionsbedingungen eine zwar reduzierte, aber dennoch signifikante Transkriptionsaktivität in *in vitro* Transkriptionsversuchen an dem *Glutamat-Dehydrogenase-(gdh)*-Promotor (Naji. et al., 2007 *J Biol Chem*). Wenigstens in dem hyperthermophilen *P. furiosus* ist der E'/F-Subkomplex also nicht für eine Promotor-gerichtete *in vitro* Transkriptions-Reaktion bei 70 °C essentiell.

1.1 Die Untereinheit E' stimuliert die Transkription bei niedrigen Reaktions-Temperaturen

Proteomische Daten zeigen, dass die Untereinheit E' in dem methanogenen *Methanococcoides burtonii* bei niedrigen Wachstumstemperaturen gesteigert exprimiert wird (Goodchild et al., 2004), was eine spezifische Rolle dieser Untereinheit bei der Transkription bei suboptimalen, niedrigen Temperaturen vermuten ließ. Diese Möglichkeit war Ursprung der Untersuchung des Effekts von E', bzw. von E' im Komplex mit F als Heterodimer auf die Transkriptionsaktivität der endogenen (end) und rekonstituierten Wildtyp (rek) RNAP sowie des 9-Untereinheiten Core-Enzyms der RNAP (RNAP Δ E'F).

Dafür wurde die Transkription des *gdh*-Promotors durch die oben genannten RNA Polymerasen in dem zellfreien Transkriptionssystem bei unterschiedlichen Temperaturen und E'-Konzentrationen untersucht.

Bei einer Inkubationstemperatur von 55 °C wies die endRNAP nur eine sehr schwache Transkriptionsaktivität auf, die auch nur geringfügig durch die Zugabe steigender Konzentrationen E' (100 ng = 184 nM Endkonzentration (EK), 200 ng = 368 nM EK, 300 ng = 553 nM EK) heraufgesetzt werden konnte (Abb. 9 A, Spuren 1-4). Bei einer Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 60 °C führte die Zugabe von E' zu einer deutlichen Zunahme der basalen Transkriptionsaktivität. Die Stimulation der Transkription war bei einer E'-Konzentration von 553 nM pro Ansatz maximal, was einem molaren Verhältnis RNAP zu E' von 1:55 entspricht (Abb. 9 A, Spur 8). Unter Standard Bedingungen bei 70 °C war die basale Transkriptionsaktivität hoch und wurde nur moderat durch Zugabe von E' gesteigert (Abb. 9 A, Spuren 9-12). Diese ersten Versuche ließen einen spezifischen Effekt der Untereinheit E' auf die Transkription bei niedrigen Temperaturen vermuten, der bei 60 °C Inkubationstemperatur am deutlichsten war. Dementsprechende wurde die Transkription bei 60 °C im Folgenden detailliert untersucht.

Die Zugabe von E' zu Transkriptionsansätzen an linearisierter *gdh*-Promotor-DNA mit der rekRNAP bei 60 °C führte zu einer deutlichen Steigerung der Transkriptionsaktivität des rekonstituierten Enzyms. So führte die Zugabe von 200, bzw. 300 ng E' zu einer ungefähr 3-fachen Stimulation der Aktivität (Abb. 9 B, Spuren 4 und 5). Auffällig war hier der deutlichere Effekt von E' im Vergleich zu der stimulierenden Wirkung von E' auf die Transkriptionsaktivität der endRNAP bei 60 °C. Dieser konnte dadurch erklärt werden, dass

die rekonstituierte RNAP im Gegensatz zu der aus *P. furiosus* gereinigten RNAP, die Untereinheiten E' und F in substöchiometrischen Mengen enthält (Naji et al., 2007 *J Biol Chem*) und die Zugabe von E' den Mangel an E'/F Subkomplexen ausgleicht.

368, bzw. 553 nM E' in den Transkriptionsansätzen hatte eine ungefähr 7-fache Steigerung der RNA-Synthese durch das Core-Enzym der RNAP (Abb. 9 B, Spuren 9 und 10) zur Folge, dem neben der Untereinheit E' auch die Untereinheit F fehlt. Da aus den beiden Untereinheiten ein spezifischer Subkomplex gebildet wird, der mit dem Kern (= Core) der RNAP interagiert, wurde auch der Effekt von F auf die stimulierende Wirkung von E' untersucht.

Die Zugabe von 100 ng (284 nM) und 500 ng (1.42 μ M) der Untereinheit F zu Promotor-abhängigen Transkriptionsversuchen mit 65 nM RNAP Δ E'F und 368 nM E' hatte keine signifikante Zunahme der Transkriptionsaktivität zur Folge (Abb. 9 C), was den Schluss zuließ, dass für die E' induzierte Aktivierung der Core-RNAP bei 60 °C das Vorhandensein von F keine Voraussetzung darstellt. Im Gegensatz dazu ist bei suboptimalen Temperaturen die Transkriptionsaktivität der RNAP und im Besonderen des Core-Enzyms strikt von der Gegenwart von E' abhängig.

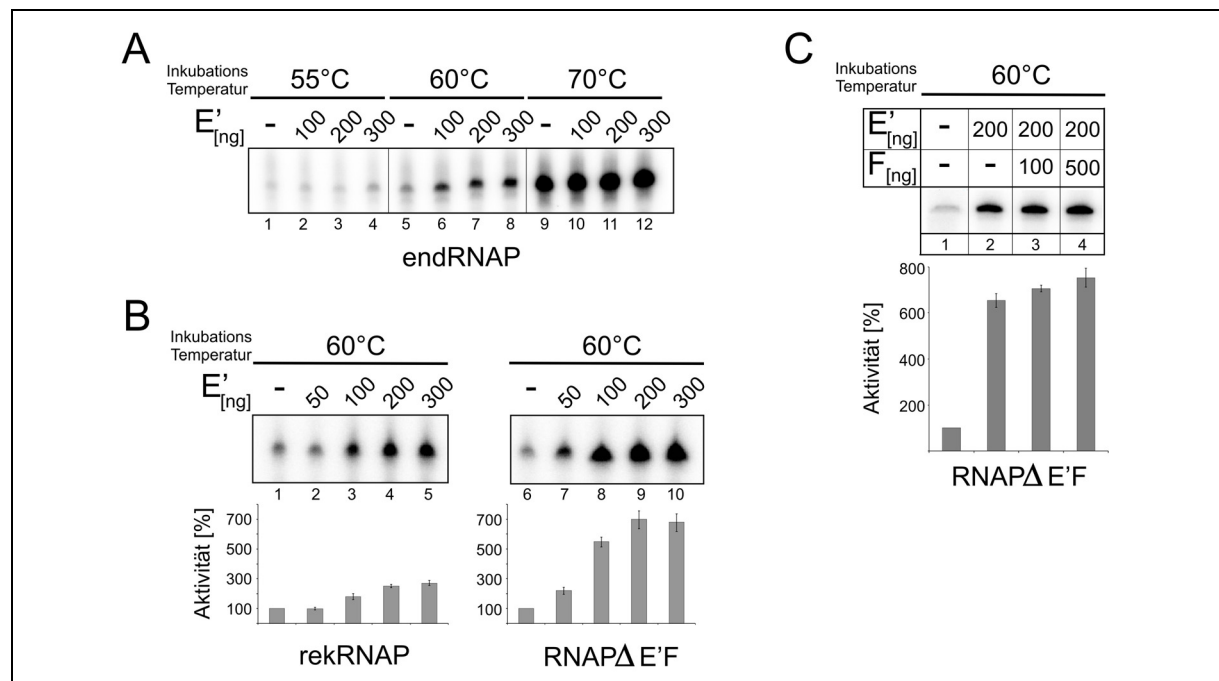


Abb. 9: A, Stimulation der Transkription der endRNAP durch E'. Der Transkriptionsreaktion wurden steigende Mengen E' zugegeben und die RNA-Synthese bei 55, 60 und 70 °C analysiert. Die jeweils eingesetzte Menge E' ist über dem Gel angegeben. B, E' induzierte Transkription durch die rekonstituierte (rek)RNAP und die RNAP Δ E'F. Der Versuchsablauf entsprach dem in A angegeben, nur dass die endRNAP jeweils durch 65 nM rekRNAP oder das Core-Enzym ersetzt und der stimulierende Effekt von E' (92, 184, 368 und 553 nM) auf die Transkription in 6%igen PA-Harnstoffgelen analysiert wurde. Die Aktivität wurde durch die Quantifizierung der Signalstärke unter den Gelen dargestellt. C, Die Untereinheit F hat keinen signifikanten Effekt auf die E' induzierte Aktivierung. Steigende Konzentrationen von F (Spur 3: 284 nM, Spur 4: 1.42 μ M) wurden zu Transkriptionsansätzen mit 65 nM RNAP Δ E'F und 368 nM E' (Spuren 2-4) gegeben und die gebildeten run-off RNA-Produkte untersucht.

1.2 Die stimulierende Wirkung von E' auf die Transkription basiert auf Vorgängen während der Initiation

Um zu testen, ob die stimulierende Wirkung von E' auf die RNAP bei niedrigen Temperaturen auf Effekte während der Elongation beruht, wurde E' bei unterschiedlichen Temperaturen zu pausierten ternären Komplexen des Core-Enzyms gegeben. Um diese zu

erhalten, wurden immobilisierte DNA-Matrizen des *gdh*-Promotors verwendet, auf der in einer Transkriptionsreaktion vom Transkriptionsstartpunkt +1 bis zur Position +20 kein CTP benötigt wird (III.3). Nach dem Pausieren der RNAP Δ E'F-Elongationskomplexe wurden diese isoliert, gewaschen und in TP aufgenommen. Die Reaktionen in den Spuren 1 und 4 der Abbildung 10 wurden direkt nach dem Resuspendieren durch Zugabe von Formamid (98%)-Auftragspuffer denaturiert. Den in den Spuren 2-3 und 5-6 analysierten Reaktionen wurde ein vollständiger NTP-Mix zugegeben und die Komplexe in An- und Abwesenheit von 184 nM E' bei 70 °C (Abb. 10, Spuren 2-3) und bei 60 °C (Abb. 10, Spuren 5-6) inkubiert.

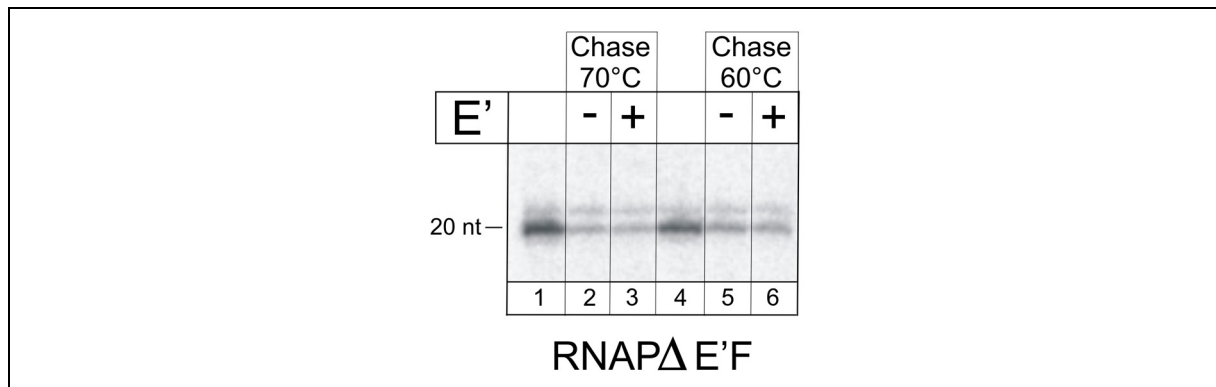


Abb. 10: Die Untereinheit E' hat keinen Einfluss auf die Elongation der Transkription. An immobilisierten Matrizen wurden Elongationskomplexe der RNAP Δ E'F an Position +20 durch CTP-Mangel pausiert. Die Initiationsreaktionen enthielten 65 nM RNAP Δ E'F, 285 nM TBP und 60 nM TFB. Die pausierten ternären Komplexe wurden isoliert und die Komplexe in den Spuren 1 und 4 direkt denaturiert, während die Komplexe in den Spuren 2 und 5 durch Zugabe des vollständigen NTP-Mixes die Transkription teilweise wieder aufnehmen konnten. Die Bande bei 20 nt in diesen Spuren zeigt Komplexe, die die Transkription nicht wieder aufnehmen konnten. Der Effekt von E' auf pausierte Komplexe wurde in den Spuren 3 und 6 analysiert. Der Gellauf erfolgte in 28%igen PA-Harnstoffgelen.

Die Zugabe von E' zu den isolierten ternären Komplexen führte weder bei 70 °C, noch bei 60 °C zu einem Effekt, bzw. einer Abnahme des 20 nt RNA-Produkts (Abb. 10, Spuren 3 und 6) im Vergleich zu den Reaktionen, die ohne E' inkubiert wurden (Abb. 10, Spuren 2 und 5). Somit hat die Zugabe von E' zu pausierten Elongationskomplexen keine Auswirkungen auf den Anteil der RNA Polymerasen, der die Transkription nach Zugabe eines vollständigen NTP-Mixes wieder aufnehmen können. Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass die stimulierende Wirkung von E' auf die Transkription in der Initiation begründet liegt.

1.3 TFE verstärkt die E' induzierte Aktivierung der Transkription

Da vor der Durchführung dieser Arbeit kaum Indizien dafür existierten, dass der archaeelle Transkriptionsfaktor TFE komplexiert mit elongierten Transkriptionskomplexen vorliegt, sondern die bisher beobachteten Effekte eher auf eine vereinfachte Initiation zurückgeführt wurden, wurde eine potentielle Interaktion von TFE mit E' und F während der Transkriptionsinitiation untersucht.

In Standard Transkriptionsversuchen an linearisierter *gdh*-Promotor-DNA bei 70 °C führte die Zugabe von 250 ng TFE zu einer ~1.5-fachen Stimulation der Transkription (Abb.11 A, Spur 3), ein Ausmaß, das bereits an anderen Promotoren beobachtet werden konnte (Bell et al., 2000). Diese Aktivierung konnte durch die zusätzliche Zugabe von 200 ng E' weiter leicht gesteigert werden (Abb. 11 A, Spur 2).

Um die Effekte von TFE auf die Aktivität der RNAP Δ E'F zu untersuchen, wurden steigende Mengen TFE zu Reaktionen bei 70 °C, respektive 60 °C beigelegt. Bei einer Inkubationstemperatur von 70 °C konnte nur ein geringer stimulatorischer Effekt von TFE auf die Transkription beobachtet werden, der bei einer TFE-Konzentration von 500 nM am

größten war (~ 1.2 -fach; dargestellt in Abb. 11 B, oberes Panel, Spuren 1-5 und Diagramm unter dem Gel). Die Transkriptionsaktivität der RNAP Δ E'F bei 60 °C wurde durch TFE ungefähr 1.8-fach gesteigert. Der Effekt war bei einer TFE-Konzentration von 500 nM maximal (Abb. 11 B, unteres Panel, Spur 4) und konnte durch höhere Konzentrationen TFE nicht weiter gesteigert werden (Abb. 11 B, unteres Panel, Spur 5).

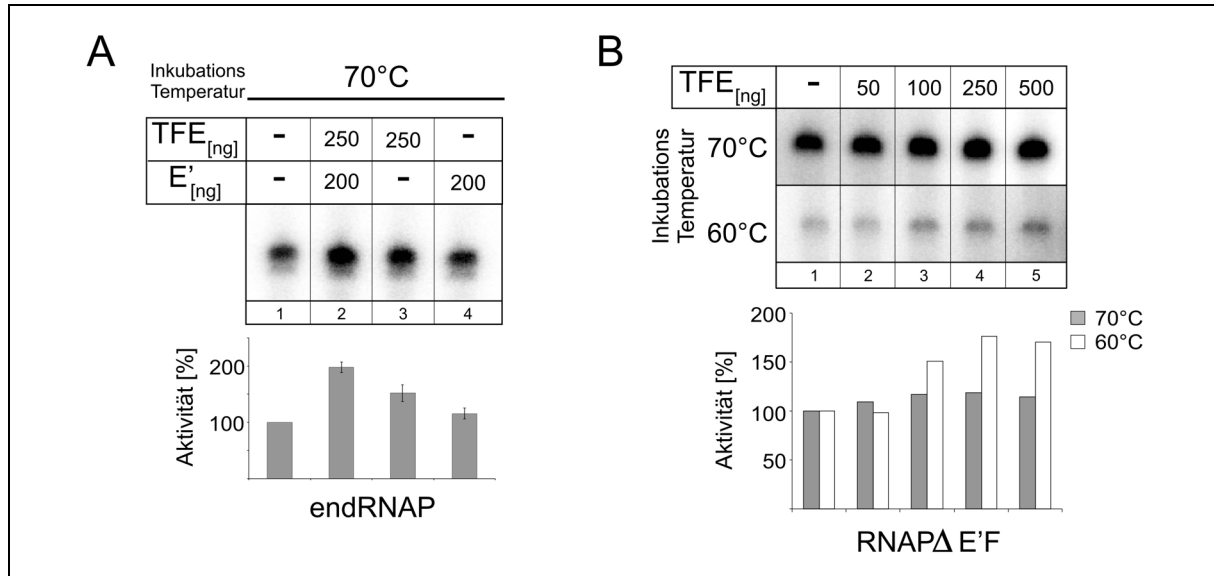


Abb. 11: A, Stimulation der run-off Transkription durch TFE alleine und mit E'. TFE wurde entweder alleine (Spur 3) oder in Kombination mit E' (Spur 2) zu Transkriptionsansätzen mit der endRNAP an *gdh*-Promotor-DNA Matrizen gegeben und die Aktivität quantifiziert. B, TFE stimuliert die Transkription bei 60 °C um das 2-fache. Transkriptionsexperimente wurden wie in A beschrieben mit 65 nM RNAP Δ E'F bei 60 sowie 70 °C durchgeführt und steigende TFE Konzentrationen (100, 200, 500 nM und 1 μ M) zugegeben. Der Effekt auf die Transkription wurde in 6%igen PA-Harnstoffgelen analysiert und die Signale quantifiziert.

Um den Effekt von TFE auf die E'-induzierte Aktivierung der Transkription bei 60 °C zu untersuchen, wurde TFE in Promotor-gerichtete Transkriptionsreaktionen mit dem Core-Enzym, E', F oder der Kombination E'/F eingesetzt (Abb. 12).

Die 7-fache Stimulation der RNAP Δ E'F durch E' (Abb. 9 und Abb. 12 A, Spur 10) konnte durch 500 nM TFE auf eine ~ 14 -fache Aktivierung gesteigert werden (Abb. 12 A, Spur 3). Die Aktivität des Core-Enzyms konnte weiter durch eine Inkubation mit E', F und TFE auf das ~ 25 -fache verstärkt werden (Abb. 12 A, Spuren 2 und 9). Diese 25-fache Verstärkung wurde bei TFE-Konzentrationen von 200 nM und 500 nM (Abb. 12 B, Spuren 2 und 3) festgestellt und verringerte sich bei höheren TFE-Konzentrationen auf eine 20-fache Stimulation (1 μ M; Abb. 12 B, Spur 4). Der ~ 1.8 -fache stimulierende Effekt von TFE auf die Transkription des Core-Enzyms bei 60 °C (Abb. 11 B; 12 A, Spur 7 und 12 B, Spur 5) konnte durch die alleinige Zugabe von F nicht gesteigert werden (Abb. 12 A, Spur 4). Das Hinzufügen der Untereinheit F alleine zu Reaktionen der RNAP Δ E'F führte zu keiner Aktivierung der Transkription, weder nach Zugabe von 100 ng, noch 500 ng F (Abb. 12 A, Spuren 5 und 6).

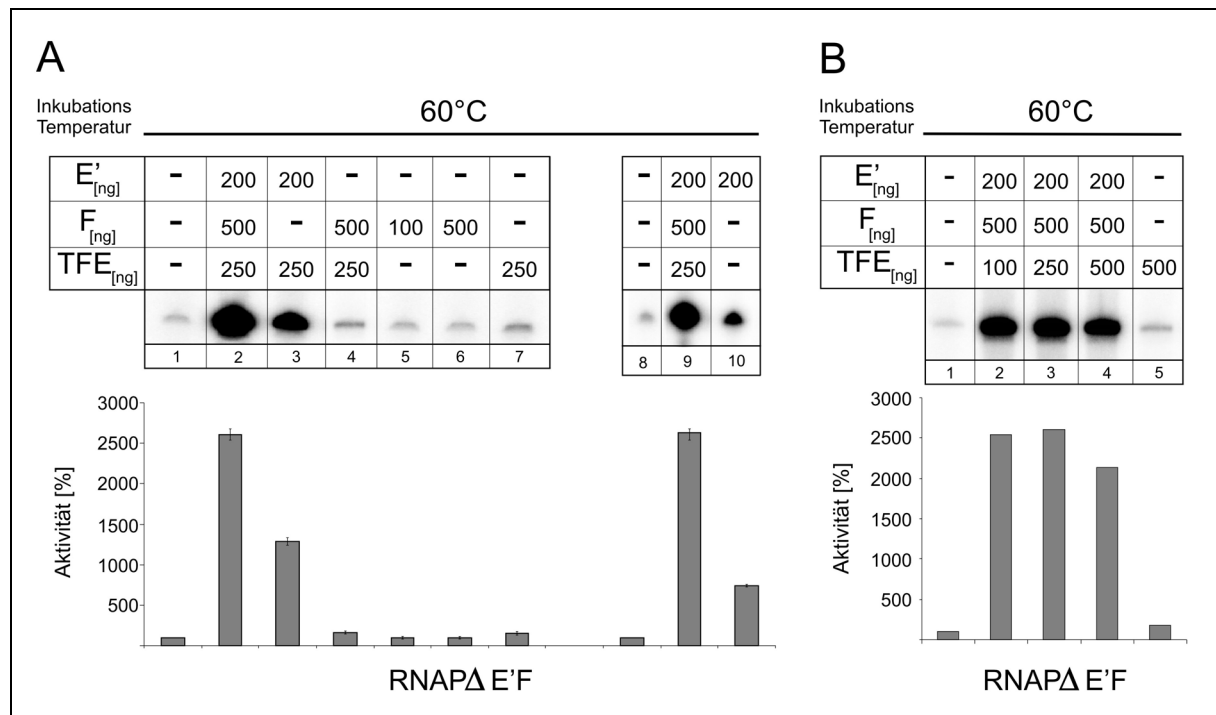


Abb. 12: *A*, Die Untereinheiten E' , F und TFE interagieren bei der Aktivierung der Transkription synergetisch. Bei 60°C wurde der Effekt von 500 nM TFE , 368 nM E' , 284 nM und $1.42\ \mu\text{M}$ F und verschiedenen Kombinationen der Faktoren auf die Transkription der $\text{RNAP}\Delta E'F$ untersucht. *B*, Der stimulierende Effekt von TFE auf die Aktivität der $\text{RNAP}\Delta E'F$ wird dramatisch durch die Anwesenheit des E'/F -Subkomplexes verstärkt. Wie angegeben, wurden unterschiedliche Mengen TFE zu Transkriptionsansätzen der $\text{RNAP}\Delta E'F$ und E'/F gegeben und der stimulatorische Effekt in 6%iger PA-Harnstoffgelelektrophorese analysiert und quantifiziert.

Diese Befunde wiesen darauf hin, dass der stimulatorische Effekt von TFE auf die Transkriptions-Aktivität zwar primär durch die Untereinheit E' vermittelt, aber durch das Vorhandensein des E'/F -Heterodimers signifikant gesteigert wird. Während die Untereinheit F nur einen geringen Effekt auf die stimulatorische Aktivität der Unterheit E' in der Transkription mit dem Core-Enzym hat, ist die $\text{RNAP}\Delta E'F$ in Kombination mit E' und F deutlich empfänglicher für eine TFE induzierte Stimulation als in Kombination mit E' alleine. Dies deutet auf eine wichtige Rolle der Untereinheit F in der Vermittlung der stimulatorischen Aktivität von TFE auf die Transkription hin.

In Transkriptionsreaktionen unter Standard *in vitro*-Bedingungen bei 70°C war der stimulierende Effekt von TFE auf die E' -induzierte Aktivierung der $\text{RNAP}\Delta E'F$ -Transkription gering. Während E' die Transkriptionsaktivität des Core-Enzyms um das ~ 1.5 -fache steigerte (Abb. 13, Spuren 8-10), führte eine Co-Inkubation von E' mit TFE zu einer ~ 1.8 -fachen Aktivitätszunahme (Abb. 13, Spur 3), die durch zusätzliche Zugabe von F auf eine ~ 2 -fache Stimulation der Transkription weiter verstärkt werden konnte (Abb. 13, Spur 2). Die Zugabe von F , bzw. TFE alleine zu Transkriptionsexperimenten mit der $\text{RNAP}\Delta E'F$ führte zu keiner Aktivitätssteigerung (Abb. 13, Spuren 5, 6). Wie bereits in Abschnitt IV.1.1 für die RNA-Synthese bei 60°C beschrieben, führte auch bei 70°C eine Co-Inkubation von F mit E' und dem Core-Enzym zu keinem Anstieg der Aktivität im Vergleich zu der ca. 1.5 -fachen Stimulation der $\text{RNAP}\Delta E'F$ -Transkription durch E' alleine (Abb. 13, Vergleich Spuren 7 mit 8-10).

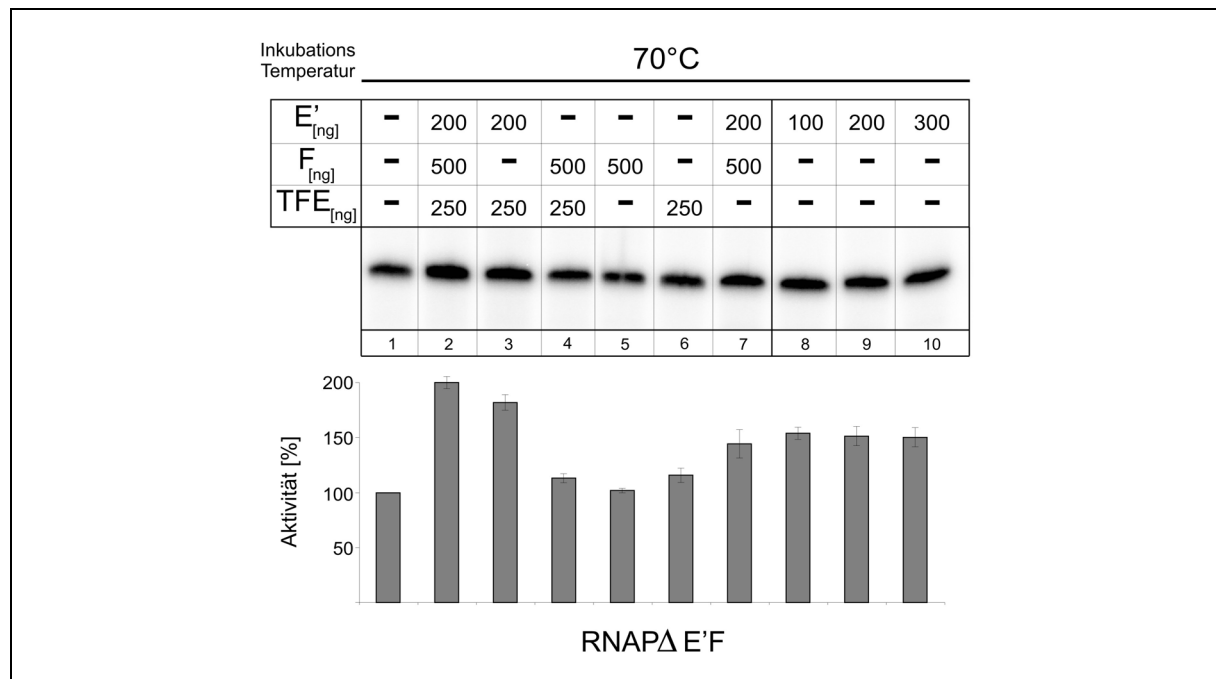


Abb. 13: TFE und E' in Kombination aktivieren das Core-Enzym 2-fach in Transkriptionsreaktionen bei 70 °C. Der Effekt der Untereinheiten E' (184-553 nM), F (1.42 μM) und des Transkriptionsfaktors TFE (500 nM) alleine und in Kombination der Faktoren auf die Transkription bei 70 °C wurde in 6%igen PA-Harnstoffgelen untersucht und die Aktivität in dem Diagramm unter dem Gel dargestellt.

2. Die RNAP-Untereinheit E' und TFE stimulieren die Ausbildung des offenen Komplexes

Die Ergebnisse, dass E' einen stark stimulierenden Effekt auf die Transkription bei niedrigen Inkubations-Temperaturen, einen geringen Effekt auf die Transkription bei 70 °C und keinen Einfluss auf pausierte ternäre Komplexe hat, ließ vermuten, dass E' eine bedeutende Rolle während der Initiation, insbesondere bei der Ausbildung eines transkriptionsfähigen offenen Komplexes einnimmt.

Dafür wurde die Ausbildung des offenen Komplexes durch die endogene RNAP sowie die RNAPΔE'F bei 70 °C, bzw. 60 °C in Ab- und Anwesenheit von E' anhand von Kaliumpermanganat (KMnO₄)-Footprinting Experimenten untersucht. Als DNA-Matrize diente immobilisierte und modifizierte *gdh*-Promotor-DNA, die wie in III.7.1 beschrieben synthetisiert und an dem 5'-Ende des nicht kodierenden Strangs radioaktiv markiert wurde. Durch KMnO₄-Behandlung werden Thyminen in einzelsträngigen DNA-Regionen modifiziert und anschließend an diesen modifizierten Positionen durch Piperidin gespalten, was in unterschiedlich langen, radioaktiv markierten DNA-Fragmenten resultiert, die in denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (PAGE) analysiert werden können.

Bei 70 °C Inkubationstemperatur zeigten die Thyminen in dem einzelsträngigen Bereich der Transkriptions-Blase in dem Initiationkomplex der endogenen RNAP an den Positionen -2, -4 und -6 des nicht kodierenden Strangs relativ zum Transkriptionsstartpunkt bei Position +1 eine hohe KMnO₄-Sensitivität, während die Thyminen an den Positionen +2 und +3 eine schwächere Reaktivität aufwiesen (Abb. 14 A, Spur 2). E' im Transkriptionsansatz hatte nur eine verhältnismäßig schwache Auswirkung auf die Ausbildung des offenen Komplexes (Vergleich Abb. 14 A, Spur 2 und Spur 3). Die Sensitivität der einzelnen Positionen wurde durch E' im Durchschnitt um ~ 25 % erhöht. Waren E' (368 nM) und TFE (500 nM) gemeinsam in dem Transkriptionsansatz vorhanden, wurde die KMnO₄-Empfindlichkeit aller Thyminen drastisch erhöht, insbesondere die Position -6, deren Sensitivität um das 3.5-fache

gesteigert wurde (Abb. 14 A, Spur 4; quantitative Analyse der KMnO_4 -Sensitivität in dem Diagramm unter dem Gel). Dieses Ergebnis dokumentierte, dass TFE in der Gegenwart von E' die Bildung von offenen Komplexen signifikant verstärkt, insbesondere im Bereich des stromaufwärts gelegenen Endes der Transkriptionsblase.

Wurde die endogene RNAP bei 60 °C mit der DNA-Matrize inkubiert, wies die Position -2 eine deutliche Reaktivität mit KMnO_4 auf, während die Thyminen an den Positionen -6, -4, +2 und +3 nur schwach modifiziert vorlagen (Abb. 14 B, Spur 2). Das zusätzliche Vorhandensein der Untereinheit E' hatte eine klare Stimulation der KMnO_4 -Sensitivität des gesamten Bereichs der Transkriptionsblase zur Folge (Abb. 14 B, Spur 3), was auf eine distinkte Rolle von E' bei der Öffnung der DNA und der Ausbildung des offenen Komplexes schließen ließ. Die Zugabe von TFE und E' zu der endogenen RNAP führte zu einer weiteren Steigerung der Reaktivität der Thyminen in dem Bereich von -6 bis +3 (Abb. 14 B, Spur 4).

Da die endogene RNAP die Untereinheit E' in stöchiometrischen Mengen enthält, konnte die genaue Rolle dieser Untereinheit nur in KMnO_4 -Experimenten mit dem Core-Enzym der RNAP eindeutig analysiert werden. Da die E' -induzierten Effekte bei niedrigen Temperaturen deutlicher waren, bzw. erst bei niedrigen Inkubationstemperaturen auftraten, wurden die KMnO_4 -Footprinting Versuche mit dem Core-Enzym bei 60 °C durchgeführt.

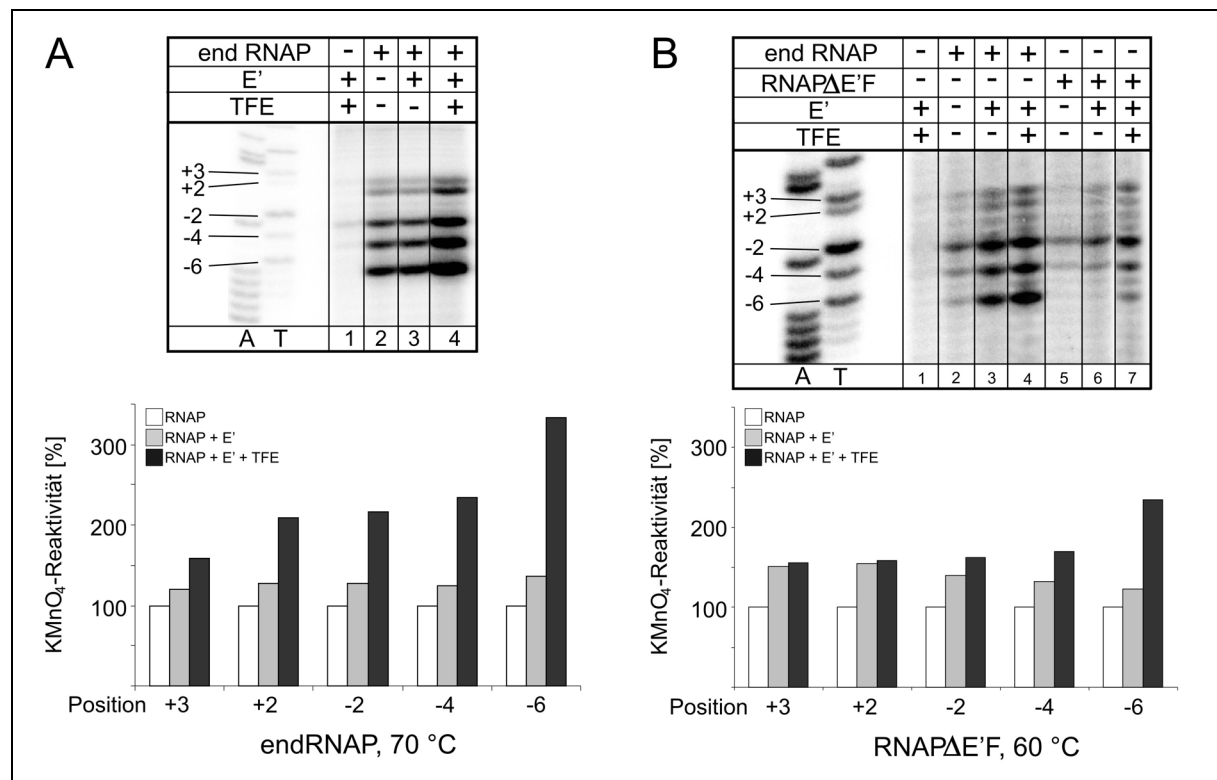


Abb. 14: A, TFE stimuliert die Ausbildung des offenen Komplexes bei 70 °C. Das Öffnen der Transkriptionsblase bei 70 °C wurde durch Verwendung des einzelstrang-spezifischen Reagenz KMnO_4 wie in Abschnitt III.7.2 beschrieben untersucht. Modifizierte Thyminen des nicht kodierenden Strangs wurden in 8%igen PA-Harnstoffgelen analysiert. Alle Reaktionen beinhalteten TBP/TFB, weitere zugegebene Faktoren wie endRNAP (70 nM), E' (368 nM) und TFE (500 nM) sind über dem Gel angezeigt. Die Nummerierung der Thyminen in der T-Sequenz links neben den Spuren bezieht sich auf deren Position zu dem Transkriptionsstartpunkt bei +1. B, Die von dem Core-Enzym gebildete minimale Transkriptionsblase (Spur 5) wird durch TFE an ihrem stromaufwärts gelegenen Ende ausgeweitet (Spur 7). Das Öffnen der Promotor-DNA wurde wie in A beschrieben und bei 60 °C anstelle von 70 °C durchgeführt. Die eingesetzten Faktoren (368 nM E' , 500 nM TFE und 70 nM endRNAP (Spuren 2-4) oder 70 nM $\text{RNAP}\Delta E'F$ (Spuren 5-7) sind über dem Gel angegeben und die Quantifizierung der KMnO_4 -Reaktivität ist wie in A unter dem Gel in dem Diagramm gezeigt. Die Permanganat-Reaktivität der T-Positionen ohne Zugabe von E' und TFE wurde dafür als 100% gesetzt (weißer Balken), die Verstärkung der Signalintensität durch E' und E' mit TFE ist durch graue, bzw. schwarze Balken für jede modifizierte Position dargestellt.

Dafür wurde die RNAP Δ E'F mit der gleichen DNA-Matrize inkubiert wie die endogene RNAP in den entsprechenden Versuchen. Die resultierende Transkriptionsblase beschränkte sich auf den Bereich von -4 bis -2, da nur diese Positionen schwache Modifikationen aufwiesen (Abb. 14 B, Spur 5). Die Inkubation der RNAP Δ E'F mit 368 nM E' führte zu einer Stimulation der Positionen -4 (~ 30 %), -2 (~ 40 %), +2 (~ 60 %) und +3 (~ 50 %), während keine Modifikation der Position -6 erfolgte (Abb. 14 B, Spur 6 und Reaktivitäts-Diagramm unter dem Gel 14 B), was auf eine E'-induzierte Öffnung der Transkriptionsblase hauptsächlich im Bereich um das aktive Zentrum (+1) der RNAP und dem stromabwärts gelegenen Ende der Blase hinwies.

Wurde TFE (500 nM) mit E' und dem Core-Enzym gemeinsam inkubiert, wurde die Sensitivität der Thymin im Bereich von -4 bis +3 vergleichsweise gleichwertig verstärkt. Außerdem wurde die Position -6 modifiziert (Abb. 14 B, Spur 7).

Die quantitative Analyse der KMnO₄-Sensitivität in den Reaktivitäts-Diagrammen unter der Abb. 14 bekräftigte, dass TFE nicht nur zusätzlich die E'-induzierte Öffnung der DNA verstärkt, sondern im besonderen aktiv am Vorgang der DNA-Öffnung am stromaufwärts gelegenen Ende der Transkriptionsblase beteiligt ist.

Zusammenfassend kann die Vermutung aufgestellt werden, dass die in Abschnitt IV.1 beobachtete Stimulation der Transkription bei 60 °C durch E' darauf beruht, dass E' eine wichtige Rolle bei der Ausbildung des offenen Komplexes einnimmt und dass TFE zusätzlich das Öffnen der DNA insbesondere im stromaufwärts gelegenen Ende der Transkriptionsblase begünstigt.

3. TFE stabilisiert offene Komplexe

Um den Effekt von TFE auf die Initiation der archaellen RNAP weiter zu charakterisieren, wurde die kinetische Stabilität von offenen Komplexen der endogenen RNAP und des Core-Enzyms in Gegenwart und Abwesenheit von TFE untersucht.

Um die Stabilität der Komplexe zu ermitteln, wurden die entsprechenden RNA Polymerasen mit TBP, TFB und *gdh*-Promotor DNA-Matrize bei 70 °C, respektive 60 °C in Bindungsreaktionen vorinkubiert. Anschließend wurden diese Komplexe der Konkurrenz von Heparin ausgesetzt.

Der Anteil der nach 5, 15 und 60 min Heparin-Kompetition noch vorliegenden aktiven, offenen Komplexe wurde durch Standard *in vitro* Transkriptionsversuche bestimmt. Dafür wurden Aliquots der offenen Komplexe in Heparin-Puffer nach entsprechender Inkubationsdauer mit einem vollständigen NTP-Mix sowie [α -³²P]UTP ergänzt und die Synthese von run-off Transkripten analysiert. Als 100 %-Wert diente ein Aliquot der Bindungsreaktion vor Zugabe von Heparin.

Die Heparin-Konzentration wurde so gewählt, dass „single-round“-Bedingungen nicht nur während der Kompetition, sondern auch in den folgenden Transkriptionsreaktionen vorlagen, so dass nur bereits initiierte Komplexe ein run-off RNA-Produkt synthetisieren konnten. Eine Re-Initiation wurde ab Heparin-Konzentrationen von 500 μ g/ml vollständig verhindert (Abb. 15, Spur 6). Die Heparin-Konzentration während der Kompetition betrug 800 μ g/ml, die Konzentration in den Transkriptionsansätzen 533 μ g/ml.

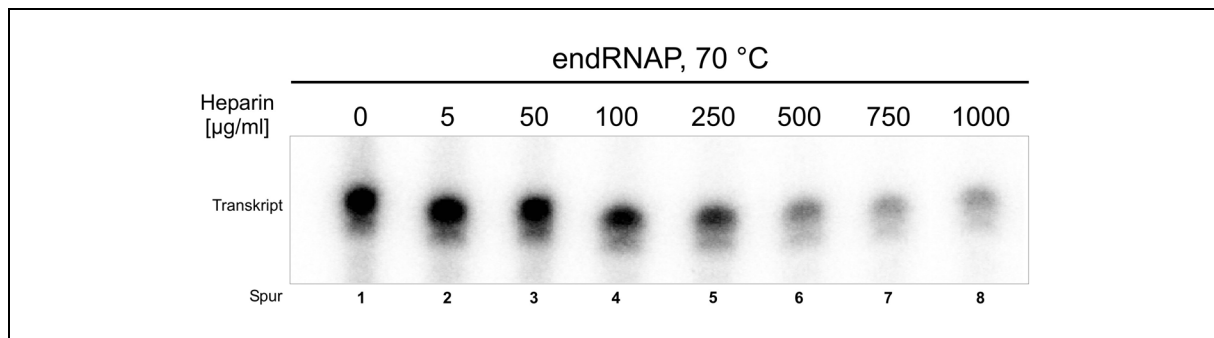


Abb. 15: Einstellung der Heparin-Konzentration für „single-round“-Transkriptionsbedingungen. Um eine Re-Initiation der Transkription zu verhindern, wurde Heparin als DNA-Kompetitor eingesetzt und die Transkription bei 70 °C an *gdh*-Promotor-DNA in 6%igen PA-Harnstoffgelen untersucht. Die Ansätze enthielten 26 nM endRNAP, 285 nM TBP und 60 nM TFB1; die Heparin-Konzentrationen sind über dem Gel angegeben.

Offene Komplexe der endogenen RNAP und der RNAP Δ E'F wurden bei 70 °C bereits nach kurzen Inkubationsdauern signifikant destabilisiert. Nur ~ 37 % der offenen Komplexe der endogenen sowie der Core-RNAP waren nach 1 h Inkubation mit 800 µg/ml Heparin noch aktiv (Abb. 16 B, Spur 4 und C, Spur 4) und konnten run-off RNA-Produkte synthetisieren. Nach kürzeren Inkubationszeiten (5 – 15 min) in den Kompetitionsansätzen zeigten noch ~ 60 % der endogenen RNAP, bzw. ~ 30 % des Core-Enzyms Aktivität (Abb. 16 C, Spuren 2, 3 und B, Spuren 2, 3). Die offenen Komplexe beider Enzyme wurden wenigstens für Inkubationsdauern von 5 – 15 min durch Zugabe von 500 nM TFE in die Bindungsreaktion signifikant stabilisiert, während die stabilisierende Wirkung nach 1 h Inkubation mit Heparin nicht mehr festzustellen war. Durch die Zugabe von TFE steigerte sich die Zahl der verbleibenden aktiven, offenen Komplexe der endogenen RNAP nach 15 min Inkubation mit Heparin im Vergleich zu den verbliebenen aktiven Komplexen ohne Vorinkubation mit TFE um 15 % auf ~ 75 % (Abb. 16 C, Spur 7), die der RNAP Δ E'F um 12 % auf ~ 42 % (Abb. 16 B, Spur 7). Eine Vorinkubation des Core-Enzyms mit TFE und zusätzlich E' führte zu keiner weiteren Steigerung der Anzahl aktiver offener Komplexe im Vergleich zu der Vorinkubation des Enzyms mit TFE alleine nach 15 min Competition (41 %; Abb. 16 B, Spur 11). Wurde das Δ E'F-Enzym mit 368 nM E' alleine vorinkubiert, hatte das zwar eine geringe Steigerung der allgemeinen Transkriptionsrate zur Folge (Vergleiche Abschnitt IV.1.3), jedoch keinen Effekt auf die Stabilität der offenen Komplexe (~ 29 % aktive Komplexe nach 15 min; Abb. 16 B, Spur 15).

Diese Ergebnisse dokumentieren, dass offene Komplexe durch TFE stabilisiert werden und dass dieser Effekt im Gegensatz zu dem E'-induzierten, stimulierenden Effekt von TFE auf die Transkriptionsaktivität unabhängig von E' ist.

Die offenen Komplexe der RNAP Δ E'F, die bei 60 °C inkubiert wurden, zeigten eine deutlich höhere Stabilität als bei 70 °C. So waren ~ 80 % der gebildeten Initiationskomplexe des Core-Enzyms nach 1 h noch aktiv (Abb. 16 A, Spur 3). Auch bei Inkubationstemperaturen von 60 °C hatte TFE eine stabilisierende Wirkung auf offene Komplexe. Nach Vorinkubation der Polymerase mit TFE waren nach 1 h Inkubation in Gegenwart von Heparin fast alle gebildeten Komplexe noch aktiv (~ 97 % nach 1 h; Abb. E 12 A, Spur 6). Die zusätzliche Zugabe von E' zu dem Core-Enzym und TFE in die Bindungsreaktion hatte zwar eine deutliche Steigerung der Transkriptionsaktivität an sich zur Folge (siehe Abb. 15), jedoch keinen Einfluss auf die Stabilität der Initiationskomplexe (~ 95 % nach 1 h; Abb. 16 A, Spur 9), was die Aussage bekräftigt, dass die Stabilisierung offener Komplexe durch TFE vermittelt wird. Da die offenen Komplexe der RNAP Δ E'F ohne die Untereinheiten E' und F durch TFE stabilisiert werden, ist TFE in der Lage, mit der RNAP auch ohne die Untereinheit E' funktionell zu interagieren. Der stabilisierende Effekt von TFE auf die offenen Komplexe ist somit unabhängig von E'.

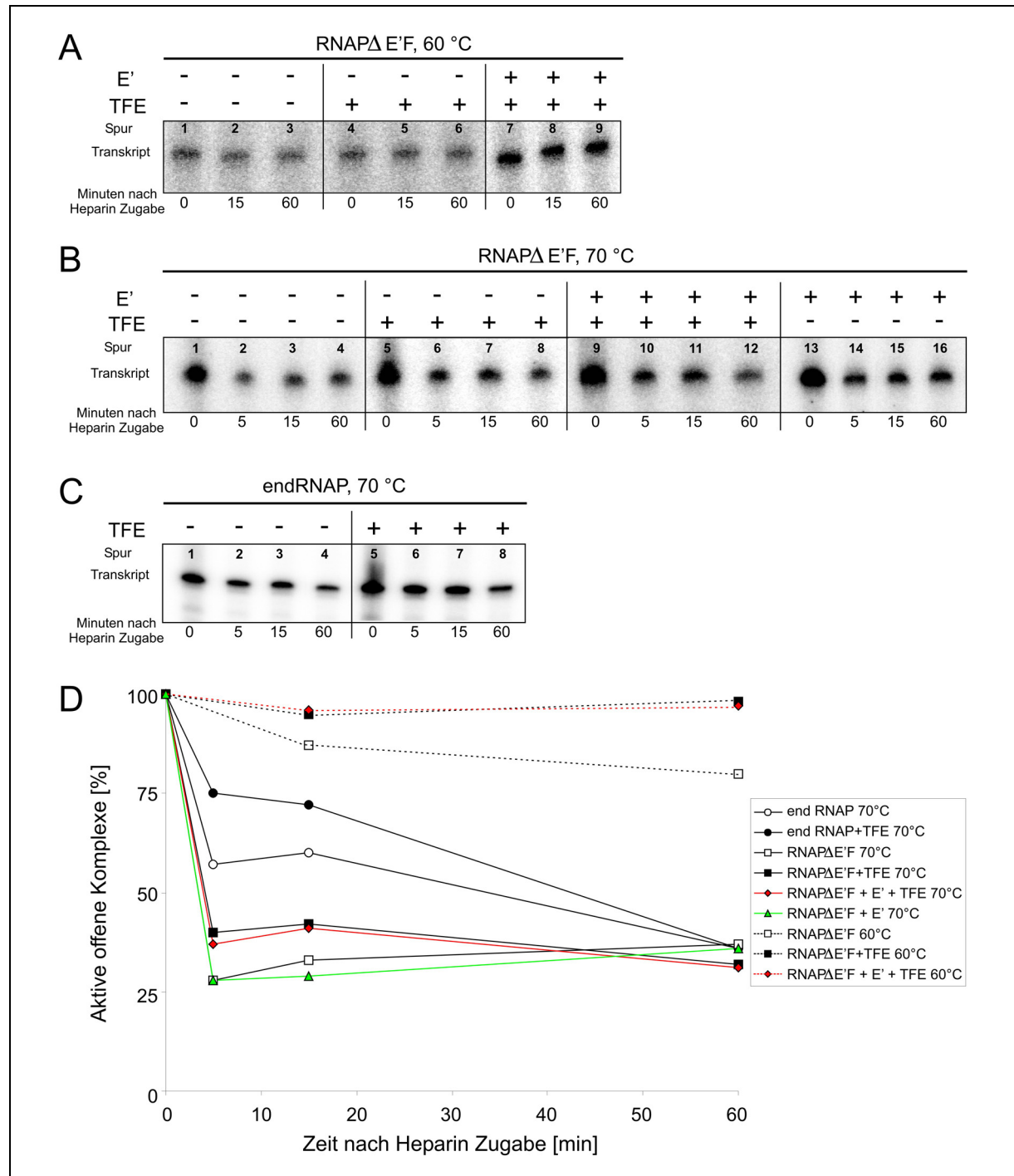


Abb. 16: TFE stabilisiert offene Komplexe unabhängig von der Untereinheit E'. *A*, Von der RNAP Δ E'F (58 nM) bei 60 °C an *gdh*-Promotor-DNA gebildete offene Komplexe wurden in Konkurrenz zu 800 μ g/ml Heparin inkubiert (III.8) und die verbleibenden, stabilen Komplexe durch „single-round“ Transkriptionsexperimente bei 60 °C ermittelt. Die zusätzlich zugegebenen Faktoren (368 nM E', 500 nM TFE) sind über und die Inkubationsdauer in Gegenwart von Heparin unter dem Gel angegeben. *B*, Die Versuche wurden wie in *A* beschrieben durchgeführt, nur dass alle Schritte bei 70 °C durchgeführt wurden. *C*, Der Versuchsaufbau glich dem in *B* beschriebenen, bis darauf, dass anstelle des Core-Enzyms 26 nM endRNAP eingesetzt wurde. *D*, Graphische Darstellung der nach Co-Inkubation mit 800 μ g/ml Heparin verbleibenden, aktiven offenen Komplexe nach verschiedenen Inkubationsdauern. Die Beschriftung der einzelnen Kurven ist der Tafel rechts neben dem Diagramm zu entnehmen.

4. Sequenzanalyse von TFE

Meinhard et al. bestimmten 2003 die Kristallstruktur der N-terminalen Domäne des TFE aus *Sulfolobus solfataricus*. X-ray Analysen ergaben für diese Domäne eine ausgedehnte winged-helix Struktur, die allerdings nicht die typischen DNA bindenden Eigenschaften anderer bekannter winged-helix-Motive aufweist, wie sie in Transkriptionsfaktoren und anderen DNA-bindenden Proteinen wie Transkriptionsregulatoren vorkommen (Liu et al., 2007; Vierke et al., 2003; Kenny, 2002). Die Autoren vermuteten daraufhin für diese Region, dass ihr primärer Zweck nicht in der Bindung an Nukleinsäuren liegt, sondern die Domäne eher als „Adapter“ zwischen der RNAP und den allgemeinen Transkriptionsfaktoren dient.

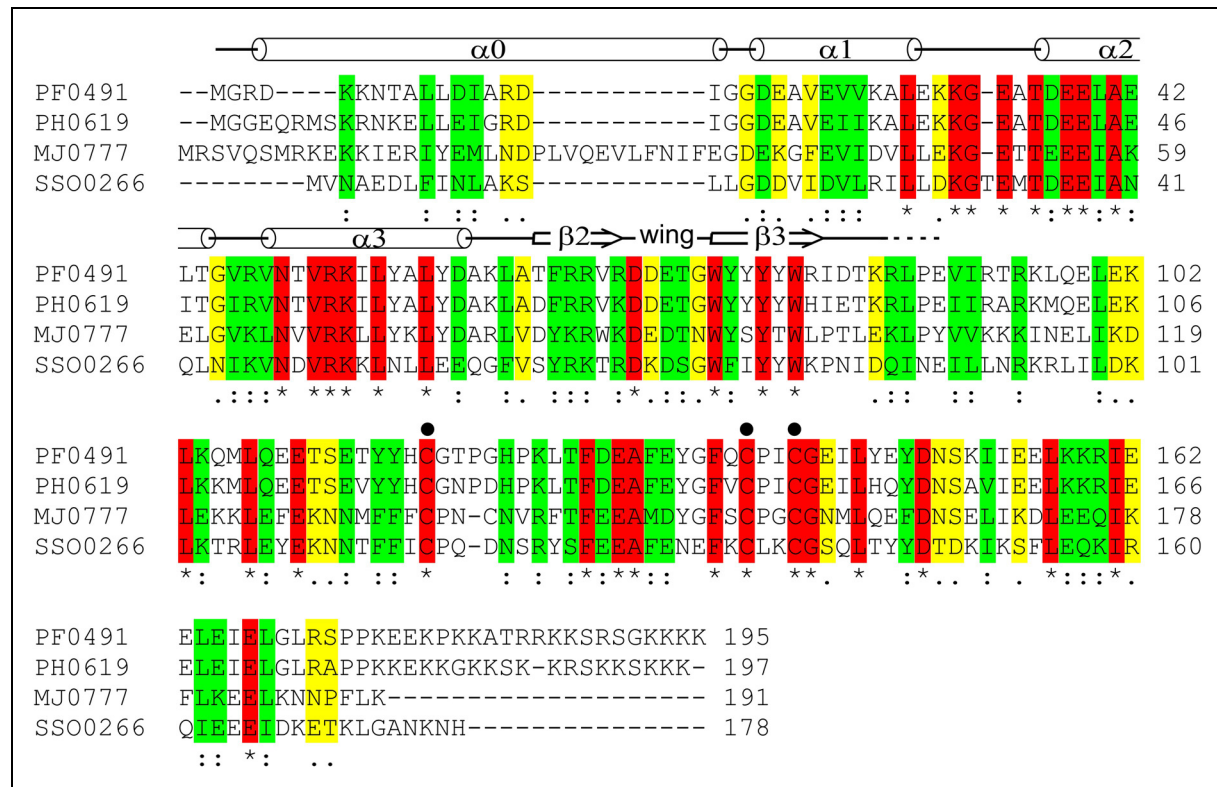


Abb. 17: TFE aus *Pyrococcus furiosus* besitzt ein N-terminales winged-helix Motiv. Gezeigt ist ein Abgleich der Aminosäuresequenz der N-terminalen winged-helix Domäne von *P. furiosus* (PF0491) mit entsprechenden Bereichen, die in TFE-Sequenzen anderer Archaea vorkommen (*Pyrococcus horikoshii*, PH0619; *Methanocaldococcus jannaschii*, MJ0777; *Sulfolobus solfataricus*, SSO0266). Vorhergesagte sekundäre Strukturelemente für *Pfu* TFE sind über der Sequenz angezeigt (α -Helices, Zylinder; β -Stränge, Pfeile). Schwarze Punkte kennzeichnen die Cysteine, die an der Koordination des Zink-Ions beteiligt sind. Die Benennung der Sekundärstrukturen folgt in dieser Abbildung der von Meinhard et al., 2003 für *S. solfataricus* TFE vorgeschlagenen Namensgebung. Aminosäuren, die in allen verglichenen Sequenzen gleich sind, sind rot gekennzeichnet. Aminosäuren, die nicht identisch, aber konservierte Austausche aufweisen, sind grün markiert. Semi-konservierte Aminosäure-Austausche sind gelb hervorgehoben. Die Sequenzen wurden dem UCSC Archaeal Genome Browser entnommen und mit ClustalW verglichen. Für die Vorhersage der Sekundärstruktur wurde der PSIPRED Protein Structure Prediction Server verwendet.

Ein Vergleich der Aminosäure-Sequenz der N-terminalen Domäne von TFE aus *Sulfolobus solfataricus* mit den TFE-entsprechenden Aminosäure(AS)-Sequenzen aus *Pyrococcus furiosus* sowie dem ebenfalls hyperthermophilen *Pyrococcus horikoshii* und dem Methanogenen *Methanocaldococcus jannaschii* ist in Abb. 17 dargestellt. Die Sequenzen aus dem UCSC Archaeal Genome Browser wurden mit ClustalW verglichen und weisen eine sehr hohe Ähnlichkeit auf.

Obwohl die Bindung von Zink-Ionen in der N-terminalen Domäne essentiell für die Funktion von TFE (Hanzelka et al., 2001) und TFIIE (Maxon und Tijan, 1994) ist, fehlt dem *Pyrococcus furiosus* TFE wie auch dem *Sulfolobus solfataricus* TFE eines von vier Cysteinen, die in der Koordination des Zinks involviert sind (Reeve et al., 1997 und Abb. 17, schwarze Punkte über den entsprechenden C118, C138, C141).

Auch der Vergleich der Struktur-Vorhersage für *P. furiosus* TFE (pfTFE) mit der Kristallstruktur von *S. solfataricus* TFE (ssTFE) zeigte eine hohe Ähnlichkeit der Sekundärstruktur. Das winged-helix-Motiv von pfTFE wird aus vier α -Helices (Abb. 17, $\alpha 0$ -3) und zwei folgenden, durch eine „wing“-Region verbundene β -Faltblätter ($\beta 2$ -3) gebildet, wobei die Nomenklatur in der Abb. 17 von Meinhart et al., 2003 übernommen wurde. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der TFE-Sequenz aus *P. furiosus* zu der veröffentlichten TFE-Struktur von *S. solfataricus* finden sich auch bei pfTFE die in Meinhart et al., 2003 beschriebenen Eigenschaften, wie z.B. zwei konservierte hydrophobe Bereiche in der Region der $\alpha 0$ -Helix (AS 9-15) und dem 3'-Ende der $\alpha 2$ -Helix (AS 40-48) sowie drei negativ geladene AS am 5'-Ende der $\alpha 2$ -Helix (D37, E38, E39), die aufgrund ihrer Ladung und ihrer Lage in der potentiellen DNA-Bindestelle von TFE eine stabile Bindung an Nukleinsäuren ausschließen.

Diese hohe Ähnlichkeit erlaubt allgemein gültige Aussagen über die Effekte von TFE auf die Transkription in Archaeen.

5. Wechselwirkungen von TFE mit Nukleinsäuren

Wie in Abschnitt IV.4 und von Meinhart et al., 2003 beschrieben, macht die Struktur der N-terminalen Region von TFE eine stabile Bindung an Nukleinsäuren unwahrscheinlich. So konnte keine Bindung von TFE an verschiedene DNA-Matrizen in „band-shift“-Versuchen nachgewiesen werden (Meinhart et al., 2003).

Um potentielle, instabile Wechselwirkungen von DNA mit TFE nachzuweisen, wurden photoaktivierbare DNA-Matrizen verwendet, die nach Aktivierung mit UV-Licht kovalente Bindungen zu Proteinen in unmittelbarer Nähe zu der jeweils modifizierten DNA-Position ausbilden.

5.1 TFE interagiert mit einzelsträngiger DNA

Für den Nachweis von TFE-Interaktionen mit einzelsträngiger DNA wurden sechs einzelsträngige DNA-Matrizen verwendet, welche die Region des *gdh*-Promoters von Position -30 bis +4 umfassten. Die Matrizen trugen jeweils eine Phosphorothioat Modifikation an verschiedenen Positionen (-26, -21, -16, -10, -6 und -1 bezüglich der Transkriptions-Startposition +1). Die Fertigstellung und die Sequenz dieser Matrizen ist in dem Abschnitt III.11 beschrieben.

Tatsächlich konnte nach Inkubation von TFE mit den DNA-Matrizen bereits ab einem Protein zu DNA Verhältnis von 0.19 μ M (50 ng TFE)/1 μ M DNA auf dem 4-19%igen SDS-PA-Gradientengel eine Bande bei ca. 31 kDa identifiziert werden (Abb. 18, Spuren 2-5). Bei dieser Bande handelt es sich um TFE mit kovalent gebundener DNA. Da keine Nuklease-Restriktion der überhängenden DNA erfolgte, änderte sich das Laufverhalten des gebundenen TFEs entsprechend.

Um die Spezifität dieser Bindung zu analysieren, wurden 1.9 μ M TFE (500 ng; Abb. 18 A, Spur 5) und als Kontrollen äquimolare Mengen der RNAP-Untereinheiten E' (21.7 kDa), F (14.1 kDa) und L (11.1 kDa) mit 1 μ M der photoaktivierbaren DNA (III.11) inkubiert (Abb. 18 B). Während für E', bzw. das eukaryotischen Homologen Rpb7 im polII-System und A43 im polI-System die Fähigkeit zur Bindung an einzelsträngige Nukleinsäuren bereits postuliert

wurde (Meka et al., 2003), fehlt diese den Untereinheiten F und L. So erfolgte eine Bindung von E' an die DNA-Matrize (Abb. 18 B, Spur 5). Während F und L erwartungsgemäß nicht mit der Matrize quervernetzt wurden (Abb. 18 B, Spuren 3, 4), konnte TFE an die einzelsträngige DNA binden (Abb. 18 B, Spur 2).

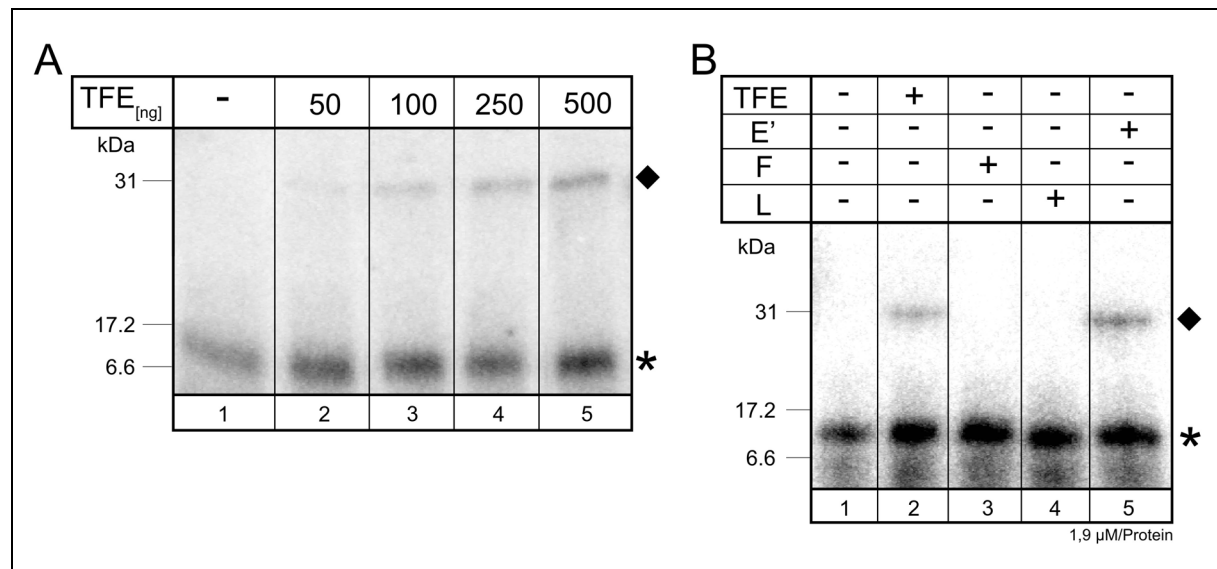


Abb. 18: TFE bindet an einzelsträngige DNA. *A*, 1 µM photoaktivierbare, einzelsträngige DNA (III.11) wurde mit verschiedenen Konzentrationen TFE (200 nM-2 µM) inkubiert und durch UV-Bestrahlung quervernetzt. Die Analyse des kovalent an die DNA gebundenen TFE erfolgte in 4-19%igen SDS-Gradientengelen. Die freie DNA ist mit einem Sternchen und der TFE/DNA-Komplex durch eine Raute neben dem Gel gekennzeichnet. *B*, Der Versuchsaufbau glich dem in *A* beschriebenen, nur dass neben TFE auch die RNAP Untereinheiten E', F und L getestet wurden. Es wurden jeweils 1,9 µM des über dem Gel angezeigten Proteins mit 1 µM photoaktivierbarer einzelsträngiger DNA eingesetzt.

5.2 TFE bindet mit hoher Affinität an Heteroduplex-DNA-Bereiche

Des Weiteren wurde untersucht, ob TFE an DNA-Konstrukte mit vorgeöffneter Transkriptionsblase, also einem künstlich aufgeschmolzenen DNA-Bereich in der Region von -6 bis +6 relativ zum Transkriptionsstartpunkt +1, binden kann.

Dazu wurde die Heteroduplex-Matrize wie in III.10 beschrieben synthetisiert und trug eine Derivatisierung mit APB an der zu verknüpfenden Position -3 mit direkt angrenzender radioaktiver Markierung auf dem nicht kodierenden Strang. Diese Matrizen wurden ohne Zugabe von weiteren Transkriptionsfaktoren von der endRNAP in EMSAs gebunden (Abb. 19 A) und transkribiert (Abb. 19 B).

Wurde die DNA in dem Transkriptionsansatz wie in III.10 beschrieben durch UV-Bestrahlung photoaktiviert, konnten zum einen die Untereinheiten B und A' der RNAP als an die Position -3 des nicht kodierenden Stranges bindend nachgewiesen werden (Abb. 19 C, Spur 3). Zum anderen zeigte auch TFE eine sehr hohe Affinität zu dem Heteroduplex-Bereich und wurde in großem Maße kovalent an die DNA-Matrize gebunden (Abb. 19 C, Spur 2). Wurden RNAP und TFE co-inkubiert, führte dies weder zu einer Abschwächung der Signale, noch zu einer Stimulation der Bindung (Abb. 19 C, Spur 4), was in diesem Fall auf eine unabhängige Bindung der Faktoren an die DNA hinweist.

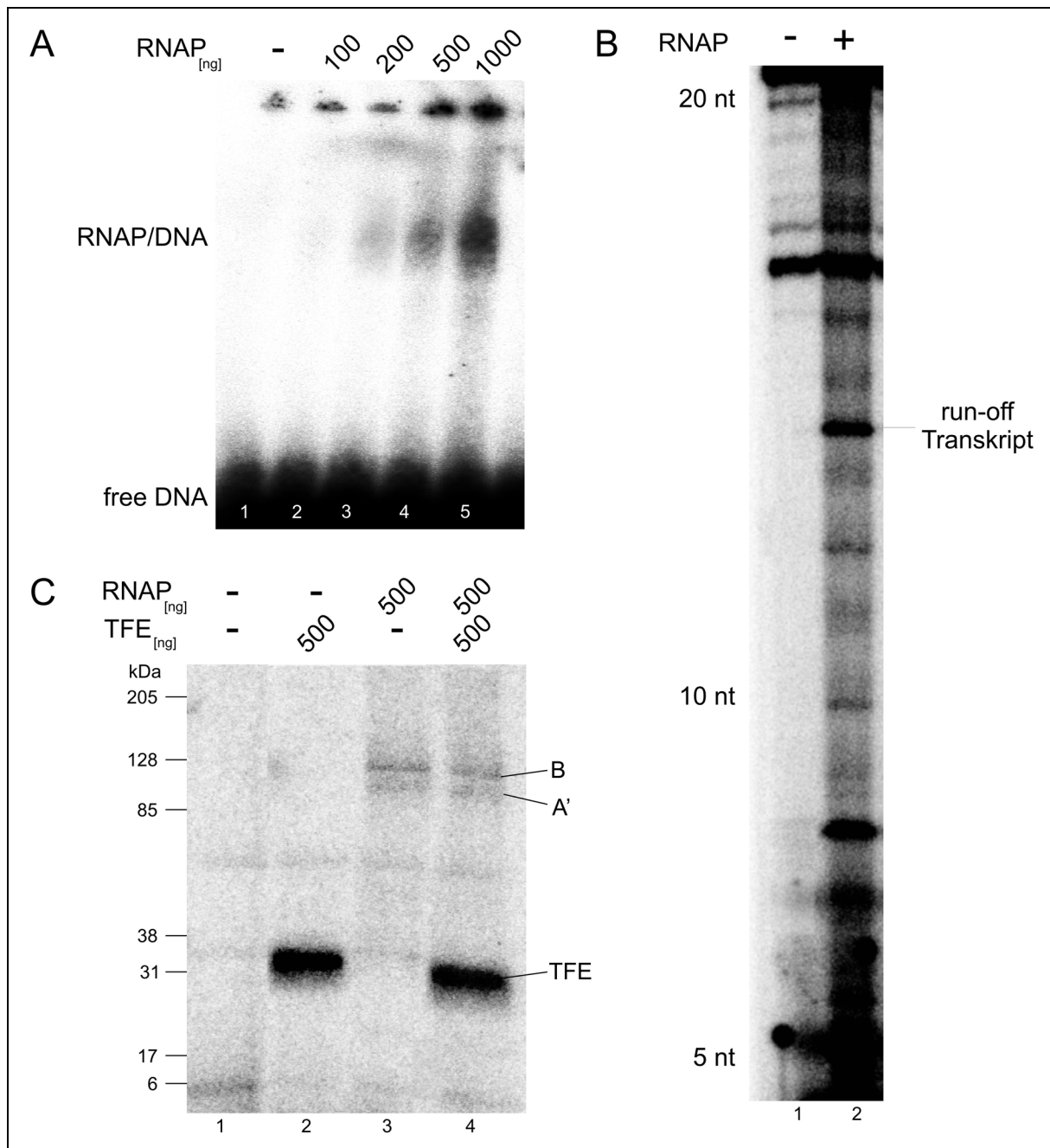


Abb. 19: A, Die endRNAP bindet ohne zusätzliche Transkriptionsfaktoren an die Cross-Linking kompetente Heteroduplex-DNA (III.10). 2 nM der DNA mit vorgeöffneter Transkriptionsblase von Position -6 bis +6 relativ zu dem Transkriptionsstartpunkt +1 wurde mit steigenden Mengen endRNAP (21, 42, 105 und 210 nM) inkubiert und nach Photoaktivierung der DNA mittels UV-Bestrahlung in 5%iger nativer Gelelektrophorese analysiert. B, Die endRNAP transkribiert die eingesetzte Heteroduplex-DNA ohne TBP/TFB. 2 nM der radioaktiv markierten Cross-Linking DNA wurden mit 105 nM endRNAP und NTPs bei 70°C inkubiert und die gebildeten RNA-Produkte auf 28%igen PA-Harnstoffgelen untersucht. C, TFE und die RNAP binden unabhängig voneinander an die photoaktivierbare DNA-Matrize mit vorgeöffneter Transkriptionsblase. 1.9 µM TFE (Spur 2), 105 nM RNAP (Spur 3) oder RNAP/TFE gemeinsam (Spur 4) wurden mit 2 nM DNA inkubiert und in 4-19%igen SDS-Gradientengelen analysiert.

6. TFE stimuliert die Bildung kurzer, abortiver RNA-Produkte

Die Phase der abortiven Transkription ist durch eine akkumulierende Freisetzung von kurzen RNA-Produkten gekennzeichnet, bevor die RNAP den Promotorkomplex verlässt und die Elongationsphase übergeht (zusammengefasst von Dvir, 2002).

Während des Pausierens von Transkriptionskomplexen an –C20 Kassetten des *gdh*-Promotors mit anschließender Isolierung der Komplexe mittels Magnetpartikel-Separator (MPS) kam es zu einer Akkumulation von freigesetzten, abortiven Transkripten mit einer Länge von 5 nt in dem Überstand (Abb. 20).

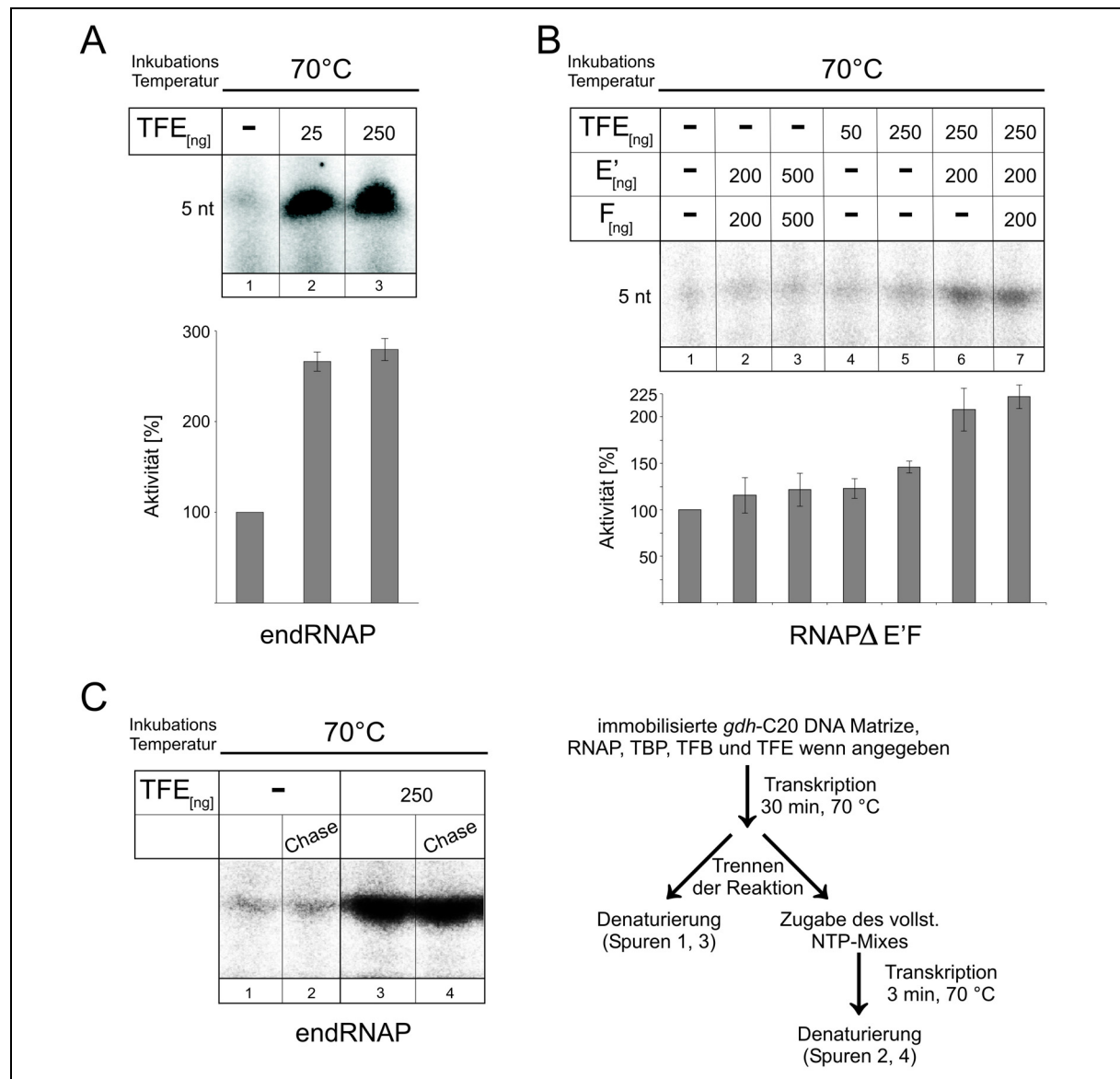


Abb. 20: A, TFE stimuliert die Synthese von kurzen abortiven RNA-Produkten. Das Einstellen von steigenden TFE-Konzentrationen (Spur 2, 36 nM; Spur 3, 357 nM) in Transkriptionsexperimenten mit der endRNAP an immobilisierten DNA-Matrizen führte zu einem signifikanten Anstieg der Synthese von freigesetzten 5 nt RNA-Produkten. B, Die RNAP Untereinheiten E'/F werden für eine signifikante Steigerung der abortiven Transkription durch TFE benötigt. Die Transkription wurde wie in II.6.2 beschrieben mit 50 nM RNAPΔE'F durchgeführt. 260 nM E' und 405 nM F wurden in der Reaktion in Spur 2, 660 nM E' und 1 μM F in der Reaktion in Spur 3 eingesetzt. Außerdem wurden steigende TFE-Konzentrationen (Spur 4, 71 nM; Spur 5, 357 nM) und Kombinationen aus E'/TFE (Spur 6) und E'/F und TFE analysiert. C, Um zu beweisen, dass es sich tatsächlich um kurze, freigesetzte RNA-Produkte und nicht um bei dem Isolieren der ternären Komplexe verschleppte Kontaminationen handelte, wurde die Transkription mit endRNAP an immobilisierten Matrizen durchgeführt, wobei nach dem Pausieren der Komplexe diese nicht isoliert, sondern die Reaktionen direkt geteilt wurden. Eine Hälfte der Reaktionen wurde sofort denaturiert, während der anderen Hälfte ein kompletter NTP-Mix zugegeben und vor der Denaturierung weitere 3 min bei 70 °C inkubiert wurde. Auf der rechten Seite ist der Versuchsablauf schematisch dargestellt.

Auch wenn die Komplexe in den Reaktionsansätzen nicht isoliert, sondern die Ansätze geteilt wurden und die pausierten Komplexe einer Hälfte nach Zugabe des vollständigen NTP-Mixes

die Transkription wieder aufnehmen konnten, kam es zu keiner Verlängerung dieser 5 nt RNA-Produkte (Abb. 20 C, experimenteller Ablauf rechts neben Abb. 20 C).

Dieses Ergebnis bestätigte, dass es sich um freigesetzte, abortive Transkripte handelte.

Die Bildung des 5 nt Produktes konnte durch Zugabe von TFE um das 3-fache gesteigert werden (Abb. 20 A, Spuren 2, 3), was auf eine Stabilisierung der Initiationskomplexe hindeutete.

Da die signifikante Stimulation der Transkription durch TFE abhängig von dem Vorhandensein der RNAP Untereinheiten F und insbesondere E' ist (IV.1.3), wurde im Folgenden der Effekt von TFE auf die abortive RNA-Synthese des ohne die entsprechenden Untereinheiten rekonstituierten Core-Enzyms getestet (Abb. 20 B).

Während weder die Zugabe von steigenden Mengen E'/F (jeweils 200 und 500 ng, Spuren 2, 3), noch von steigenden Mengen TFE alleine (50 und 250 ng, Abb. E 12 B, Spuren 4, 5) eine signifikante Steigerung der abortiven Transkription zur Folge hatte, wurde die Synthese des freigesetzten 5 nt Transkripts durch die Zugabe von E', F und TFE, bzw. von E' und TFE um ungefähr das 2-fache gesteigert (Abb. E 12 B, Spuren 6, 7). Dieses Ergebnis erbringt Evidenz dafür, dass die stimulierende Wirkung von TFE auf die abortive Transkription abhängig von dem Vorhandensein des E'/F Subkomplexes der RNAP ist.

7. TFE erhöht die Wiederaufnahme-Effizienz der Transkription von pausierten Elongationskomplexen

Die archaeelle RNAP beginnt mit der Translokation und dem damit verbundenen Ablösen von der Promotor-Plattform, wenn die wachsende RNA eine Länge von 10 nt erreicht hat (Spitalny und Thomm, 2003). Strukturelle und biochemische Studien über ternäre polIII-Komplexe belegen, dass die Elongationskomplexe ihre endgültige Stabilität bei einer RNA-Länge von 14-15 nt erlangen (Dvir et al., 1997 *J. Biol. Chem.*; Dvir et al., 1997 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*).

Um den Effekt von TFE auf die Elongation der Transkription zu untersuchen, wurde die Synthese eines 20 nt Transkripts analysiert, das als Hauptprodukt bei einer immobilisierten Transkription bis Position +20 entsteht. Außerdem wurde die Fähigkeit von an Position +20 pausierten Elongationskomplexen der rekonstituierten RNAP untersucht, die RNA-Synthese in Gegenwart und Abwesenheit von TFE wieder aufzunehmen.

Wie in IV.1.3 für die stimulierende Wirkung von TFE auf die run-off Transkription beschrieben, führte die Zugabe von TFE zu den Reaktionen zu einem vergleichbaren, moderaten Effekt auf die Ausbildung pausierter Transkriptionskomplexe (Abb. 21 A, Spuren 1, 3, 5 und Aktivitätsdiagramm rechts neben dem Gel; Abb. 21 C, Spuren 1, 3).

Im Folgenden wurde die Fähigkeit von ternären Komplexen analysiert, die Transkription nach Zugabe eines vollständigen NTP-Mixes wieder aufnehmen zu können. Dafür wurde die Abnahme des 20 nt RNA-Produktes in den pausierten Komplexen nach Zugabe der NTPs gemessen. Ca. 50% der gestellten rekonstituierten RNAP-Komplexe waren in der Lage, in Abwesenheit von TFE die Transkription fortzusetzen (Abb. 21 A, Spuren 1, 2). Die Zugabe von 50 ng, bzw. 250 ng TFE zu den Reaktionen hatte eine Steigerung der Wiederaufnahme-Effizienz auf ca. 70%, respektive 75% zur Folge (Abb. 21 A, Vergleich der Spuren 2, 4, 6 und Diagramm zur Wiederaufnahme-Effizienz unter dem Gel). Da die Wiederaufnahme-Effizienz in diesen Versuchen maximal 100% erreichen konnte, bedeutete eine Steigerung um 25% von 50 auf 75%, dass TFE einen signifikanten Effekt auf die Wiederaufnahme der Transkription hat.

Wurde TFE nicht zu der Initiationsreaktion, sondern erst nach dem Pausieren und Isolieren der ternären Komplexe zugegeben, hatte dies keine aktivierende Wirkung auf die Wiederaufnahme-Effizienz zur Folge (Abb. 21 C, Vergleich der Spuren 1, 2 und 5, 6;

Quantifizierung im Diagramm zur Wiederaufnahme-Effizienz unter dem Gel). TFE kann also nur mit Präinitiations-Komplexen assoziieren, nicht aber mit bereits gebildeten, stabilen ternären Komplexen.

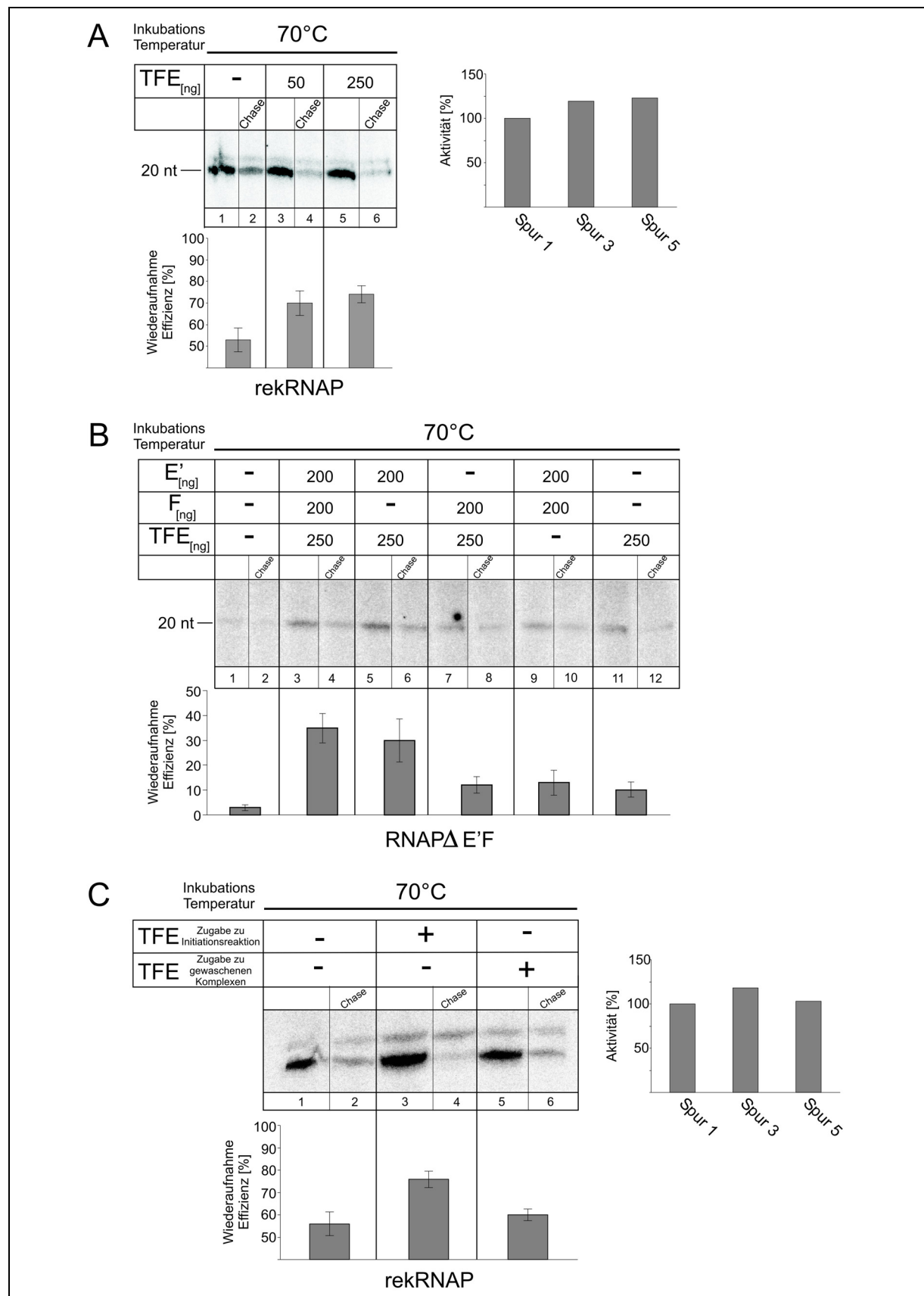


Abb. 21 (vorherige Seite): *A*, TFE erhöht die Effizienz der Transkriptions-Wiederaufnahme pausierter Elongationskomplexe. Die Reaktionen enthielten DNA-Matrize, TBP, TFB und 43 nM rekRNAP. Wenn angegeben, wurde TFE auf 35 nM (Spuren 3, 4) oder 357 nM (Spuren 5, 6) zugegeben. Durch die Verwendung von immobilisierter *gdh*-C20 Promotor-DNA und Transkription ohne CTP wurden ternäre Komplexe an Position +20 pausiert und anschließend isoliert. Die Wiederaufnahme der Transkription wurde durch Zugabe des kompletten NTP-Mixes (Chase) untersucht. 20 nt RNA-Produkte in den Spuren 2, 4 und 6 stellen die Fraktion der pausierten Elongationskomplexe dar, die nach NTP-Zugabe die Transkription nicht wieder aufnehmen konnten. Die totale Aktivität der pausierten Elongation (Spuren 1, 3 und 5) ist in dem Diagramm rechts neben dem Gel dokumentiert, die Wiederaufnahme-Effizienz in dem Diagramm unter dem Gel. *B*, Die Untereinheit E' ist für die TFE induzierte Stimulation der Wiederaufnahme-Effizienz nötig. Wie über dem Gel angegeben, wurden zu pausierten ternären Komplexen der RNAPΔE'F TFE (357 nM), E' (260 nM) und F (405 nM) oder Kombinationen der einzelnen Faktoren zugegeben und die Wiederaufnahmefähigkeit der Komplexe in dem Diagramm unter dem Gel dokumentiert. *C*, TFE kann nur mit Präinkubationskomplexen assoziieren. Pausierte ternäre Komplexe der rekRNAP wurden in Abwesenheit (Spuren 1, 2 und 5, 6) und Anwesenheit von 500 nM TFE (Spuren 3, 4) gebildet, isoliert und die Reaktionen geteilt. Während einer Hälfte der Reaktion der komplette NTP-Mix zugegeben wurde (Spuren 2, 4, 6), wurde die andere Hälfte direkt hitzedenaturiert wurde (Spuren 1, 3, 5). Zu der Chase-Reaktion in Spur 6 wurde TFE erst nach dem Isolieren und Waschen der Komplexe auf 500 nM zugegeben. Nach einer weiteren dreiminütigen Inkubation bei 70 °C wurden die Chase-Reaktionen denaturiert und in 28%igen PA-Harnstoffgelen analysiert. Wie in *A* ist die totale Aktivität der pausierten Transkriptionskomplexe in dem Diagramm rechts neben dem Gel, und die Wiederaufnahme-Effizienz der Komplexe unter dem Gel dargestellt.

Um die Wirkung von TFE auf pausierte Transkriptionskomplexe weiter zu untersuchen, wurden pausierte Elongationskomplexe der RNAPΔE'F isoliert und analysiert. In dem Abschnitt IV.1.3 wurde dokumentiert, dass die stimulierende Wirkung von TFE auf die run-off Transkription abhängig von dem Vorhandensein von E'/F, im Besonderen von E' ist. So hatte TFE alleine auch nur einen sehr moderaten aktivierenden Effekt (ca. 10% im Vergleich zu der Wiederaufnahme-Effizienz des Core-Enzyms alleine von ca. 3%) auf die Wiederaufnahme der RNAPΔE'F (Abb. 21 B, Vergleich der Spuren 1, 2 und 11, 12). Dieser schwache Effekt von TFE wurde jedoch drastisch durch eine zusätzliche Zugabe von E' (Abb. 21 B, Spuren 5, 6), bzw. E'/F (Abb. 21 B, Spuren 3, 4) auf ca. 30, bzw. 35% gesteigert. Die stimulierende Wirkung von TFE auf die Wiederaufnahme-Effizienz pausierter Transkriptionskomplexe ist demnach E' vermittelt und beruht vermutlich auf einem Effekt des mit dem Präinitiationskomplex assoziierten TFE auf die Konformation des Elongations-Komplexes nachdem die RNAP die Promotorplattform verlassen hat.

8. TFE stabilisiert die Transkriptionsblase von pausierten ternären Komplexen

Um die Ursache für die stimulierende Wirkung von TFE auf die Wiederaufnahme der Transkription von pausierten, frühen Elongationskomplexen detailliert zu untersuchen, wurde im Folgenden die Kaliumpermanganat (KMnO₄)-Sensitivität der Transkriptionsblasen sowohl in binären Initiationskomplexen als auch in pausierten, ternären Elongationskomplexen untersucht.

Um die einzelsträngigen Bereiche in den Initiations- und Elongationskomplexen gleichzeitig analysieren zu können, wurde die NTP-Konzentration dahingehend optimiert. Ohne Zugabe von NTPs wurden nur die Thymin des nicht kodierenden Strangs im Bereich der Transkriptionsblase des Initiationskomplexes modifiziert (Positionen -6 bis +3; Abb. 22, Spur 2). Bei einer Konzentration von 10 μM/NTP wurden neben den Thyminen in der Initiationsblase auch die T-Positionen in dem einzelsträngigen Bereich der Transkriptionsblase modifiziert, die von an Position +20 pausierten Elongationskomplexen gebildet wurden, nämlich die Positionen +11, +14, +15 und +16 (Abb. 22, Spur 3; Spitalny und Thomm, 2003).

Bei der auch in Standard Transkriptionsansätzen eingesetzten NTP-Konzentration von jeweils 40 μM/NTP wurden verstärkt die Basen in der Transkriptionsblase des Elongationskomplexes modifiziert, während kaum noch Signale in dem Bereich der Blase von Initiationskomplexen

zu erkennen waren (Abb. 22, Spur 4). Für die weiteren Versuche wurde dementsprechend eine NTP-Konzentration von 10 μM /NTP eingesetzt.

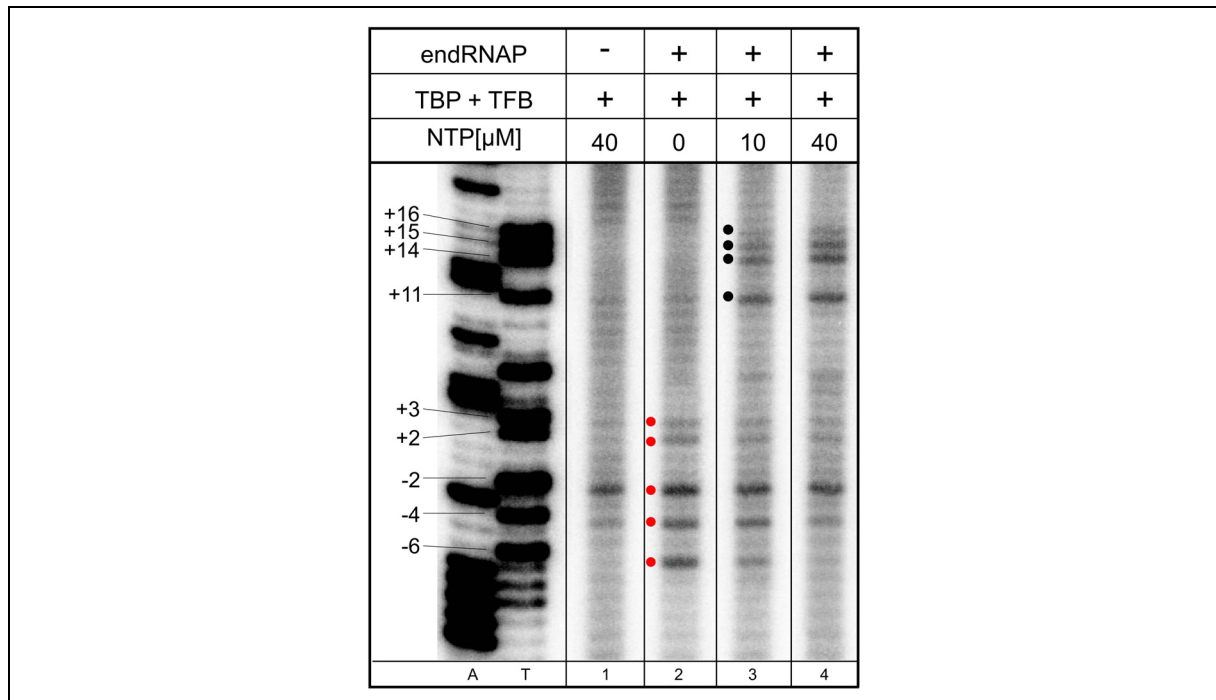


Abb. 22: Die Inkubation von RNAP mit *gdh*-C20 DNA-Matrize und NTP-Konzentrationen von 10 μM /NTP bei 70 °C führt zu einer Mischpopulation von pausierten ternären Komplexen und Initiationskomplexen. Einzelsträngige DNA-Bereiche wurden durch Verwendung des einzelstrang-spezifischen Reagenz KMnO_4 wie in Abschnitt III.7.3 beschrieben in 8%igen PA-Harnstoffgelen analysiert. Die Nummerierung der Thyminen in der T-Sequenz bezieht sich auf deren Position relativ zu dem Transkriptionsstartpunkt bei +1. 1.6 pmol radioaktiv markierte C-minus Kassetten des *gdh*-Promotors, TFB, TBP und RNAP (Spuren 2-4) wurden ohne NTPs (Spur 2), 10 μM /NTP (Spur 3) und 40 μM /NTP (Spur 4) inkubiert. Modifizierte Thyminen des nicht kodierenden Strangs im Bereich der Transkriptionsblase in Initiationskomplexen sind in Spur 2 durch rote Punkte gekennzeichnet. T-Positionen, die in der einzelsträngigen Region der Blase von pausierten Elongationskomplexen modifiziert wurden, sind mit schwarzen Punkten gekennzeichnet (Spur 3).

Wenn in den Startreaktionen TFE enthalten war, bevor die Reaktion durch Zugabe von NTPs gestartet wurde, resultierte das in einer Verstärkung sowohl der Signale der Transkriptionsblase des Initiationskomplexes als auch der Signale des pausierten Elongationskomplexes (Abb. 23, Vergleich der Spuren 2 und 3). Demzufolge beeinflusste das der Initiationsreaktion zugegebene TFE auch die pausierten ternären Komplexe. Dieser Effekt konnte nicht in einer vermehrten Anzahl gebildeter pausierter Komplexe begründet werden. Wie in Abschnitt IV.7 bereits aufgeführt, steigerte TFE die Anzahl gebildeter, pausierter ternärer Komplexe um ca. 20% (Abb. 21 A, Aktivitätsdiagramm), während die KMnO_4 -Sensitivität der Transkriptionsblase in Elongationskomplexen durch TFE um ungefähr das 4-fache gesteigert wurde (Abb. 23, Diagramm der KMnO_4 -Reaktivität neben dem Gel). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass TFE die Wiederaufnahme der pausierten Komplexe durch Stabilisierung der Transkriptionsblase erleichtert und stimuliert.

In dem Abschnitt IV.7 wurde aufgeführt, dass TFE keinen Effekt auf die Wiederaufnahme-Effizienz pausierter Komplexe hatte, wenn der Faktor erst nach dem Pausieren und Isolieren der stabilen ternären Komplexe zugegeben wurde (Abb. 21 C, Spuren 5, 6). Dementsprechend wurde untersucht, ob die Zugabe von TFE zu isolierten, pausierten Elongationskomplexen einen Effekt auf die Stabilität, bzw. der KMnO_4 -Reaktivität der Transkriptionsblase in dem entsprechenden Bereich hatte. In diesem Fall wurde TFE zu den isolierten ternären Komplexen gegeben und die Ansätze weitere 2 min bei 70 °C inkubiert. Während durch TFE

die Signale verstärkt wurden, die der Blase in Initiationskomplexen entsprachen (Positionen -6 bis +3), erfolgte keine Verstärkung der Signale der Elongationsblase (Abb. 23, Vergleich der Spuren 3, 4). Das bestätigte auch die Quantifizierung der Bande für die Position +11, die wegen der höchsten Signalstärke für diese Zwecke ausgewählt und in dem KMnO_4 -Reaktivitäts-Diagramm der Abb. 23 zusammengefasst wurde. Während TFE, das der Initiationsreaktion zugegeben wurde, die Sensitivität dieser Position um das 4-fache steigerte (Vergleich der Balken 1, 2), wurde die Reaktivität durch später zu den pausierten Komplexen gegebenes TFE nicht gesteigert (Vergleich der Balken 1, 3). Dieses Ergebnis bekräftigte die Aussage über den TFE-Effekt auf das Wiederaufnehmen der Transkription pausierter Komplexe, nämlich dass TFE nicht in der Lage ist, an stabile Elongationskomplexe zu binden, sondern während der Ausbildung des Initiationskomplexes gebunden werden muss.

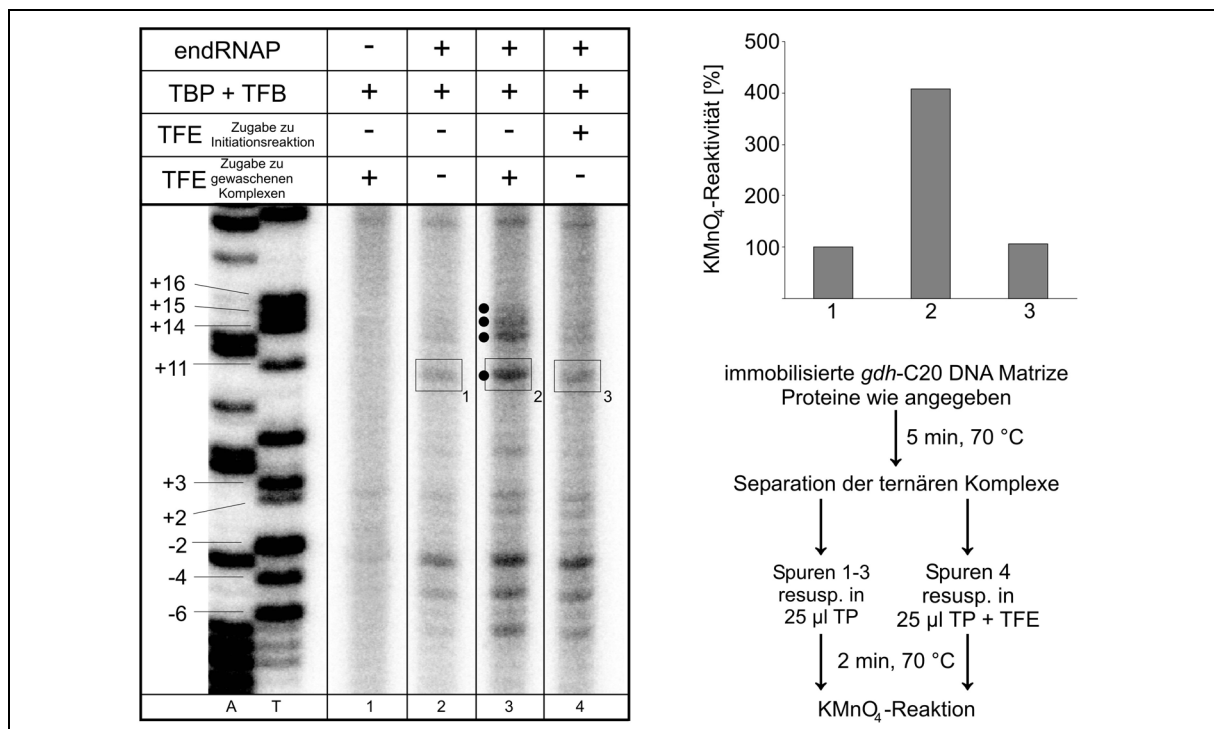


Abb. 23: TFE kann nicht funktionell mit stabilen Elongationskomplexen interagieren. Die Spuren 2-4 zeigen eine Mischpopulation geöffneter DNA-Regionen in Initiations- und Elongationskomplexen (pausiert an Position +20 relativ zu dem Transkriptionsstartpunkt bei +1 auf immobilisierten *gdh*-C20 DNA-Matrizen). T-Positionen wurden durch das Einzelstrang-spezifische Reagenz KMnO_4 in 8%igen PA-Harnstoffgelen analysiert. Die Reaktionen beinhalteten neben der radioaktiv markierten DNA noch TBP/TFB und endRNAP (wenn angegeben) und wurden für 5 min bei 70 °C inkubiert, isoliert, gewaschen, resuspendiert und anschließend weitere 2 min bei 70 °C inkubiert, bevor die Proben mit KMnO_4 versetzt wurden. Die in Spur 3 aufgetragenen Reaktionen enthielten 500 nM TFE, das zu der Initiationsreaktion zugegeben wurde, während den Reaktionen in Spur 4 erst nach dem Waschen TFE auf 500 nM zu den bereits pausierten Komplexen zugegeben wurde. Signifikant modifizierte Basen in der Region des Elongationskomplexes wurden durch schwarze Punkte gekennzeichnet (Spur 3). Für die Quantifizierung der KMnO_4 -Reaktivität wurden die Banden bei Position +11 ausgewählt und eingekästelt (Spuren 2-4) und die Sensitivität in dem Diagramm rechts oben neben dem Gel dargestellt. Der Versuchsablauf bis zu der KMnO_4 -Reaktion ist rechts unten neben dem Gel dokumentiert.

9. TFE ist Teil des Elongationskomplexes

Die Ergebnisse aus den in Abschnitt IV.8 beschriebenen KMnO_4 -Sensitivitäts-Versuchen hatten dokumentiert, dass die Transkriptionsblase von pausierten Elongationskomplexen mindestens an den Positionen +11, +14, +15 und +16 durch TFE stabilisiert wurde.

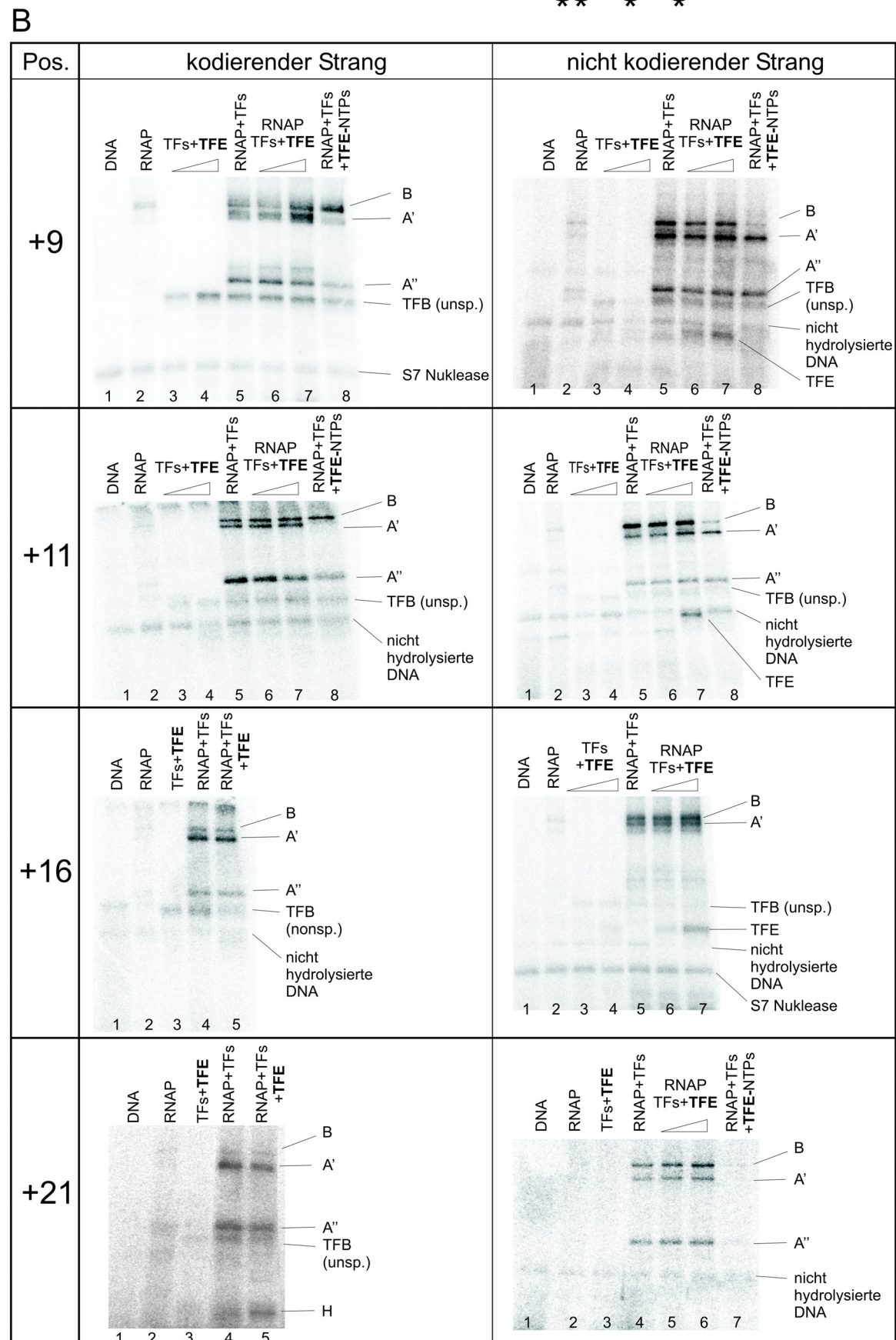
Um die molekulare Grundlage der TFE-Interaktion mit Elongationskomplexen detaillierter zu beschreiben, wurden DNA-Matrizen wie in Abschnitt III.9 beschrieben synthetisiert, die jeweils spezifisch an einer Position (+9, +11, +16, +21) entweder auf dem kodierenden (k)

oder dem nicht kodierenden (nk) Strang durch Derivatisierung mit APB durch UV-Bestrahlung photoaktiviert werden konnten. Anschließend wurden Cross-Links der RNAP und TFE an diese Matrize untersucht.

Da die RNAP in Initiationskomplexen eine Ausdehnung bis ca. Position +20 hat (Bartlett et al., 2004), wurden Kontrollversuche durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Signale aus den Cross-Linking Experimenten tatsächlich von pausierten Elongationskomplexen stammten. Dafür wurden Cross-Linking Ansätzen (III.9) für die Position +9 und +11 jeweils an beiden Strängen und +21 an dem nicht kodierenden Strang keine NTPs zugegeben, um das Bandenmuster des Initiationskomplexes zu erhalten, wie bereits von Bartlett et al., 2004 veröffentlicht (Abb. 24, jeweils Spur 8 in den entsprechenden Tafeln). In keiner dieser Reaktionen konnte eine Bindung von TFE an die entsprechenden Positionen nachgewiesen werden und das erhaltene Muster der RNAP Untereinheiten B, A' und A'' entsprach dem bereits veröffentlichten Bindungsmuster der Untereinheiten in Initiationskomplexen an die jeweiligen Positionen (Bartlett et al., 2004). Dieses Ergebnis zeigte, dass die Cross-Links von RNAP Untereinheiten oder TFE nach Zugabe von NTPs zu den Transkriptionsansätzen spezifisch für pausierte Elongationskomplexe waren.

Wie von Bartlett et al., 2004 beobachtet, hatte die RNAP Untereinheit B im Initiationskomplex an die Positionen +9 und +11 des kodierenden Strangs gebunden, während A' an den Positionen +9 und +11 des nicht kodierenden Strangs quervernetzt wurde. Die Untereinheit A'' wies an den Positionen +9 und +11 Kontakte mit beiden DNA-Strängen auf. An dem nicht kodierenden Strang wurde keine Untereinheit der RNAP in Initiationskomplexen an die Cross-Linking Position +21 gebunden.

Abb. 24 (nächste Seite): A, Sequenz und photoaktivierte Positionen der *gdh*-Promotor-DNA. Die DNA-Matrize für Cross-Linking Experimente umfasste die Region des *gdh*-C20 Promotors, der Transkriptionsstartpunkt +1 ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die TATA-Box und die Position +20, an der die Transkription pausiert wurde, sind eingekästelt. Die mit APB derivatisierten Phosphorothioat-Positionen (+9, +11, +16, +21) auf dem kodierenden (k) und dem nicht kodierenden (nk) Strang sind durch Sternchen gekennzeichnet. B, In Gegenwart von unspezifischer Kompetitor-DNA (Hering-Sperma-DNA) wurden auf der an einer spezifischen Position photoaktivierbaren DNA-Matrize an Position +20 pausierte Komplexe der RNAP gebildet. Spezifische Kompetitor-DNA (*gdh*-Promotor) wurde in großem Überschuss 2 min vor Bestrahlung der Proben mit UV-Licht und Nuklease-Behandlung der Proben zugegeben, um unspezifische Cross-Links von ungebundenen Transkriptionsfaktoren oder der RNAP an die DNA zu minimieren. Kovalent an die DNA gebundene Proteine wurden anhand von 4-19%iger SDS-Gelelektrophorese analysiert. Die Position der azidophenylisierten Phosphorothioat-Modifikation für jede Matrize ist links angegeben. Die linke Tafel zeigt die Cross-Linking-Reaktionen der Proteine mit Positionen auf dem kodierenden Strang, während die an Positionen des nicht kodierenden Strangs gebundenen Proteine in der rechten Tafel dargestellt sind. Über den Gelen ist jeweils angegeben, welche Proteine die Reaktionen enthielten. Die Dreiecke weisen auf eine Erhöhung der TFE-Konzentration von 140 nM auf 500 nM hin. Die durch Cross-Links an die DNA gebundenen Proteine wurden anhand ihrer Mobilität in der Gelelektrophorese identifiziert und werden rechts neben den Gelen angezeigt. Als Kontrolle, dass das erhaltene Bandenmuster auf quervernetzte Proteine pausierter Elongationskomplexe beruht, wurden ausgewählte Reaktionen ohne NTPs inkubiert (+9 k und +9 nk, Spuren 8; +11 k und +11 nk, Spuren 8; +21 nk, Spur 7). Die Cross-Linking Reaktionen für die Positionen +9 k und +21 nk wurden mit S7 Nuklease behandelt. Da dieses Enzym die Fähigkeit zur auto-katalytischen radioaktiven Eigenmarkierung besitzt, sind die Positionen der radioaktiv markierten S7 Nuklease rechts neben den Gelen angemerkt. Ebenso gekennzeichnet ist nicht hydrolysierte DNA, die in allen Spuren, also auch in den Reaktionen ohne Proteine in Spur 1 in allen Gelen auftritt.



9.1 Topographie der Untereinheiten pausierter Elongationskomplexe an den Positionen +9, +11, +16 und +21.

In Elongationskomplexen ohne TFE, die an Position +20 pausiert wurden, kam es zur Ausbildung von Cross-Links der Untereinheiten B, A' und A'' an die Positionen +9 und +11 auf beiden DNA-Strängen (Abb. 16, Tafeln +9 und +11, Spur 5). B interagiert an der Position +16 nur schwach mit dem kodierenden Strang (Tafel +16 k, Spur 4) und deutlich mit dem nicht kodierenden Strang (Tafel +16 nk, Spur 5). An Position +21 war eine Bindung von B nur noch an den nicht kodierenden Strang zu beobachten (Abb. 24, Vergleich Tafel +21 k und +21 nk, Spur 4). Während die Untereinheit A' mit den Positionen +16 und +21 an beiden Strängen interagiert (Abb. 24, Tafel +16 und +21), bildete A'' nur Cross-Links mit den Positionen +16 und +21 an dem kodierenden Strang (Abb. 24, Tafel +16 k, Spur 4; Tafel +21 k, Spur 4) und Position +21 an dem nicht kodierenden Strang (Abb. 24, Tafel +21 nk, Spur 4) aus. Interessanterweise wurde auch die Untereinheit H an die Position +21 des kodierenden Strangs gebunden, worauf in Abschnitt IV.10 explizit eingegangen wird.

9.2 TFE Interaktionen mit DNA in pausierten Elongationskomplexen

Wurde TFE in steigenden Konzentrationen zu Transkriptionsreaktionen mit NTPs, RNAP, TBP und TFB gegeben, konnten Cross-Links von TFE zu den Positionen +9, +11 und +16 spezifisch mit dem nicht kodierenden Strang nachgewiesen werden (Abb. 24, Tafeln +9 nk, +11 nk, +16 nk, Spuren 6, 7). Eine Bindung von TFE an Position +21 des nicht kodierenden Stranges konnte eben so wenig nachgewiesen werden, wie eine Interaktion von TFE mit allen untersuchten Positionen auf dem kodierenden Strang.

Zusätzlich wurde zum Teil auch das Bindungsmuster der RNAP Untereinheiten durch TFE verändert. So führte die Zugabe von TFE zu einer Verstärkung der Bindung von Untereinheit A' an die Position +9 des kodierenden Strangs (Abb. 24, Tafel +9 k, Vergleich Spuren 5, 7), bzw. der Untereinheit B an Position +21 des nicht kodierenden Strangs (Abb. 24, Tafel +21 nk, Vergleich Spuren 4, 6). Des Weiteren wurde der Cross-Link von A'' an Position +11 des kodierenden Strangs abgeschwächt (Abb. 24, Tafel +11 k, Vergleich Spuren 6, 7).

Zusammengenommen dokumentieren diese photochemischen Cross-Linking Versuche, dass TFE die Konformation von Elongationskomplexen beeinflusst und beweisen, dass TFE als Teil des Elongationskomplexes an den nicht kodierenden DNA-Strang im Bereich der Transkriptionsblase ternärer Transkriptionskomplexe bindet.

10. RNAP Untereinheit H interagiert in pausierten Elongationskomplexen im Bereich des aktiven Zentrums mit der DNA des kodierenden Stranges

Bartlett et al., 2004 haben in ihrer Arbeit zu der Topographie euryarchaeeller Initiationskomplexe Wechselwirkungen der Untereinheit H am stromabwärts gelegenen Ende der RNAP in binären Komplexen mit beiden Strängen der *gdh*-Promotor-DNA nachgewiesen. Elongationskomplexe, die an Position +20 pausiert worden, ergaben für die großen Untereinheiten der RNAP (B, A', A'') um das aktive Zentrum bei Position +20 auf dem transkribierten Strang ein nahezu identisches Cross-Linking Muster wie in dem Präinitiationskomplex um den Transkriptionsstartpunkt +1. Stromaufwärts des aktiven Zentrums (Positionen +21 bis +30) binden die Untereinheiten A' und A'', während B wie in dem Präinitiationskomplex den kodierenden Strang im direkt dem aktiven Zentrum angrenzenden Bereich nicht kontaktiert (Abb. 25, Position +21, Spur 1).

Während in dem initial gebildeten Transkriptionskomplex im Bereich des aktiven Zentrums kein Kontakt beider DNA-Stränge zu einer ca. 9.5 kDa großen RNAP Untereinheit gezeigt werden konnte, interagierte in dem frühen Elongationskomplex ein Protein dieser Größe mit den Positionen +21, +23, +25 und schwach auch Position +27 (Abb. 25, Spuren 1-4), nicht aber mit der Position +30 des kodierenden Strangs (Abb. 25, Spur5).

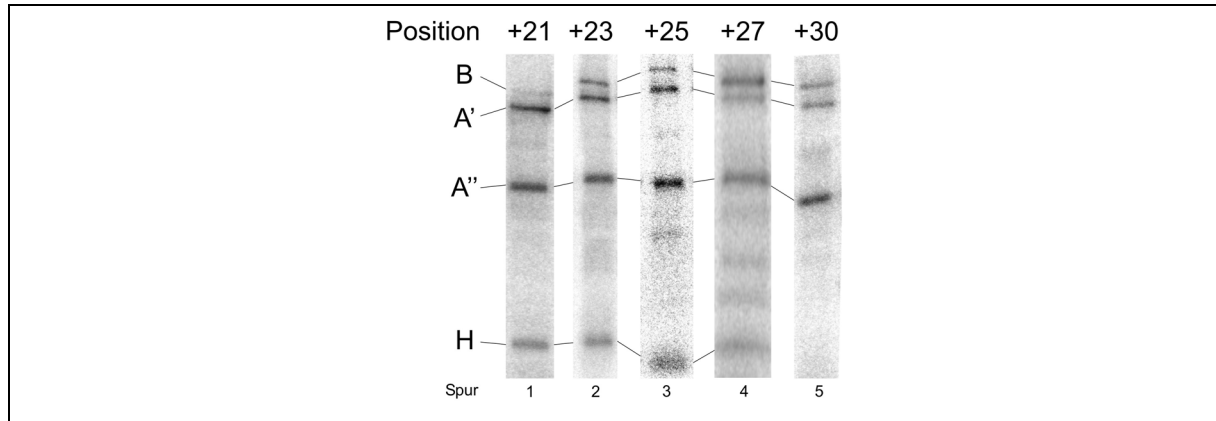


Abb. 25: Die RNAP Untereinheit H bindet in Elongationskomplexen DNA direkt stromabwärts des aktiven Zentrums. Die *gdh*-DNA-Matrize für diese Cross-Linking Experimente umfasste die Region von -165 bis +66 relativ zu dem Transkriptionsstartpunkt +1 mit APB derivatisierten Phosphorothioat-Modifikationen an den Positionen +21, +23, +25, +27 und +30 auf dem kodierenden Strang. Wie in Abb. 24 aufgeführt, wurden auf der an einer spezifischen Position photoaktivierbaren DNA-Matrize an Position +20 pausierte ternäre Komplexe gebildet und nach Aktivierung der Cross-Linking Position durch UV-Bestrahlung kovalent an die DNA gebundene Proteine in 4-19%igen SDS-Gradientengelen analysiert. Die Position der azidophenylisierten Phosphorothioat-Modifikation für jede Matrize ist über der jeweiligen Spur angegeben. Mit der DNA quervernetzte Proteine wurden anhand ihrer elektrophoretischen Mobilität identifiziert und links neben den Gel-Spuren gekennzeichnet.

Da unter den 11 Untereinheiten der *Pyrococcus* RNAP außer H kein Protein mit der entsprechenden Größe vorhanden ist, war anzunehmen, dass es sich bei dem gebundenen Protein um die Untereinheit H handelte. Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass es während oder nach dem Übergang von Initiation in die Elongation zu einer Umstrukturierung, bzw. Umlagerung der RNAP Untereinheit H kommt.

11. TFB2 induzierte Transkriptionskomplexe weisen einen spezifischen Defekt in der Ausbildung des offenen Komplexes auf, der von TFE teilweise kompensiert wird

Das Genom von *Pyrococcus furiosus* kodiert für zwei TFB Paraloge, TFB1 und TFB2, von denen TFB1 bereits ausgiebig beschrieben wurde und die beide *in vivo* exprimiert werden (Shockley et al., 2003). In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Mike Bartlett (PSU, Portland, Oregon, USA) wurde kürzlich TFB2 charakterisiert. Diese Arbeitsgruppe beobachtete, dass der C-terminale Teil von TFB2 dem C-Terminus von TFB1 sehr ähnlich ist, während die AS-Sequenz des N-terminalen Bereichs sich auch in der Region des konservierten Zink-Finger-Motivs (AS 7-39) deutlich unterscheidet. Des Weiteren konnten sie dokumentieren, dass TFB2 kein erkennbares B-Finger-Motiv besitzt und eine deutlich geringere Transkriptionseffizienz als TFB1 aufweist (unter anderem auch Ergebnisse von Andreas Franke, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg). Anhand von photochemischen Cross-Linking Experimenten wurde in Portland Evidenz dafür erbracht, dass TFB2 dennoch die Bildung von Initiationskomplexen ähnlich effizient wie TFB1 ermöglicht, was die Vermutung nahe legte, dass die geringe TFB2 induzierte Transkriptionsaktivität in einem der Initiation folgenden Schritte begründet ist (Micoreescu et

al., 2007). Zur weiteren Charakterisierung von TFB2 wurde die Ausbildung des offenen Komplexes in Gegenwart von TFB2 durch KMnO₄-Footprinting Experimente untersucht.

11.1 Ausbildung des offenen Komplexes durch TFB1 und TFB2

In Transkriptionsansätzen mit TBP und TFB1 steigerte die Zugabe von RNAP die KMnO₄-Reaktivität an den Positionen -6, -4, -2, +2 und +3 an dem nicht kodierenden Strang des *gdh*-Promotors (Abb. 26, Spur 2). Diese Positionen sind charakteristisch für einen vollständigen offenen Komplex, wie bereits im Abschnitt IV.2 und Spitalny und Thomm, 2003 beschrieben. Im Gegensatz dazu stimulierten Transkriptionskomplexe, die anstelle von TFB1 mit TFB2 gebildet wurden, die KMnO₄-Sensitivität in dem entsprechenden Bereich nur sehr schwach (ca. 14 bis 35 % je nach Position im Verhältnis zu den jeweils 100% KMnO₄-Sensitivität der entsprechenden Positionen in TFB1 induzierten Komplexen; Abb. 18, Vergleich Spuren 1, 2, 3 und Quantifizierung der jeweiligen Reaktivitäten in den Diagrammen unter dem Gel). Dieses Ergebnis wies auf einen Defekt im Öffnen oder Stabilisieren der Promotor-DNA von TFB2 induzierten Initiationskomplexen hin.

Wie in dem Abschnitt IV.3 beschrieben, stabilisiert TFE offene Komplexe. Außerdem fanden Werner und Weinzierl, 2005, dass Transkriptionsdefekte, die durch Mutationen des B-Fingers oder des Zink-Fingers von TFB hervorgerufen wurden, teilweise durch TFE kompensiert werden konnten. Das warf die Frage auf, ob TFE einen ähnlichen Effekt auf das Öffnen der Promotor-DNA durch TFB2 induzierte Transkriptionskomplexe hatte.

Die Zugabe von TFE zu Transkriptionsansätzen mit RNAP, TBP und TFB2 führte zu einer signifikanten Steigerung der Reaktivität nahezu aller T-Positionen auf dem nicht kodierenden Strang im Bereich der Transkriptionsblase (ca. 50 bis 80% je nach Position im Verhältnis zu den jeweils 100% KMnO₄-Sensitivität der entsprechenden Positionen in TFB1 induzierten Komplexen; Abb. 26, Vergleich Spuren 3 bis 5 und in den Diagrammen unter dem Gel), was bedeutete, dass TFE zum größten Teil in der Lage war, den TFB2 begründeten Defekt in der Ausbildung des offenen Komplexes zu kompensieren.

Interessanterweise wiesen Komplexe mit TFB2 auch in Gegenwart von TFE eine geringere KMnO₄-Reaktivität in dem stromaufwärts gelegenen Ende der Transkriptionsblase auf als Komplexe die mit TFB1 gebildet wurden (Vergleiche Abb. 13, 22 und 26). Dieser Befund wies darauf hin, dass die Struktur der mit TFB1 oder TFB2 gebildeten offenen Komplexe sich leicht unterscheidet und dass TFE diese Strukturänderung nicht vollständig aufheben konnte.

11.2 TFB1 und TFB2 induzierte Transkription an Heteroduplex- und Duplex-DNA

Da TFB2 einen Defekt bei der Ausbildung des offenen Komplexes aufwies, wurde im Folgenden untersucht, ob dieser Transkriptions-Defekt durch das Initiieren der Transkription an einer Heteroduplex-DNA-Matrize mit einer ungepaarten *gdh*-Promotor DNA-Region von Position -10 bis Position +3 aufgehoben werden konnte (Abb. 27 A). Es wurde die RNA-Synthese an Heteroduplex-Matrizen mit vorgeöffneter Transkriptionsblase mit der Transkription an geschlossenen Duplex-Matrizen verglichen.

An der Heteroduplex-DNA-Matrize war die RNAP auch ohne zusätzliche Transkriptionsfaktoren in der Lage, RNA-Produkte zu synthetisieren (Abb. 27 B, Spur 1). An der Duplex-Matrize konnte die RNAP alleine nicht transkribieren (Abb. 27 B, Spur 4).

TFB1 und TFB2 induzierten die Synthese von kurzen, 10-12 nt Transkripten sowie vollständig verlängerten Transkripten an beiden DNA-Matrizen.

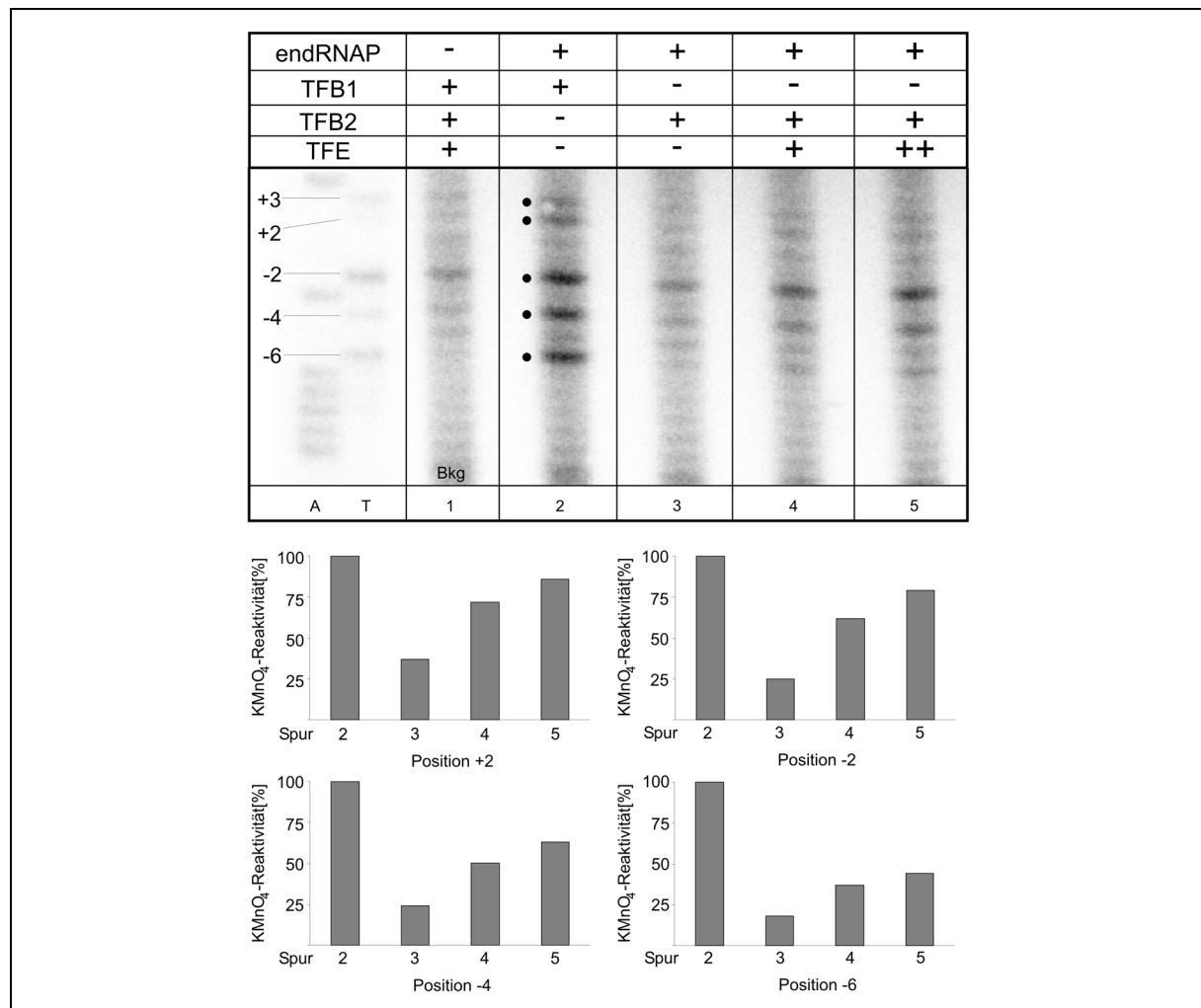


Abb. 26: Vergleich der Aktivität von TFB1 und TFB2 bei der Ausbildung des offenen Komplexes. Initiationskomplexe an radioaktiv markierter *gdh*-C20 Promotor-DNA mit 285 nM TBP, 47 nM TFB1 (Spur 1, 2) oder TFB2 (Spuren 1, 3-5), 70 nM RNAP (Spuren 2-5) und TFE (200 nM, Spur 4; 500 nM, Spur 5) wurden wie angegeben gebildet, isoliert, gewaschen und dann, wie in III.7.2 beschrieben, mit KMnO₄ behandelt um ungepaarte T-Positionen zu detektieren. Durch die A- und T-Sequenz-Reaktionen links neben den Spuren wurden die modifizierten T-Positionen identifiziert und zugeordnet. Die Intensität der Banden, die ungepaarte Thyminen an den Positionen -6, -4, -2 und +2 in den Spuren 3 bis 4 entsprechen, wurden quantifiziert und als Prozent der Reaktivität im Vergleich zu der jeweils als 100% gesetzten Reaktivität der Banden in Spur 2 in den Diagrammen unter dem Gel dargestellt.

Die kurzen RNA-Produkte stellen initiierte, TFB induzierte Transkripte dar, die durch die Anwesenheit von TFB an ihrer vollständigen Elongation gehindert werden (Naji et al., 2007 *Nucleic Acids Res*). Reaktionen, die mit TFB1 gestartet wurden, bildeten effizient die 10-12 nt Produkte an der Heteroduplex- sowie der Duplex-Matrize und vollständig verlängerte Transkripte an der Duplex-Matrize (Abb. 27 B, Spuren 2, 5). Im Gegensatz dazu synthetisierten TFB2 induzierte Komplexe an der Duplex-Matrize so gut wie keine RNA-Produkte (Abb. 27 B, Vergleich Spuren 5 und 7), während das Level der RNA-Synthese an der Heteroduplex-DNA-Matrize von Komplexen mit TFB2 annähernd TFB1-Level erreichte (Abb. 27 B, Vergleich Spuren 3 und 2).

Also erlaubte *gdh*-Promotor DNA mit vorgeöffneter Transkriptionsblase ein TFB2 induziertes Transkriptions-Level, welches ungefähr das der TFB1 induzierten Transkription erreichte. Die Zugabe von TFE zu Reaktionen mit TFB2 an der Duplex-DNA führte zu einer dramatischen Steigerung der Synthese von 10-12 nt und run-off Transkripten, besonders im Vergleich zu dem moderaten Effekt von TFE auf die TFB1 vermittelte RNA-Synthese (Abb.

27 B, Vergleich Spuren 5, 6, und 7, 8). Übereinstimmend mit dem Befund, dass TFE einen signifikanten stimulatorischen Effekt auf die Ausbildung des offenen Komplexes durch TFB2 hatte (IV.11.1), war TFE in der Lage, die schwache TFB2 vermittelte Aktivität an der Duplex-DNA-Matrize zu kompensieren.

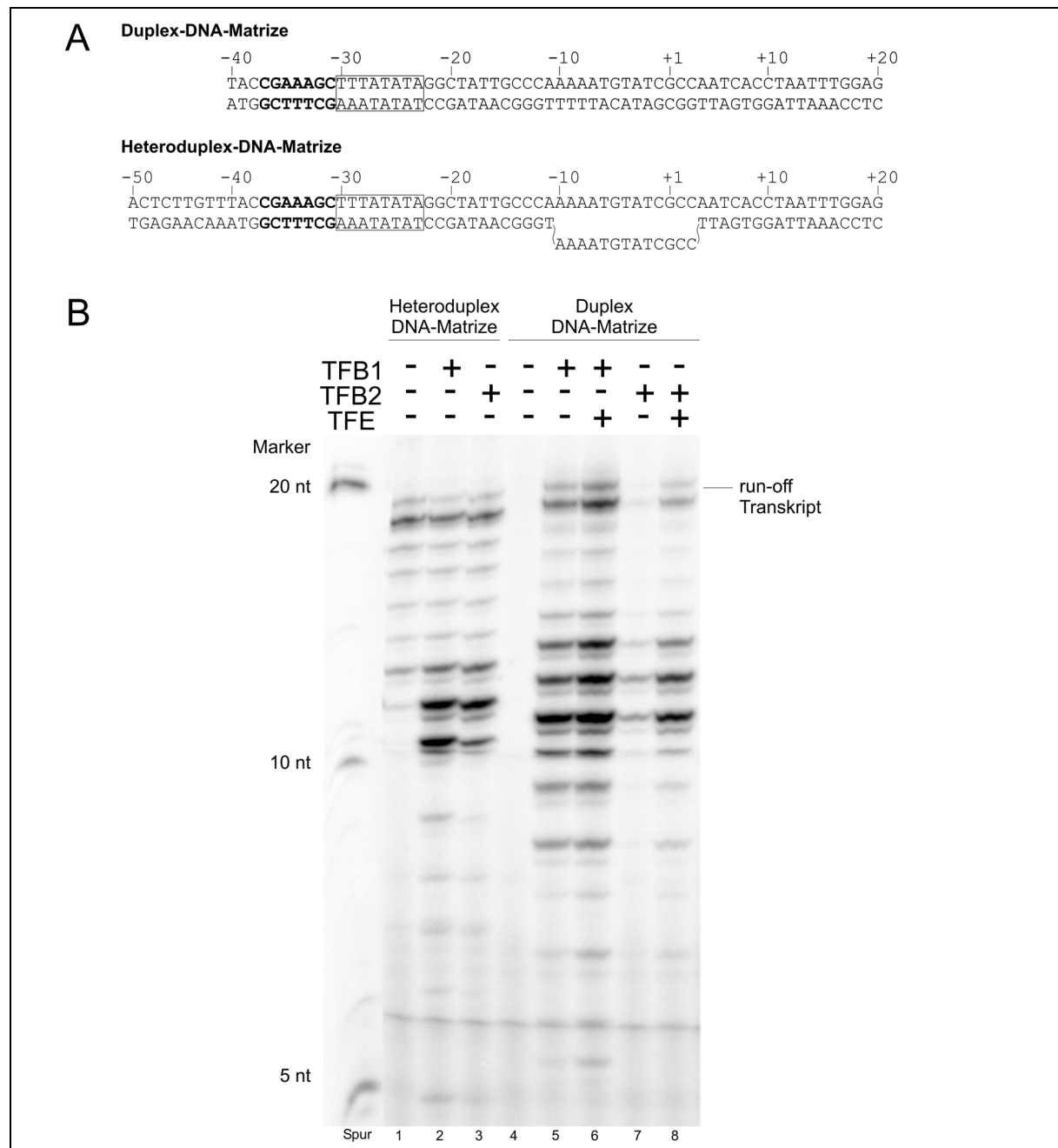


Abb. 27: Vergleich der TFB1 und TFB2 induzierten Transkription an Heteroduplex- oder Duplex-DNA-Matrizen. *A*, Sequenz der Duplex-DNA-Matrize und der Heteroduplex-DNA-Matrize mit vorgeöffneter Transkriptionsblase im Bereich von -10 bis +3 relativ zum Transkriptionsstartpunkt +1. Die TATA-Box ist eingekästelt, das BRE fett markiert. *B*, „Multiple-round“ Transkriptionsversuche wurden in Gegenwart oder Abwesenheit von TFB1 (47 nM), TFB2 (47 nM) und TFE (500 nM) wie über dem Gel angegeben an den Heteroduplex- (Spuren 1-3) und Duplex-Matrizen (Spuren 4-8; Sequenzen in Abschnitt III.5) von *gdh*-Promotor Derivaten durchgeführt und die Transkripte in 28%iger PA-Harnstoff-Gelelektrophorese analysiert. Die Größe der RNA-Produkte wurde durch RNA-Marker (III.6.2) links neben Spur 1 ermittelt.

V Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das bisherige Wissen über die Vorgänge bei der archaeellen Initiation und Elongation der Transkription fundamental erweitert werden. So wurde durch die Verwendung des rekonstituierten Core-Enzyms der archaeellen RNA Polymerase die Funktion des RNA Polymerase Subkomplexes E'/F bei der Ausbildung des offenen Komplexes durch Transkriptions- und KMnO_4 -Sensitivitäts-Experimente aufgeklärt.

Außerdem wurde erstmals eine duale Funktion des archaeellen Transkriptionsfaktors E (TFE) als Aktivitäts-stimulierender und Stabilitäts-vermittelnder Faktor während der Initiation beschrieben, der nur zu Präinitiationskomplexen rekrutiert werden kann und für dessen Wirkung teilweise eine funktionelle Interaktion mit den RNAP-Untereinheiten E' und F unerlässlich ist.

Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals gezeigt, dass TFE - im Gegensatz zu seinem eukaryotischen Homolog TFIIE - in der frühen Phase der Elongation einen funktionellen Teil der ternären Komplexe darstellt, indem TFE die Transkriptionsblase von Elongationskomplexen stabilisiert und so die Wiederaufnahme der Transkription von pausierten Elongationskomplexen signifikant stimuliert.

Überdies konnte durch Transkriptionsversuche an Heteroduplex- und Duplex-DNA-Matrizen sowie KMnO_4 -Footprinting-Experimente die Funktion des B-Finger Motivs auf dem für die Transkriptionsaktivität essentiellen N-terminalen Bereich des Transkriptionsfaktors B (TFB) aufgeklärt werden.

1. Das Rpb7 Ortholog E' stimuliert die Transkriptionsaktivität der RNAP bei niedrigen Temperaturen durch die Ausbildung des vollständigen offenen Komplexes

Der E'/F Subkomplex der archaeellen RNAP und die entsprechenden Orthologe bei den Eukarya, Rpb4/Rpb7 (RNAPII), Rpa14/Rpa43 (RNAPI) und Rpc17/Rpc25 (RNAPIII) werden durch ein Heterodimer gebildet, das ein typisches Merkmal von nicht bakteriellen RNAP ist (Sadhale und Woychick, 1994; Shpakovski und Shematorova, 1999; Werner et al., 2000; Peyroche et al., 2002; Siaut et al., 2003). Die Struktur des RNAPII Rpb4/Rpb7 Komplexes, als auch die des entsprechenden Rpc17/Rpc25 Komplexes bei RNAPIII weisen eine hohe Ähnlichkeit zu dem archaeellen E'/F Komplex auf (Todone et al., 2001; Siaut et al., 2003; Jasiak et al., 2006; Cramer et al., 2001), was eine funktionelle Ähnlichkeit sehr wahrscheinlich macht.

E' hat keinen Effekt auf die Elongation von pausierten ternären Komplexen (Abb. 10), was darauf hindeutete, dass die Aktivierung der Transkription auf der Ebene der Initiation stattfindet. Obwohl E' in der Zelle mit F komplexiert vorliegt, kann die Transkription bereits durch E' alleine signifikant gesteigert werden (Abb. 9 A, B), während die zusätzliche Anwesenheit von F die stimulierende Wirkung nur noch moderat verstärkt (Abb. 9 C). Die Erkenntnis, dass für die Ausbildung aktiver Transkriptionskomplexe das Vorhandensein des kompletten E'/F-Heterodimers nicht essentiell ist, sondern E' die Aktivität vermittelt, ist eine weitere Ähnlichkeit des archaeellen Transkriptionssystems zu dem polII-System.

Bei *Saccharomyces cerevisiae* ist das E' Ortholog Rpb7 essentiell für das Wachstum unter normalen Wachstumsbedingungen (McKune et al., 1993; Mitsuzawa et al., 2003), während das F Ortholog Rpb4 unter diesen Bedingungen entbehrlich ist und erst unter bestimmten Stress-Bedingungen wie zu hohen oder zu niedrigen Temperaturen für das Zellwachstum benötigt wird (Sheffer et al., 1999; Maillet et al., 1999; Choder, 2004).

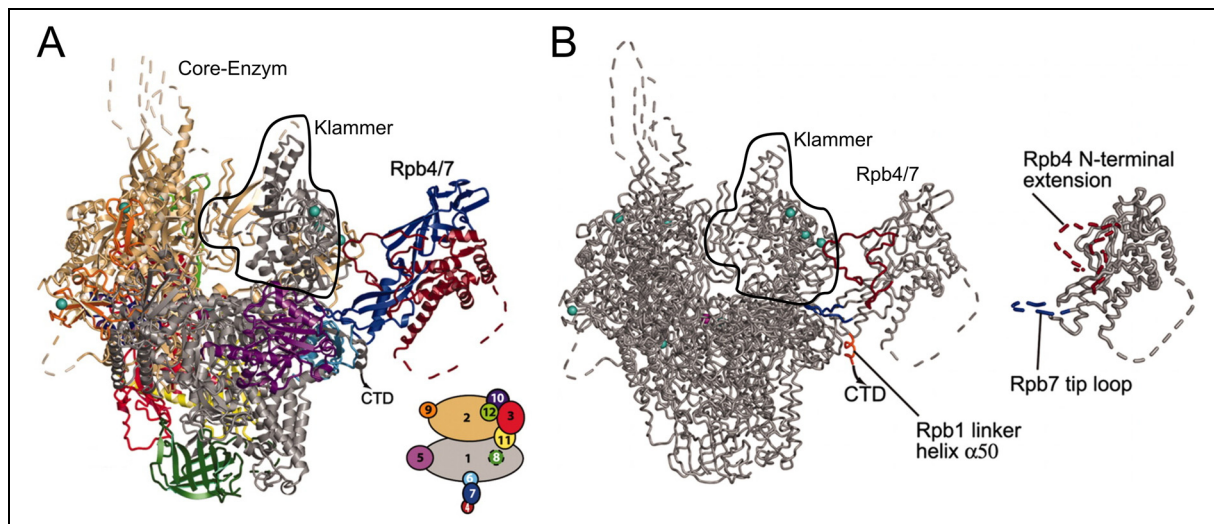


Abb. 28: *A*, Bänder-Diagramm der polII (verändert nach Armache et al., 2005). Die 12 Untereinheiten sind nach dem schematischen Diagramm rechts unten koloriert. Die gestrichelten Linien entsprechen ungeordneten Bereichen der Struktur. Die Sekundärstruktur des Core-Enzyms ist von Cramer et al., 2001 entnommen. Der Bereich der mobilen polII-Klammer ist durch den schwarzen Umriss gekennzeichnet. *B*, Strukturänderung des Core-Enzyms durch Bindung des Rpb4/7 Heterodimers. Die komplette polII-Struktur (links) und die des freien Rpb4/7-Subkomplexes (rechts) sind als graue Coils dargestellt. Elemente, die an der Bindung von Rpb4/7 an das Core-Enzym beteiligt sind, wurden farbig markiert (Rpb7 tip-loop, blau; Rpb4 Amino-terminale Ausdehnung; rot; $\alpha 50$ -Helix in dem Rpb1-Linker zu der CTD). Wie in *A* wurde hier die mobile Klammer auch schwarz gekennzeichnet.

Dieser Temperatur-sensitive Phänotyp von Δ Rpb4 Zellen kann durch eine Überexpression von Rpb7 teilweise aufgehoben werden, gerade bei Temperaturen unter dem Wachstumsoptimum (Sheffer et al., 1999), was für das eukaryotische polII-System bedeutet, dass Rpb7 auch unter bestimmten Stress-Einwirkungen unabhängig von Rpb4 die Transkription aktivieren kann (Choder, 2004). Die Interaktion des Rpb4/Rpb7-, bzw. des E'/F-Subkomplexes mit dem Core-Enzym der RNAP erfolgt ausschließlich über die konservierte „tip“-Region von E', bzw. Rpb7, die von zwei äußeren Loops der entsprechenden Untereinheit gebildet wird (Abb. 28; Armache et al., 2003 und 2005). Das in Abb. 9 dokumentierte Ergebnis, dass E' die Transkription auch ohne den Partner F über einen Bereich von 55 °C – 70 °C stimulieren kann, weist darauf hin, dass E', wie das eukaryotische Gegenstück Rpb7, als Monomere funktionell mit dem Core-Enzym interagieren kann. Die schwache Verstärkung der E' induzierten Stimulation der Transkriptionsaktivität des Core-Enzyms durch die Untereinheit F (Abb. 9 C) könnte dadurch bedingt sein, dass die Ausbildung des E'/F-Heterodimers durch Bindung von F zwischen die beiden N- und C-terminalen Domänen von E' (Todone et al., 2001) die Interaktion von E' mit dem Core-Enzym vereinfacht, bzw. die Interaktion von E' mit F die Bindung von E' an die RNAP Δ E'F stabilisiert (Armache et al., 2003). Verschiedene Gruppen haben auch schwache Interaktionen von Rpb4 zu weiteren Untereinheiten der Core-RNAP identifiziert, deren Aminosäuresequenzen aber nicht konserviert vorliegen und die auch *in vitro* nicht für die Bindung des Heterodimers an die Core-RNAP essentiell sind (Armache et al., 2005; Bushnell und Kornberg, 2003). Dennoch könnten schwache Bindungen von F an Untereinheiten des Core-Enzyms die Interaktion des Heterodimers mit der RNAP stabilisieren. Eine weitere Möglichkeit für die leichte Aktivitätssteigerung ist der vereinfachte Transport der RNA aus der RNAP. Der E'/F-Subkomplex nimmt eine strategischen Position nahe des Transkript-Austritts-Tunnels an dem 10 Untereinheiten Core-Polymerase-Enzym ein (zusammengefasst von Choder, 2004) und RNA-Bindung des Komplexes, bzw. der Untereinheit Rpb7 wurde bereits von Orlicky et al., 2001, Újvári und Luse, 2006 und Meka et al., 2003 berichtet. Die Daten dieser Arbeit zeigen zudem, dass E' auch einzelsträngige DNA binden kann (Abb. 18

B, Spur 5). Farago et al., 2003 dokumentierten, dass das F Ortholog Rpb4 unter bestimmten Stress-Bedingungen für den effizienten Transport von mRNA benötigt wird.

Obwohl F nicht essentiell für die E' induzierte Aktivitätssteigerung der RNAP Δ E'F (Abb. 9) und die E' vermittelte Aktivierung der Transkription durch TFE (Abb. 12 und 13) ist, hat die Untereinheit bei suboptimalen Inkubationstemperaturen einen dramatischen Effekt auf das Ausmaß der Aktivitätssteigerung durch TFE, wenn E' auch in den Reaktionen vorhanden ist (Abb. 12). Da für die E'/F Orthologe der Eukarya Interaktionen mit Initiationsfaktoren und weiteren Transkriptionsfaktoren bereits bekannt sind (Peyroche et al., 2000; Yuan et al., 2002), kann vermutet werden, dass TFE entweder indirekt durch eine F-induzierte Stabilisierung von E' mit einer eventuell damit verbunden Konformationsänderung des E'/F-Subkomplexes oder direkt durch zusätzlichen Bindungen von TFE an das E'/F Heterodimer vereinfacht zu dem Initiationskomplex rekrutiert werden kann.

2. Der duale Effekt von TFE auf die Initiation

Bisherige Studien an dem archaeellen TFIIE Ortholog zeigen, dass TFE unter bestimmten Bedingungen an manchen Promotoren die Transkriptionsaktivität steigern kann. Bell et al., 2000 beschreiben den Effekt, dass TFE die Bindung von TBP an die TATA-Box vereinfacht oder stabilisiert. Neuere Daten deuten darauf hin, dass TFE außerdem die Assoziation der RNAP mit der Promotorplattform in EMSAs verstärkt (Werner und Weinzierl, 2005) und funktionell mit dem E'/F-Komplex interagiert (Ouhammouch et al., 2004). Die Ergebnisse der KMnO₄-Footprinting Versuche bei 70 °C (Abb. 14) belegen, dass TFE das Öffnen der Promotor-DNA begünstigt und damit die Stabilität der offenen Initiationskomplexe signifikant steigert. Dieser Effekt wurde bereits für das eukaryotische Pendant zu TFE, TFIIE α berichtet (Meinhart et al., 2003; Forget et al. 2004). Um die Vorgänge während der Ausbildung des offenen Komplexes und die Effekte von E' und TFE detailliert zu untersuchen, wurde die Initiation durch das *Pyrococcus* Core-Enzym bei 60 °C als in einer Art Zeitlupe der Vorgänge bei 70 °C untersucht. Die E' induzierte 7-fache Verstärkung der Transkriptionsaktivität wurde durch TFE auf eine 14-fache Verstärkung gesteigert (Abb. 12 A). Die zusätzliche Zugabe von F führte sogar zu einer 25-fachen Stimulation der Aktivität (Abb. 12 A und B). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Effekte von E' und TFE auf die Aktivierung der Transkription synergistischer Natur sind.

Des Weiteren hat TFE auch einen E' unabhängigen Effekt auf die Initiation. Untersuchungen der kinetischen Stabilitäten offener Komplexe der endRNAP und des Core-Enzyms ergaben eine deutliche, E' unabhängige Wirkung von TFE auf die Stabilität von binären Komplexen (Abb. 16). Für die Rekrutierung von TFE zu Präinitiationskomplexen ist das Vorhandensein von E' also keine Voraussetzung.

Obwohl TFE in Abwesenheit von E' die Präinitiationskomplexe der RNAP Δ E'F und auch der endRNAP signifikant stabilisiert (Abb. 16), ist für den dramatischen stimulierenden Effekt von TFE auf die Transkriptionsaktivität des Core-Enzyms die Anwesenheit der Untereinheit E' eine Bedingung (Abb. 12 A, Vergleich Spuren 3 und 7).

Für zwei Wirkungen von TFE bei der Initiation spricht auch, dass der stabilisierende Effekt von TFE auf die Präinitiationskomplexe bei Inkubationstemperaturen von 70 °C am größten ist (Abb. 16, Vergleich A mit B, C), während TFE alleine auf die Transkriptionsaktivität des Core-Enzyms bei 60 °C und 70 °C ungefähr den gleichen schwachen stimulierenden Effekt hat (Vergleich Abb. 12 A, Spur 7 mit Abb. 13, Spur 7). In Gegenwart von E' hat TFE bei 70 °C einen deutlich geringeren aktivierenden Effekt (~ 2-fach; Abb. 13, Spur 3; Vergleich mit Bell et al., 2001) auf die Transkriptionsaktivität, als bei 60 °C Inkubationstemperatur (14-fach; Vergleich Abb. 12 A, Spur 3 mit Abb. 13, Spur 3).

Bei niedrigen Temperaturen und damit thermodynamisch erschwerter DNA-Aufschmelzung im Promotor-Bereich unterstützt TFE die Reifung von nur teilweise, bzw. schwach aktiven

Initiationskomplexen mit einer Transkriptionsblase minimaler Ausdehnung zu vollständig geöffneten und aktiven Komplexen (Abb. 12 A, Spur 3; Abb. 14 B, Spuren 4, 7). Die in dieser Arbeit dokumentierten Daten identifizieren die RNAP Untereinheit E' als entscheidenden Faktor für die TFE vermittelte Stimulation der Transkriptionsaktivität.

3. Wechselwirkungen der Faktoren E', F und TFE während der Initiation

Strukturanalysen der eukaryotischen RNAPII haben eine ausgeprägte Spalte identifiziert, in der die Bindestelle für die DNA und das aktive Zentrum positioniert sind (Cramer et al., 2001). Eine Wand der Spalte wird durch eine mobile Klammer gebildet, die in dem 10 Untereinheiten Core-Zustand der RNAP ohne den Rpb4/Rpb7 Heterodimer-Komplex in einer geöffneten Konformation vorliegt. In Elongationskomplexen hingegen ist die Klammer geschlossen und stabilisiert und fixiert den kodierenden DNA-Strang in der RNAP-Spalte. Obwohl noch nicht restlos aufgeklärt ist, wie der Rpb4/7-Komplex das Schließen der Klammer fördert, bildet die Rpb7 tip-Region einen Keil zwischen der Klammer, dem Verbindungsstück zu der C-terminalen Domäne der polIII und der Core-Untereinheit Rpb6, dem eukaryotischen Homolog zur archaeellen K Untereinheit (Abb. 1 und 28; Armache et al., 2003 und Bushnell et al., 2003). Dieser Keil bewirkt, dass die Klammer auch ohne gebundene DNA in dem geschlossenen Zustand verbleibt (Gnatt et al., 2001), hat aber keine weitere Änderungen der Konformation des Core-Enzyms zur Folge (Armache et al., 2005). Trotz einer vermutlichen Interaktion von Rpb7 mit der Klammer während der Initiation der Transkription (Patrick Cramer, persönliche Mitteilung), ist die Auswirkung dieser potentiellen Interaktion sowie die endgültige Funktion von Rpb7, bzw. E' während der Initiation noch unklar. Die Beobachtung von Goodchild et al., 2004, dass die intrazelluläre E'-Konzentration bei Zellwachstum bei niedrigen Temperaturen signifikant gesteigert wird, lässt für E' eine spezifische Rolle für die Transkription bei Temperaturen unterhalb des Wachstumsoptimums vermuten, die durch die Daten dieser Arbeit auf einen Effekt von E' auf die Ausbildung des offenen Komplexes zurückzuführen ist.

Es ist nicht belegt, ob das Vorhandensein von E' unbedingt für das Wachstum archaeeller Zellen benötigt wird. *In vitro* Transkriptionsversuche in dem *P. furiosus*-System ergaben, dass E' für die Transkription des *gdh*-Promotors bei 70 °C entbehrlich ist (Abb. 9 A und 11 A). Bei Inkubationstemperaturen von 60 °C hingegen ist E' entscheidend für eine effiziente Transkription (Abb. 9 B, 11 B, 12 A). Die Untersuchung der Ausbildung des offenen Komplexes bei der Initiation der Transkription an Matrizen des *gdh*-Promotors lieferte eine Erklärung für die stimulatorischen Effekte von TFE und E' auf die Initiation und identifizierten die Funktion der RNAP-Untereinheit E' während der Initiationsreaktion.

Die entscheidenden Funktionen von E' und TFE bei dem Aufschmelzen der Transkriptionsblase wurden anhand von KMnO₄-Footprinting-Experimenten mit der RNAPΔE'F bei 60 °C aufgeklärt, wobei E' die Ausbildung des offenen Komplexes auch für die endRNAP erleichtert (Abb. 14 B, Vergleich Spuren 2, 3). Das 9-Untereinheiten Core-Enzym ist in der Lage, eine minimale Transkriptionsblase auszubilden, die den Bereich von -2 bis -4 umfasst (Abb. 14 B, Spur 5 und Abb. 29 B). Das Aufschmelzen der DNA in diesem kleinen Bereich ist für eine effiziente Initiation nicht ausreichend, zeigt aber, dass das Core-Enzym mit der Promotorplattform aus TBP/TFB und der Promotor-DNA interagiert. Somit ist für eine stabile Bindung der RNAPΔE'F zu dem Promotor das Vorhandensein von E' keine Bedingung, wie auch das Vorhandensein des Rpb4/7-Heterodimers nicht entscheidend für die Rekrutierung der RNAPII ist (Orlicky et al., 2001). Die Zugabe von E' zu dem Core-Enzym stimulierte die Öffnung der Promotor-DNA und führte zu einer Ausdehnung der Transkriptionsblase über den Bereich des Transkriptionsstartpunkt hinaus (Abb. 14 B, Spur 6 und Abb. 29 C). Anscheinend ist die Öffnung der DNA in diesem Bereich ausschlaggebend für die Aktivierung der Transkription, da die Zugabe von E' die Aktivität stark stimuliert

(Abb. 9 B, 12 A). Ist zusätzlich TFE in den Reaktionen vorhanden, führt dies zu einer weiteren Öffnung der Transkriptionsblase, im Besonderen im Bereich stromaufwärts des aktiven Zentrums bei Position +1 an Position -6 (Abb. 14 A, Spur 4; 14 B, Spur 7 und Abb. 29 D). Die TFE induzierte Ausbildung des vollständigen offenen Komplexes (Spitalny und Thomm, 2003) hat eine weitere signifikante Aktivierung der Transkription zur Folge (Abb. 12, Vergleich Spuren 10, 3).

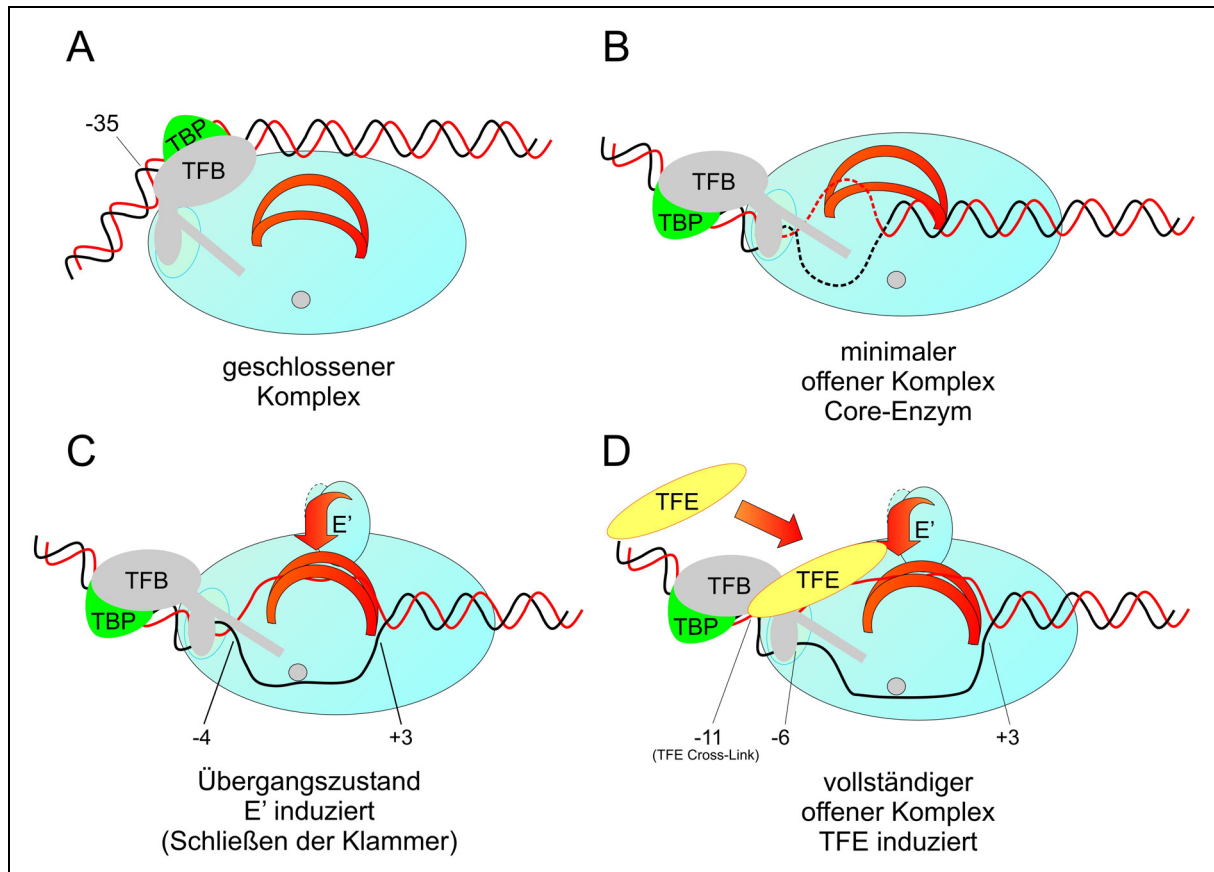


Abb. 29: Schematische Darstellung der Vorgänge während der Initiation. *A*, Die RNAP wird durch Bindung der Dock-Domäne an das Zink-Finger Motiv von TFB zum Promotor-Komplex rekrutiert (RNAP, blau; Dock-Domäne, hellblau; RNAP-Klammer, rot-orange; aktives Zentrum, grauer Punkt; kodierender Strang, schwarz, nicht kodierender Strang, rot; TBP, grün; TFB, grau). *B*, Nach einer TFB-induzierten Konformationsänderung ist das Core-Enzym der RNAP alleine in der Lage, einen minimalen offenen Komplex auszubilden. *C*, Die Interaktion des Core-Enzyms mit dem E'/F-Subkomplex induziert das Schließen der RNAP-Klammer, was eine Ausweitung der Transkriptionsblase über den Transkriptionsstartpunkt hinaus zur Folge hat. *D*, TFE (gelb) bindet die DNA des nicht kodierenden Strangs im Bereich der Transkriptionsblase und stromaufwärts davon sowie an die RNAP-Klammer, was eine Stabilisierung des offenen Komplexes und eine weitere Ausweitung der Transkriptionsblase, im Besonderen stromaufwärts des Transkriptionsstartpunkts zur Folge hat.

Da E' nur einen marginalen Effekt auf die Ausbildung des offenen Komplexes bei Inkubationstemperaturen von 70 °C hat (Vergleich Abb. 14 A, Spuren 2, 3 und Abb. 14 B, Spuren 2, 3), ist die E' induzierte Öffnung der Promotor-DNA möglicherweise unter den normalen Wachstumsbedingungen des Hyperthermophilen *Pyrococcus furiosus* keine Bedingung für eine effiziente Transkriptionsaktivität. Die hier vorgestellten Ergebnisse sind dennoch von großer Bedeutung für den Mechanismus der Transkriptions-Initiation von polIII-ähnlichen Polymerasen. Das Core-Enzym der RNAPII wird wie das Core-Enzym der archaeellen RNAP zu der von TBP und TFIIB gebildeten Promotorplattform rekrutiert (Ruet et al., 1980; Edwards et al., 1991) und das Rpb7/4-Heterodimer hält die mobile Klammer der RNAP-Spalte geschlossen. Die Beobachtung, dass die Interaktion von E' mit der an den Promotor gebundenen RNAPΔE'F zu der entscheidenden Ausweitung der minimalen

Strangöffnung bei Position -2 und -4 zu einem transkriptionskompetenten, offenen Komplex führt, impliziert ein E' induziertes Schließen der mobilen Klammer. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des E'/F-Subkomplexes mit dem Rpb4/7 Heterodimer ist die in dieser Arbeit dokumentierte Funktion der E' Untereinheit bei der Initiation der Transkription höchstwahrscheinlich auch für den Mechanismus der eukaryotischen Initiation von signifikanter Bedeutung.

Kürzlich wurde die Kontaktstelle des eukaryotischen Orthologs zu TFE an die RNAPII identifiziert. Der Transkriptionsfaktor IIE bindet bei seiner Assoziation mit dem Präinitiations-komplex an die Domäne der Rpb1 Untereinheit, die die Klammer bildet (Abb. 30; Chen et al., 2007). Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass TFE das Schließen der Klammer während der Initiation der Transkription weiter stimuliert und/oder stabilisiert. Des Weiteren identifizierten Cross-Linking Versuche in polII-Initiationskomplexen TFIIIE Interaktionen mit der Promotor-DNA im Bereich der Transkriptionsblase und stromaufwärts davon (Miller und Hahn, 2006; Kim et al., 2000). Forget et al., 2004 wiesen spezifische Interaktionen der TFIIIE α -Untereinheit mit der Position -11 nach, die Miller und Hahn, 2006 anhand von Spaltungsreaktionen als Kontakte der winged-helix Region dieser Untereinheit identifizierten. Die Gruppe von Mike Bartlett (PSU, Portland, Oregon, USA) dokumentierten in dem *P. furiosus* Initiationskomplex Kontakte von TFE mit dem nicht kodierenden Strang der *gdh*-Promotor-DNA an den Positionen -9 und -11, also dem stromaufwärts gelegenen Ende der Transkriptionsblase, stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes bei Position +1 (Grünberg et al., 2007). Die Interaktion erfolgte durch Bindung des N-terminalen Teils von TFE, der wie der N-Terminus von TFIIIE α mit der winged-helix-Struktur eine potentielle DNA-Bindungsstelle trägt (Abb. 17 und Meinhart et al., 2003; Vierke et al., 2003).

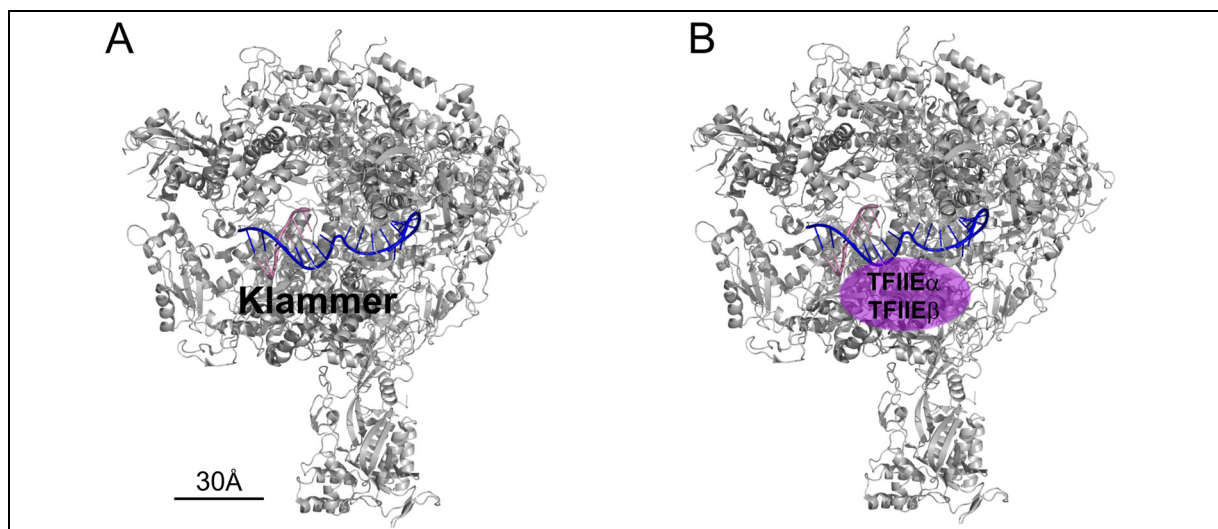


Abb. 30: Bindung von TFIIIE an die mobile Klammer der polII (PDB 1nt9; Armache et al., 2003). *A*, Struktur der 12-Untereinheiten polII und gebundener DNA (blau: kodierender Strang, pink: nicht kodierender Strang). Die Position der von der Untereinheit Rpb1 gebildeten Klammer ist gekennzeichnet. *B*, Das Modell aus *A* mit lila hervorgehobenen Protein/Protein-Interaktionsstellen von TFIIIE (TFIIIE α und TFIIIE β) mit der RNAP-Klammer (verändert nach Chen et al., 2007)

Keine TFE/DNA-Kontakte konnten für den kodierenden Strang und den nicht kodierenden Strang stromaufwärts von Position +11 nachgewiesen werden. Forget et al., 2004 beobachteten TFIIIE/DNA-Kontakte auch stromabwärts des Transkriptionsstartpunkt, wie die Arbeitsgruppe von Mike Bartlett (PSU, Portland, Oregon, USA) in Grünberg et al., 2007, die schwache TFE-Kontakte mit dem nicht kodierenden DNA-Strang an Position +4 erfassten.

Diese Daten dokumentieren, dass archaeelles und eukaryotisches TFIIIE α über die konservierte winged-helix Domäne in Präinitiationskomplexen mit dem gleichen Promotor-DNA-Bereich interagieren, nämlich in der Region in und stromaufwärts der Transkriptionsblase. Die Bindefähigkeit von TFE an doppelsträngige DNA konnte in EMSAs jedoch nicht nachgewiesen werden (Meinhart et al., 2003). In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass archaeelles TFE wie TFIIIE (Kuldell und Buratowski, 1997) mit einzelsträngiger DNA interagieren und durch Cross-Linking-Versuche kovalent an diese gebunden werden kann (Abb. 18). Außerdem besitzt TFE eine hohe Bindungsaffinität zu einzelsträngiger DNA in Heteroduplex-Bereichen von transkriptionsfähigen *gdh*-Promotor-Matrizen, unabhängig davon, ob RNAP der Reaktion zugegeben wurde oder nicht (Abb. 19 C, Spuren 2, 4). Die Fähigkeit, einzelsträngige DNA binden zu können und die hohe Affinität von TFE zu Heteroduplex-Bereichen in doppelsträngigen DNA-Matrizen zusammengekommen mit den Ergebnissen der Bartlett-Gruppe in Grünberg et al., 2007, dass TFE in Präinitiationskomplexen im Bereich stromaufwärts der Transkriptionsblase spezifisch an den nicht kodierenden DNA-Strang bindet sowie dem Befund, dass TFE die Ausbildung des offenen Komplexes im Besonderen in dem stromaufwärts gelegen Ende der Blase stimuliert (Abb. 14), weist stark auf folgendes Modell zur Ausbildung eines vollständigen offenen Komplexes hin: Der minimale offene Komplex des an die Promotorplattform rekrutierten Core-Enzyms (Abb. 29 B) wird durch Bindung des E'/F-Subkomplexes und dem damit verbundenen Schließen der RNAP-Klammer zu einem transkriptionsaktiven, offenen Komplex ausgeweitet (Abb. 29 C). TFE bindet im Folgenden schwach, aber unzweifelhaft an den Bereich des nicht kodierenden Strangs, der außerhalb der Klammer exponiert ist und das stromaufwärts gelegene Ende der Transkriptionsblase darstellt. Diese Bindung von TFE an den nicht kodierenden DNA-Strang ist ausschlaggebend für die Stabilisierung der offenen Komplexe (Abb. 14 A, Spur 4; Abb. 14 B, Spuren 4 und 7). Da TFE auch in Abwesenheit von E' Promotor-gebundene Komplexe des Core-Enzyms stabilisiert (Abb. 16) und kürzlich Chen et al., 2007 zeigten, dass unter anderem TFIIIE α auch direkt mit der Klammer-bildenden Rpb1 Untereinheit der polIII interagiert, lässt das vermuten, dass TFE jedenfalls teilweise die Klammer-schließende Funktion des E'/F-Subkomplexes ersetzen kann (Hayashi et al., 2005).

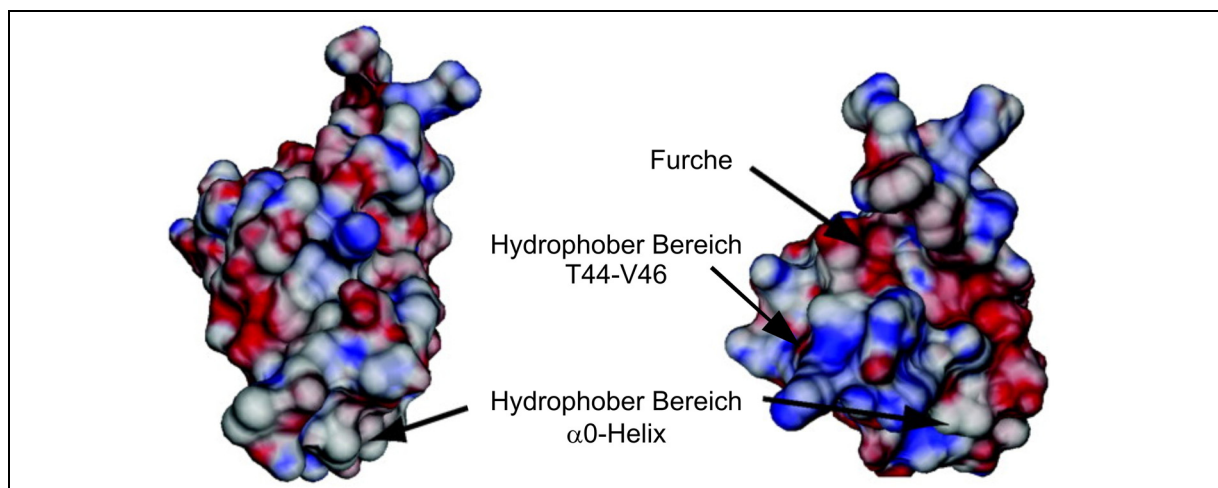


Abb. 31: Elektrostatisches Oberflächenpotential und potentielle Protein/Protein- und Protein/DNA-Interaktionsflächen von TFE (verändert nach Meinhart et al., 2003). TFE ist sphärisch dargestellt und die Oberflächenladungen sind entsprechend dem elektrostatischen Potential von negativ (rot) bis positiv (blau) farbig markiert. Zwei hydrophobe Bereiche, die vermutlich Protein/Protein-Interaktionsflächen von TFE mit der RNAP und/oder TBP darstellen und die Furche mit DNA-Bindungspotential sind angezeigt.

Aufgrund der großen Strukturähnlichkeit von E'/F und TFE zu deren eukaryotischen Orthologen und der gleichen Anordnung von TFE in Präinitiationskomplexen von Archaeen und Eukaryoten ist es höchstwahrscheinlich, dass die hier im *P. furiosus*-System gewonnen

Daten auch von großer Bedeutung für die Vorgänge der eukaryotischen Transkriptionsinitiation der polIII-ähnlichen RNAP sind.

Neben der Interaktion von TFE mit der DNA und der RNAP in Initiationskomplexen bindet archaeelles TFE unabhängig von der Gegenwart von DNA an TBP (Bell et al., 2001). Das Fehlen von TFIIF und TFIIH in der archaeellen Transkriptionsmaschinerie und die TBP-bindende Fähigkeit von TFE schlagen TFE auch als Brücken-bildenden Faktor zwischen der RNAP und der Promotorplattform, im Besonderen TBP, vor (Meinhart et al., 2003). Die N-terminale Domäne TFE aus *S. solfataricus* weist zwei hydrophobe Bereiche auf, die als mögliche Protein-Interaktionsflächen vorgeschlagen werden (Abb. 31; Meinhart et al., 2003) und die in eukaryotischen und archaeellen TFIIE α , bzw. TFE konserviert vorliegen. So findet sich auch bei *P. furiosus* TFE ein großer hydrophober Bereich, der die Positionen A9-A14 in der exponierten Seite der α 0-Helix, ca. 30 Å entfernt von der Furche umfasst. Ein kleiner hydrophober Bereich wird durch die Aminosäuren an den Positionen T44-V46 gebildet und flankiert die α 3-Helix auf der Gegenseite der Furche (Meinhart et al., 2003 und Abb. 17). Eine mögliche Interaktion von TFE mit der RNAP und TBP könnte über diese Positionen erfolgen. Eine derart ausgebildete Stabilisierung von TATA-Box gebundenem TBP durch TFE und damit verbundener RNAP-Rekrutierung könnte auch der entscheidende Faktor für den dramatischen stimulierenden Effekt von TFE auf die Synthese von kurzen, abortiven Transkripten mit 5 nt Länge sein (Abb. 20). Um die Interaktion von TFE mit potentiellen Interaktionspartnern weitergehend zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Mutanten von TFE konzipiert, bei denen die α 0-Helix und damit auch der große hydrophobe, potentiell Protein-bindende Bereich entfernt wurde. Die funktionelle Analyse dieser Mutanten erfolgt in Untersuchungen, die sich dieser Arbeit anschließen. Interessanterweise ist die Ausbildung eines abortiven 4 nt RNA-Produkts ein charakteristisches Merkmal für instabile, frühe Elongationskomplexe im eukaryotischen polIII-System, die sich noch nicht von der Promotor-Plattform gelöst haben (zusammengefasst von Dvir, 2002 und Hsu, 2002; Kugel und Goodrich, 2002). Die Beobachtung, dass TFE Präinitiationskomplexe des Core-Enzyms ohne die Untereinheiten E'/F in Gegenwart von Heparin stabilisiert (Abb. 16) unterstützt die These, dass TFE die Bindung der RNAP an die Promotorplattform - vermutlich als verbindender Faktor zwischen TBP und dem Core-Enzym - verstärkt. Diese verstärkte Bindung und die Stabilisierung der Transkriptionsblase in Promotor-gebundenen Komplexen (Abb. 14) führt zu einer stark aktivierten abortiven Transkriptionsrate der durch TFE an den Promotorkomplex aus TBP/TFB gebundenen RNAP, da der Vorgang des Loslösen der RNAP von dem Promotor-Komplex durch TFE in dem archaeellen und dem eukaryotischen System erschwert wird.

4. Eine vollkommen neuartige Funktion von TFE in der Elongation

Die Rolle des aus den Untereinheiten TFIIE α und TFIIE β bestehenden eukaryotischen Orthologs zu TFE während der Initiation der Transkription ist bisher als TFIIH rekrutierender und stimulierender Faktor beschrieben und von Ohkuma, 1997 zusammengefasst worden. TFIIE, TFIIH und ATP sind für die „promoter-clearance“ und einen effektiven Übergang von Initiation zu Elongation nötig. TFIIE dissoziiert allerdings noch vor dem Erreichen der Position +10 (Zawel et al., 1995), und damit vor der Ausbildung eines stabilen Elongationskomplexes (Dvir et al., 1997 *J. Biol. Chem.* und 1997 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*). Dennoch wird für das polIII-System eine potentielle Rolle von TFIIE in der Elongationsreaktion der RNAPII nicht vollständig ausgeschlossen. So wird unter anderem spekuliert, ob TFIIE eine Rolle bei der Rekrutierung von DNA-Reparaturfaktoren, so genannten NER(nucleotide excision repair)-Faktoren an beschädigte DNA-Bereiche hat oder im Falle einer Transkriptions-gekoppelten NER eine Funktion bei der Wiederaufnahme der Elongation hat (Park et al., 1995; Selby und Sancar, 1997). Es wird auch nicht

ausgeschlossen, dass TFIIE nach dem Verlassen des Initiationskomplexes vorübergehend wieder mit pausierten polII-Komplexen interagieren kann, z.B. um TFIIH zu diesen Komplexen zu rekrutieren. Die TFIIE induzierte Kinase-Aktivität könnte zu der schnellen Phosphorylierung der C-terminalen Domäne der RNAPII und damit einer Reaktivierung der Prozessivität der polII führen (Ohkuma, 1997). Doch da in dem archaeeellen System weder spezifische DNA-Reparatur-Faktoren, noch ein archaeeelles TFIIH-Ortholog bekannt sind, erscheinen diese Funktionen von TFE jedenfalls in dem archaeeellen System eher unwahrscheinlich.

Umso überraschender waren die in dieser Arbeit gewonnenen Daten, dass TFE eine zusätzliche, vollkommen unvorhergesehene Funktion bei der Elongation früher Transkriptionskomplexe innehat.

Zum einen zeigen Transkriptionsversuche an immobilisierten *gdh*-Promotor-Matrizen, dass TFE die Wiederaufnahme-Effizienz von ternären Elongationskomplexen erhöht, die an Position +20 pausiert wurden (Abb. 21). Da die Zugabe von TFE zu bereits pausierten und isolierten ternären Komplexen keinen Einfluss auf deren Wiederaufnahme hat (Abb. 21 C), bedeutet das für die Assoziation von TFE, dass der Transkriptionsfaktor nur bei der Formierung des Präinitiationskomplexes funktionell gebunden werden kann, nicht aber zu späteren Zeitpunkten des Transkriptions-Zyklus. Auch TFIIE wird während der Ausbildung des Präinitiationskomplexes gebunden (zusammengefasst in Ohkuma, 1997). Die hier präsentierten Ergebnisse machen eine nachträgliche Interaktion des freigesetzten TFIIE mit der RNAPII nach dem Übergang von Initiation zu Elongation eher unwahrscheinlich, schließen diese aber nicht aus, da TFE nur einen kleinen, wenn auch essentiellen Teil des N-terminalen Endes der α -Unterheit von TFIIE ausmacht. Interaktionen der anderen TFIIE-Bereiche mit der RNAPII könnten eine spätere Interaktion unter Umständen ermöglichen.

Des Weiteren konnte durch KMnO₄-Footprinting-Experimente dokumentiert werden, dass TFE einen dramatischen stabilisierenden Effekt auf die Transkriptionsblase in pausierten Elongationskomplexen hat (Abb. 23). Da TFE nur mit Präinitiationskomplexen assoziieren kann, bedeutet das für die in Abb. 15 dokumentierten Ergebnisse, dass TFE nach der Initiation komplexiert mit der RNAP in den Elongationszyklus eintritt und funktionell die Transkriptionsblase in Elongationskomplexen stabilisiert. Das TFE tatsächlich als Teil der Elongationskomplexe vorliegt, wurde durch photochemische Cross-Linking-Versuche gezeigt (Abb. 24). In Elongationskomplexen, die bei Position +20 pausiert wurden, interagiert TFE spezifisch mit dem nicht kodierenden Strang der *gdh*-C20 Matrize, und zwar an den Positionen von +9 bis +16. Dieser Bereich ist deckungsgleich mit der Region der Transkriptionsblase in den entsprechenden pausierten ternären Komplexen (Abb. 22 und 23). Das bedeutet, dass TFE in Elongationskomplexen spezifisch an den nicht kodierenden Strang im Bereich der Transkriptionsblase und deren stromaufwärts gelegenen Ende bindet. Eine besonders wichtige Rolle für die Funktion von TFE könnte dementsprechend der negativ geladene Bereich am Eingang der potentiellen DNA-bindenden Spalte (siehe IV.4 und Meinhart et al., 2003) darstellen, der Ursprung für die Disqualifizierung von TFE als DNA-bindendes Protein durch Meinhart et al., 2003 war. Vermutlich kann die DNA des nicht kodierenden Stranges, behindert durch den oben beschriebenen negativ geladenen Bereich, nur schwach mit der positiv geladenen, DNA-bindenden α 3-Helix interagieren. Diese Bindung ist ausreichend, um den offenen Komplex zu stabilisieren, aber nicht so stark, um die Elongation zu blockieren, was der Fall bei einer stabilen, „Winged-Helix“-typischen Bindung von TFE an den nicht kodierenden Strang wäre. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine TFE-Mutante entworfen, bei der die für die negative Ladung verantwortlichen Aminosäuren (D37, E38, E39) jeweils durch Alanin ersetzt wurden. Die experimentelle Untersuchung der Mutante soll im Anschluss an diese Arbeit erfolgen.

Interessanterweise weist das Cross-Linking Muster der RNAP-Untereinheiten A', A'' und B in pausierten ternären Komplexen an den entsprechenden DNA-Positionen mit TFE ein

anderes Cross-Linking Profil auf als die ohne TFE gebildeten Komplexe (Abb. 24). Die Ergebnisse aus den KMnO_4 -Footprinting- und den Cross-Linking-Experimenten erbringen den Nachweis, dass TFE ein funktioneller Teil von frühen Elongationskomplexen ist und Auswirkungen auf die Konformation der ternären Komplexe hat. Die Wirkung des TFE-induzierten Effekts auf die Stabilität der Transkriptionsblase in Elongationskomplexen *in vivo* ist spekulativ. Die hier präsentierten *in vitro* Daten lassen vermuten, dass die Assoziation von TFE mit Elongationskomplexen deren Prozessivität deutlich steigert und die Verweilzeit von ternären Komplexen an Stopp-Positionen deutlich reduziert. Diese verkürzte Verweildauer pausierter Komplexe und die höhere Prozessivität bei der Transkription langer Operons mit mehreren hintereinander liegenden Genen hätte einen bedeutenden kumulativen Effekt auf die Effizienz der Transkription.

Da TFE vermutlich den Vertreter von TFIIE darstellt, der alle ursprünglichen Funktionen dieser Transkriptionsfaktoren-Familie besitzt, kann nur vermutet werden, dass es sich bei der stabilisierenden Wirkung von TFE auf die Transkriptionsblase auch in Elongationskomplexen um eine Kern-Funktion von TFE handelt. Diese könnte unter Umständen zum Tragen kommen, wenn TFIIF im eukaryotischen polII-Transkriptionssystem nicht oder nur unterrepräsentiert vorliegt. Wie bereits oben angedeutet, ist das Loslösen von TFIIE bei dem Übergang von Initiation zu Elongation vermutlich mit dem Zugewinn an weiteren Aufgaben während der Initiation und möglicherweise auch der Elongation zu begründen (Meinhart et al., 2003). Ein nachträgliches Binden von TFIIE an die RNAPII erscheint nach den hier aufgeführten Ergebnissen eher unwahrscheinlich, da TFE nur mit Präinitiationskomplexen wechselwirken kann. Sollte es dennoch zu einer Bindung von TFIIE an Elongationskomplexe der polII kommen, erfolgt diese wahrscheinlich durch andere Bereiche von TFIIE als bei der Initiation.

5. Umstrukturierung der *Pfu* RNAP-Untereinheit H während des Übergangs von Initiation zu Elongation

Die archaeelle RNAP Untereinheit H ist das Homolog der Rpb5-Untereinheit in polII-ähnlichen RNAPs (Langer et al., 1995). Im Vergleich zu dem eukaryotischen Homolog handelt es sich bei dem archaeellen *Pfu* H um ein kompaktes Protein von ca. 9.3 kDa Größe, dessen Struktur viele Merkmale für eine gesteigerte Thermostabilität aufweist (Thiru et al., 1999). Die Sequenzähnlichkeit von H mit Rpb5 beschränkt sich auf dessen C-terminalen Bereich, während Rpb5 eine zusätzliche, ausgeprägte N-terminale Domäne besitzt (Abb. 32 A; Todone et al., 2000). Die hoch konservierte C-terminale Domäne vermittelt die essentiellen Funktionen der RNAP, während der N-terminale Teil regulatorische Funktionen übernimmt, die spezifisch für Eukaryoten sind (Yee et al., 2000). Protein/DNA Cross-Linking Experimente an Initiationskomplexen des polII-Systems haben für Rpb5 DNA-Kontakte kurz stromabwärts des aktiven Zentrums der RNAPII gezeigt (Positionen +4 bis +15; Kim et al., 1997 und 2000). Interessanterweise zeigen ähnliche Versuche an Initiationskomplexen der archaeellen RNAP ein anderes, deutlich in stromabwärts Richtung verschobenes Bindungsmuster von H. In *Pfu* Initiationskomplexen wird H an den Positionen +12 bis +20 mit der *gdh*-Promotor-DNA verknüpft (Bartlett et al., 2004). Die in Abb. 25 dokumentierten Ergebnisse dieser Arbeit wiederum weisen auf eine Umpositionierung der RNAP-Untereinheit H während des Übergangs von Initiation zu Elongation hin. Während das Cross-Linking Muster der RNAP-Untereinheiten B, A' und A'' in an Position +20 pausierten ternären Komplexen und Initiationskomplexen sich im Verhältnis zum jeweiligen aktiven Zentrum nicht bedeutend unterscheiden (Vergleich Abb. 25 mit Bartlett et al., 2004), wird in den pausierten Elongationskomplexen ein Protein mit ca. 9.5 kDa Größe kovalent an die Positionen +21 bis +27 gebunden. Da dieses Protein die gleichen elektrophoretischen Eigenschaften wie H in Initiationskomplexen aufweist (Bartlett et al., 2004) und

Strukturanalysen der RNAPII Interaktionen anderer Untereinheiten mit der DNA in diesem Bereich nahezu ausschließen (Cramer et al., 2000; Gnatt et al., 2001), handelt es sich höchstwahrscheinlich um die RNAP-Untereinheit H. Da der N-terminale Bereich von Rpb5 den Teil des DNA-Kanals in der RNAPII darstellt, der am weitesten stromabwärts liegt (Abb. 32 B; Cramer et al., 2001) und vermutlich für die Rpb5/DNA-Kontakte ~ 15 nt stromabwärts der Transkriptionsblase der polIII (Kim et al., 1997) und polIII (Bartholomew et al., 1993) verantwortlich ist, müssen die H/DNA-Kontakte in archaellen Initiationskomplexen aufgrund des Fehlens der N-terminalen Domäne mit dem homologen C-terminalen Bereich von Rpb5 erfolgen. Zaros et al., 2007 dokumentieren, dass die Interaktion der C-terminalen Region im polIII-System mit der Rpb1-Untereinheit (Cramer et al., 2001) die Bridge-Helix, das Rpb1- $\alpha 44/47$ Helix-Bündel und den Switch 1 loop zu einer DNA bindenden Furche in unmittelbarer Nähe zu der Transkriptionsblase zusammenbringt und –hält. Diese unmittelbare Nähe von H zu der Transkriptionsblase in pausierten Elongationskomplexen ist aus den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen für die *Pfu* RNAP ersichtlich. Warum es aber augenscheinlich zu einer Verlagerung der verhältnismäßig kleinen Untereinheit von dem stromabwärts gelegenen Ende des Initiationskomplexes in die unmittelbare Nähe der Transkriptionsblase in Elongationskomplexen kommt, ist noch nicht zu erklären. Es ist aber unwahrscheinlich, dass H, wie in Bartlett et al., 2004 spekuliert, nur die DNA zum aktiven Zentrum der RNAP leitet. Die ohne die Untereinheit H rekonstituierte RNAP (RNAP Δ H) von *Methanocaldococcus jannaschii* und *P. furiosus* zeigen einen signifikanten Transkriptionsdefekt und weisen eine deutlich verringerte Aktivität in run-off Experimenten auf (Werner und Weinzierl, 2002; Naji et al., 2007). Dieser Effekt kann nicht durch die Verwendung von Matrizen mit vorgeöffneten Transkriptionsblasen aufgehoben werden (Reich, Manuskript in Vorbereitung). Für diese Beobachtung gibt es zwei mögliche Erklärungen: Entweder wird die RNAP Δ H nicht effizient an die Promotorplattform rekrutiert oder die Ausbildung der ersten Phosphodiester-Bindung wird stark erschwert, z.B. durch ein nicht richtig zu dem kodierenden Strang positioniertes aktives Zentrum der RNAP. Eine Zugabe von H zu RNAP Δ H-Transkriptionsreaktionen führt zu einer Aufhebung des Transkriptionsdefekts (Werner und Weinzierl, 2002; Reich, Manuskript in Vorbereitung). Demnach ist die Bindung der Untereinheit H für die essentielle RNA-Synthese der RNAP essentiell, vermutlich durch das Zusammenhalten oder richtige Positionieren der RNAP-Strukturelemente in der Region der Transkriptionsblase.

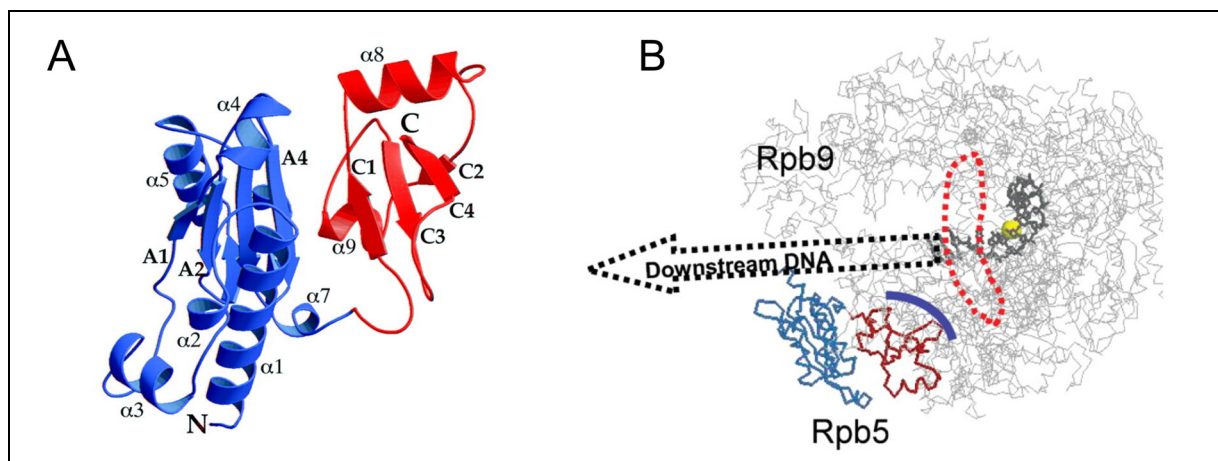


Abb. 32: Struktur von Rpb5, dem eukaryotischen H-Homolog. *A*, Die Struktur von Rpb5 ist in einem Bänder-Modell dargestellt (verändert nach Todone et al., 2000). Die für Eukaryoten spezifische N-terminale Domäne ist blau gekennzeichnet. Die C-terminale Core-Untereinheit von Rpb5, die dem archaellen H entspricht, ist rot markiert. Die Bezeichnung der einzelnen Strukturelemente entspricht Todone et al., 2000. *B*, Räumliche Anordnung der polIII (nach Zaros et al., 2007). Das Rückgrat des polIII-Core-Enzyms ist hellgrau dargestellt. Die farbliche Markierung der Rpb5-Domänen entspricht *A*. Der Pfad der DNA (grau) stromabwärts des aktiven Zentrums (gelb) ist durch einen gestrichelten Pfeil angegeben.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten unterstützen diese These durch den Nachweis von Interaktionen des kodierenden DNA-Strangs mit H im Bereich und kurz stromabwärts der Transkriptionsblase in pausierten Elongationskomplexen (Abb. 25).

Interessanterweise wurden kürzlich Interaktionen von Rpb5 mit der α -Unterheit von TFIIE nachgewiesen (Hayashi et al., 2005). Da noch nicht bekannt ist, welche Rpb5 Domäne mit dem TFE Ortholog interagiert, kann nur darüber spekuliert werden, ob die oben beschriebene stimulierende Wirkung von TFE auf die Transkription vielleicht auch teilweise durch eine Interaktion von TFE mit dem archaeellen Rpb5 Homolog und einer daraus resultierenden Stabilisierung der funktionellen RNAP-Strukturelemente im Bereich der Transkriptionsblase (Zaros et al., 2007) bedingt ist. Es scheint so, als ob TFE den Cross-Link von H an die Position +21 des kodierenden Strangs etwas verstärkt (Abb. 24 B, Tafel +21 k, Vergleich Spuren 4, 5), doch ist aufgrund der diffusen Banden eine genaue Quantifizierung nicht möglich. Ob das leicht verstärkte Cross-Linking Signal von H Folge einer direkten TFE/H Interaktion ist oder aufgrund der TFE-induzierten Konformationsänderung der RNAP auftritt, kann anhand dieser Daten nicht zweifelsfrei bestimmt werden.

6. Die Rolle des B-Fingers in der TFIIB-Familie

Das Genom von *P. furiosus* kodiert zwei Proteine der TFIIB-Familie, TFB1 und TFB2. Ein von der Arbeitsgruppe von Mike Bartlett (PSU, Portland, Oregon, USA) durchgeführter Vergleich der Aminosäure-Sequenzen verschiedener archaeeller TFB-Sequenzen dokumentiert, dass *Pfu* TFB1 eine hohe Ähnlichkeit zu dem Großteil der TFB-Derivate anderer Archaea und dem entsprechenden homologen Bereich in eukaryotischen TFIIBs aufweist, während sich die Sequenz von TFB2 besonders in dem N-terminalen Drittel des Proteins deutlich unterscheidet (Micorescu et al., 2007). Die N-terminale Region von TFB ist durch das Vorhandensein eines Zink-Finger Motivs und eines B-Finger Motivs charakterisiert (Abb. 33; Zhu et al., 1996). Beide Strukturen sind in den Mitgliedern der TFIIB-Familie hoch konserviert. Fast alle TFB-Varianten in den bisher sequenzierten archaeellen Genomen besitzen die B-Finger Struktur, wobei neben dem *Pfu* TFB2 auch beide TFBs von *Aeropyrum pernix* kein B-Finger Motiv besitzen. Das hoch konservierte Vorkommen von TFB Orthologen mit B-Finger Motiv weist auf eine bedeutende Rolle des Motivs bei der Transkription hin. Warum die Struktur allerdings manchen Vertretern der TFIIB-Familie fehlt und was das für eine physiologische Bedeutung für das TFB-Derivat hat, ist noch vollkommen unklar. Ein Analogon des *Pfu* TFB2 ist der polIII-Transkriptionsfaktor Brf, der größtenteils homolog zu dem N-terminalen Bereich von TFIIB ist, so z.B. das Zink-Finger Motiv besitzt aber keine konservierte B-Finger Sequenz aufweist (Huang et al., 2003).

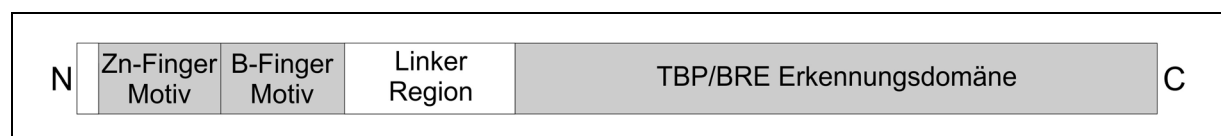


Abb. 33: Schematische Darstellung der charakteristischen Bereiche der Mitglieder der TFIIB-Familie (verändert nach Micorescu et al., 2007). Der N-terminale Bereich ist durch das konservierte Zink-Finger und B-Finger Motiv sowie eine Linker-Region gekennzeichnet, die den N-Terminus mit der ebenfalls konservierten C-terminalen Domäne von TFIIB verbindet, welche die Bindung von TFIIB an Promotor-gebundenes TBP und die Bestimmung der Transkriptionsrichtung durch Interaktion mit der BRE-Sequenz stromaufwärts der TATA-Box bestimmt.

Santangelo et al., 2007 zeigen, dass eine Deletions-Mutation in der tip-Region des B-Fingers die Transkriptionsaktivität nicht beeinflusst. In Kooperation mit Andreas Franke und Michael Thomm (Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg) konnte die Bartlett-Gruppe hingegen beweisen, dass die Transkriptionsaktivität durch Verwendung des *Pfu* TFB2, dem

von Natur aus das B-Finger Motiv fehlt, zwar nicht aufgehoben, jedoch stark reduziert wird (Micorescu et al., 2007). TFB-Mutanten, bei denen die B-Finger Region deletiert wurde, zeigen keine Aktivität (Werner und Weinzierl, 2005). Obwohl Mike Bartletts Arbeitsgruppe dokumentieren konnte, dass die Effizienz in der TFB2 induzierten Ausbildung von Präinitiationskomplexen und deren Struktur vergleichbar mit der Rekrutierung der RNAP durch TFB1 ist (Micorescu et al., 2007), wurde im Rahmen dieser Arbeit anhand von KMnO₄-Footprinting Studien für TFB2-induzierte binäre Komplexe ein dramatischer Defekt bei der Ausbildung, bzw. der Stabilisierung des offenen Komplexes nachgewiesen (Abb. 26, Vergleich Spuren 2, 3). Dieses Ergebnis zeigt, dass die niedrigere Aktivität von TFB2 gebildeten Transkriptionskomplexen höchstwahrscheinlich auf eine bedeutende Rolle des B-Fingers oder anderer N-terminaler Strukturen von TFB1 nach der Ausbildung des Präinitiationskomplexes zurück zu führen ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erbringen Evidenz dafür, dass der TFB2 abhängige Transkriptionsdefekt durch die Verwendung einer teilweise vorgeöffneten Transkriptionsblase fast vollständig aufgehoben werden kann, so dass die Aktivität fast das Level der TFB1-induzierten Aktivität erreicht (Abb. 27, Spuren 2, 3), während TFB2 an der entsprechenden geschlossenen Matrize nur eine minimale Aktivität aufweist (Abb. 27, Vergleich Spuren 5, 7). Dieser Befund ist ein eindeutiges Indiz dafür, dass der N-terminale Bereich von TFB2 entweder die Ausbildung oder die Stabilisierung des offenen Komplexes der RNAP deutlich weniger effizient unterstützt als der entsprechende Bereich in TFB1. Domänen-Austausch-Experimente, die von der Bartlett-Gruppe in Portland durchgeführt wurden, haben gezeigt, dass der TFB1 B-Finger an der entsprechenden Position in TFB2 alleine nicht in der Lage ist, den Transkriptionsdefekt aufzuheben, sondern der gesamte N-terminale Bereich mit den TFB1 Zn-Finger und B-Finger Motiven essentiell für die Transkriptionsaktivierung ist (Micorescu et al., 2007). Obwohl sich die Sequenzen des N-Terminus von TFB1 und TFB2 deutlich unterscheiden, sind beide Proteine in der Lage, die RNAP mit diesem für diesen Schritt essentiellen Bereich (Bell und Jackson, 2000; Werner und Weinzierl, 2005) in gleichem Ausmaß zu rekrutieren. Wahrscheinlich sind spezifische Interaktionen der einzelnen Struktur-Elemente in der N-terminalen Region entscheidend für die richtige Positionierung der jeweiligen Motive in funktionellen Schritten nach der Ausbildung des binären Komplexes.

Wie von Werner und Weinzierl, 2005 berichtet, ist der B-Finger in Archaea entscheidend für die Ausbildung von kurzen, abortiven RNA-Produkten. Die Ergebnisse in Abb. 27, Spuren 2 und 3 bestätigen diese Beobachtung. Denn trotz der ungefähr gleichen Aktivität von TFB1 und TFB2 an der DNA-Matrize mit vorgeöffneter Transkriptionsblase bei der TFB-abhängigen Synthese von 11-13 nt langen Transkripten, werden in der Reaktion mit TFB2 signifikant weniger kurze, abortive Transkripte mit Längen zwischen 5 – 9 nt gebildet. Ein fast identischer Effekt wird auch von Santangelo et al., 2007 für B-Finger Mutanten der beiden TFBs aus *Thermococcus kodakaraensis* beschrieben, die von Natur aus beide das B-Finger Motiv enthalten. Nach Mutationen des Motivs treten weniger abortive Transkripte auf als in Reaktionen, die durch die beiden *T. kodakaraensis* Wildtyp-TFBs induziert werden. Wie bereits oben für TFE angegeben, steigert eine zusätzliche Stabilisierung von Initiationskomplexen die abortive Transkriptionsrate. Wenn der B-Finger, bzw. die Wechselwirkungen der N-terminalen TFB-Strukturen mit der RNAP und der Matrizen-DNA wie oben dokumentiert die Ausbildung des offenen Komplexes fördern und stabilisieren, könnte das ebenfalls eine Steigerung der abortiven Transkriptionsrate zur Folge haben. An vorgeöffneten Matrizen ist eine Stabilisierung der Transkriptionsblase und damit des Initiationskomplexes für eine effiziente Transkription nicht erforderlich. Da die RNAP aber nicht durch den N-Terminus von TFB an der Promotor-DNA gehalten wird, erfolgt das Lösen der RNAP von der Promotorplattform mit TFB2 einfacher, wodurch die Zeit für abortive RNA-Synthese minimiert wird.

7. Wechselwirkungen von TFB mit TFE

Die in Abb. 27 (Spuren 7, 8) dokumentierten Daten zeigen, dass TFE den TFB2-induzierten Transkriptionsdefekt an Duplex-DNA-Matrizen größtenteils aufheben kann. Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen von Werner und Weinzierl, 2005 überein, dass TFE durch Mutationen oder Deletionen des Zink-Finger und/oder B-Finger Bereichs in der N-terminalen Domäne von TFB bedingte Transkriptionsdefekte zum Teil kompensieren kann. Da diese Aktivitätssteigerung durch TFE am deutlichsten in Reaktionen mit TFB-Mutanten ohne B-Finger auftreten, lässt das vermuten, dass die Funktionen des B-Fingers von TFB und die TFE-Effekte bei der Initiation entweder deckungsgleich sind oder aber unterschiedliche Wirkungen auf die RNAP haben, die in dem gleichen Effekt resultieren.

Die in dieser Arbeit neu gewonnenen Erkenntnisse dokumentieren, dass TFE die Ausbildung der Transkriptionsblase aktiv unterstützt (Naji et al., 2007 *J Biol Chem*). Photochemische Cross-Linking Studien, die von der Arbeitsgruppe von Mike Bartlett (PSU, Portland, Oregon, USA) durchgeführt wurden, konnten Interaktionen von TFE mit dem nicht kodierenden Strang im Bereich der Blase nachweisen (Grünberg et al., 2007). Wahrscheinlich führen auch direkte Wechselwirkungen von TFE mit der Klammer der RNAP zu einer weiteren Stabilisierung des offenen Komplexes. Ein Zusammenspiel dieser TFE-induzierten Effekte hat die Aktivierung der Transkription zur Folge.

Während die Interaktion des Zink-Finger Motivs mit der Docking-Region der RNAP bei der Rekrutierung bereits eingehend untersucht wurde (Bushnell et al., 2004; Chen und Hahn, 2003), ist für den B-Finger nur bekannt, dass er in dem TBP/TFB/RNAP-Komplex in unmittelbarer Nähe zu dem aktiven Zentrum und damit dem Transkriptionsstartpunkt lokalisiert ist und bei manchen Promotoren sequenzabhängig den Startpunkt der Transkription bestimmt (zusammengefasst von Bartlett, 2005; Chen und Hahn, 2004). Da die Transkription mit *Pfu* TFB2 an Heteroduplex-DNA fast genauso effektiv ist wie mit TFB1 (Abb. 27 B), und unter anderem Mike Bartletts Gruppe beobachtet hat, dass die Ausbildung der binären Komplexe an Duplex-DNA vergleichbar ist (Micorescu et al., 2007; Werner und Weinzierl, 2005), ist eine essentielle Rolle der B-Finger Struktur für die korrekte Positionierung des kodierenden DNA-Strangs, der RNAP-Strukturelemente, bzw. der Ausbildung der ersten Phosphordiesterbindung eher unwahrscheinlich. Eine Möglichkeit, den TFB2-Defekt zu erklären wäre die Unfähigkeit von TFB2-induzierten Initiationskomplexen, überhaupt einen offenen Komplex zu bilden. Die Ergebnisse in dieser Arbeit (Abb. 27 B) und der Bartlett-Gruppe zeigen aber, dass TFB2 an allen getesteten Promotoren in der Lage ist, run-off RNA-Produkte zu synthetisieren, wenn auch mit deutlich geringerer Effizienz als mit TFB1 gebildete Transkriptionskomplexe. Vermutlich ist eher die Stabilisierung des offenen Komplexes direkt nach dessen Ausbildung der kritische Punkt bei der TFB2-induzierten Transkription. Es lässt sich spekulieren, dass es wohl zu der Öffnung der DNA kommt, die kurzzeitig ausreichend für die Initiation der Transkription ist, dann aber wieder zusammenfällt und somit auch in KMnO₄-Footprinting Experimenten (Abb. 26, Spur 3) kaum zu detektieren ist. Genau diesen Defekt könnte TFE durch die in dieser Arbeit beschriebenen Eigenschaften kompensieren: Direkt nach Ausbildung des ersten offenen Komplexes interagiert TFE mit dem nicht kodierenden Strang im Bereich der Transkriptionsblase, dehnt die Blase aktiv in stromaufwärts Richtung aus, fördert unter Umständen noch das Schließen der RNAP-Klammer und verhindert so ein Zusammenfallen der Transkriptionsblase, die nicht durch den TFB B-Finger stabilisiert wird (Abb. 26, Spuren 4, 5 und Abb. 27, Spur 8). Für Heteroduplex-DNA-Matrizen ist diese Stabilisierung nicht nötig, da die DNA nicht re-hybridisieren kann, was TFB2 in die Lage versetzt, an diesen Matrizen eine effiziente Transkription zu aktivieren (Abb. 27, Spur 3).

8. Die Rolle von mehreren TFB-Versionen in Archaea

Einige Archaea besitzen mehrere Homologe von TFB und TBP. *Halobacterium* z.B. trägt sechs Gene für TBP und sieben Gene für TFB (Baliga et al., 2000), die in unterschiedlichen Kombinationen die Transkription an verschiedenen Promotoren-Klassen induzieren und somit die Gen-Expression den Umwelteinflüssen anpassen können (Facciotti et al., 2007). Wie *P. furiosus* kodiert auch das Genom von *Thermococcus kodakaraensis* für zwei TFBs, die jedoch im Gegensatz zu den beiden *Pfu* TFBs keinerlei funktionelle Unterschiede aufweisen. Jeweils einer der beiden Faktoren kann ohne Effekt auf das Zellwachstum deletiert werden. Anhand von *in vitro* Transkriptionsversuchen konnte nachgewiesen werden, dass beide TFBs die Transkription aktivieren können, ohne jedoch eine spezifische Promotor-Selektivität erkennen zu lassen (Santangelo et al., 2007).

Wie in *T. kodakaraensis* ist die physiologische Rolle der beiden TFBs in *P. furiosus* noch unklar. Die deutlichen Unterschiede letzterer in Transkriptionsreaktionen deuten aber im Gegensatz zu TFB1 und 2 aus *Thermococcus kodakaraensis* auf eine Spezialisierung des *Pfu* TFB2 hin, die höchstwahrscheinlich von physiologischer Bedeutung ist.

Kürzlich wurde veröffentlicht, dass das *Pfu* TFB2-Gen unter Hitzeschock-Bedingungen verstärkt transkribiert wird, während das Expression-Level von TFB1 nicht verändert wird (Shokley et al., 2003). In der Arbeitsgruppe von Michael Thomm (Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg) hat Andreas Franke die TFB2-induzierte Transkription an verschiedenen Hitzeschock-Promotoren unter *in vitro* Bedingungen getestet und keine spezifische Aktivierung von Hitzeschockpromotoren durch TFB2 beobachtet (Micorescu et al., 2007). Aufgrund der gleichen Stabilität von TFB1 und TFB2 bei hohen Temperaturen (Bartlett und Micorescu in Micorescu et al., 2007) ist nicht davon auszugehen, dass die gesteigerte Expression von TFB2 bei der Hitzeschockantwort der Zelle in direktem Zusammenhang mit der Thermostabilität des Transkriptionsfaktors steht.

Es ist Wahrscheinlich, dass die Funktion von TFB2 direkt mit dem hier als Transkriptionsdefekt bezeichneten Effekt von TFB2 auf die Ausildung des offenen Komplexes verknüpft ist. Unter Umständen wird ein unbekannter, TFB2-abhängiger Transkriptionsmechanismus durch ein partielles Aufschmelzen bestimmter Promotoren unter Hitzeschockbedingungen begünstigt und die Expression der entsprechenden Gene stimuliert. Außerdem könnten *in vivo* Interaktionen von TFB2 mit noch unbekannten Faktoren, die durch die Hitzeschock-Bedingungen begünstigt werden, eine wichtige Rolle spielen. Es ist vorstellbar, dass bis jetzt unentdeckte, spezifische Interaktionen des N-terminalen Bereichs von TFB2 mit Hitzeschock-induzierten, stabilisierenden Faktoren die Stabilität von TFB2 signifikant erhöhen und so eine spezifische physiologische Rolle von TFB2 bei der Hitzeschockantwort bei *P. furiosus* erklären.

VI Zusammenfassung

Die große Ähnlichkeit der Komponenten des archaeellen Transkriptionssystems mit dem eukaryotischen polIII System ist bereits seit längerem bekannt. Dank der geringeren Komplexität der archaeellen Transkriptionsmaschinerie und der Möglichkeit, die *Pyrococcus furiosus* (Pfu) RNA Polymerase aus 11 rekombinanten Untereinheiten zu rekonstituieren, war es möglich, im Rahmen dieser Arbeit tiefere Einblicke in die Initiation der Transkription zu gewinnen.

So wurde im einzelnen dokumentiert, dass die Untereinheit E' für die Transkription bei niedrigen Temperaturen benötigt wird, während sie unter optimierten *in vitro* Inkubationsbedingungen nicht essentiell ist. Die E'-induzierte Stimulation der Transkription erfolgt unabhängig von der Anwesenheit der Untereinheit F, das keine stimulierende Wirkung auf die Transkription hat. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der aktivierende Effekt von E' auf eine Rolle der Untereinheit bei der Ausbildung des offenen Komplexes im Bereich des Transkriptionsstartpunkts und stromabwärts davon zurückzuführen ist.

Der Transkriptionsfaktor E (TFE) wird für die basale archaeelle Transkription *in vitro* nicht unbedingt benötigt. Dennoch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass TFE eine duale Rolle bei der Initiationsreaktion spielt. Zum einen wurde eine stimulierende Wirkung von TFE auf die Transkription nachgewiesen, die E'-abhängig ist und in Kombination mit E'/F zu einer 25-fachen Aktivierung des Core-Enzyms der RNAP führte sowie dass dieser Effekt höchst-wahrscheinlich auf der Stabilisierung und dem aktiven Öffnen der stromaufwärts-Grenze der Transkriptionsblase beruht. Die hier präsentierten Ergebnisse, dass TFE an einzelsträngige DNA binden kann und eine hohe Affinität zu vorgeöffneten DNA-Bereichen aufweist, sowie Studien der Arbeitsgruppe von Mike Bartlett (PSU, Portland, Oregon, USA) dokumentieren eindeutig, dass TFE die Transkriptionsblase durch direkte Bindung an den nicht kodierenden Strang im Bereich der Blase stabilisiert.

Des Weiteren konnte eine E' unabhängige Wirkung von TFE auf die Stabilität von offenen Komplexen beobachtet werden. Diese Ergebnisse legen den Schluß nahe, dass TFE zusätzlich als Brücken-bildenden Faktor zwischen TBP und der RNAP fungiert. Wahrscheinlich führt die Kombination beider Rollen von TFE zu der TFE-induzierten Stimulation der Synthese von abortiven 5 nt RNA-Produkten. Zusammengefasst schlagen die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse ein Modell für die Initiation der Transkription vor, bei dem das E'/F-Heterodimer und TFE bedeutende Funktionen bei der Ausbildung des vollständigen offenen Komplexes innehaben.

In dieser Arbeit konnte zudem erstmals dokumentiert werden, dass TFE nicht nur wie TFIIIE ausschließlich als Initiationsfaktor wichtige stabilisierende Funktionen übernimmt, sondern auch in Elongationskomplexen vorliegt und dort eine wichtige Funktion innehat. Die Analyse von Komplexen, die an Position +20 pausiert wurden ergab eine TFE-abhängige, gesteigerte Wiederaufnahme-Effizienz der pausierten RNAP sowie eine gesteigerte KMnO₄-Sensitivität der T-Positionen in der entsprechenden Transkriptionsblase. Der direkte Nachweis von TFE

in den pausierten ternären Komplexen erfolgte durch spezifische Cross-Links von TFE an die Positionen +9, +11 und +16 des nicht kodierenden Strangs, die auch Evidenz dafür erbrachten, dass TFE die Konformation von Elongationskomplexen beeinflusst. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass TFE nur an Präinitiationskomplexe binden kann und nicht später mit bereits elongierenden Komplexen in Wechselwirkung treten kann.

An pausierten frühen Elongationskomplexen konnte außerdem beobachtet werden, dass es während des Übergangs von Initiation zu Elongation zu einer Konformationsänderung der RNAP kommt. Während die RNAP-Untereinheit H in Initiationskomplexen die stromabwärts-Grenze des Komplexes darstellt, interagiert H in Elongationskomplexen mit der DNA direkt stromabwärts des aktiven Zentrums. Diese Position entspricht der Position des eukaryotischen Homologs von H, der C-terminalen Domäne von Rpb5 in polII-Komplexen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte außerdem die Funktion des konservierten B-Finger Motivs im N-terminalen Bereich von TFB analysiert werden, das dem *Pfu* TFB2 fehlt. Mit TFB2 gebildete Initiationskomplexe weisen einen Defekt bei der Stabilisierung von offenen Komplexen auf, der durch die Verwendung von Heteroduplex-DNA-Matrizen umgangen werden kann. Die geringe Aktivität von TFB2-induzierten Transkriptionskomplexen an Duplex-DNA-Matrizen konnte durch Zugabe von TFE größtenteils kompensiert werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das B-Finger Motiv der N-terminalen Domäne von TFB einen bedeutenden Effekt auf die Stabilität des frühen offenen Komplexes hat und dass die stabilisierende Funktion von TFE einen Defekt in der B-Finger-induzierten Stabilisierung der Transkriptionsblase kompensieren kann.

VII Summary

The homology between components of the archaeal transcription machinery and the eukaryotic polII system is well-documented. The archaeal transcription system is said to be a simplified version of the eukaryotic one and the ability to use a reconstituted 11 subunit *Pyrococcus furiosus* (Pfu) RNA polymerase (RNAP), assembled from fully recombinant subunits, has shed new light on the process of initiation and early elongation in archaeal/eukaryotic-type transcription systems.

The present work documents that RNAP subunit E' is essential for transcription at low temperatures, while it is dispensable under optimized *in vitro* conditions. The stimulatory effect of E' on transcription activity is independent of the presence of subunit F, which alone has no effect on transcription. At low temperatures, E' is essential for the formation of the open complex, in particular the extension of the transcription bubble in the region of the transcription start site and downstream of it.

Although the archaeal transcription factor E (TFE) is not necessary for *in vitro* transcription, the present work suggests a dual role of TFE during initiation.

First, TFE has a broad stimulating effect on the E'-dependent activation of the core enzyme's activity. In the presence of E'/F, TFE increased the activity of the core enzyme by a factor of 25 and this effect is due to a stabilizing effect of TFE on the transcription bubble as well as an active role for TFE in opening the promoter DNA at the upstream end of the bubble. Results presented in this work show that TFE is able to bind to single stranded DNA and displays high affinity to partly preopened DNA-regions. Together with results of Mike Bartlett's group (PSU, Portland, Oregon, USA), this suggests that stabilizing of the transcription bubble by TFE is based on direct protein/DNA contacts of TFE with the surface-exposed non-coding strand in the region of the bubble.

Second, an E'-independent effect of TFE on the stability of binary complexes formed by the core enzyme was observed in heparin competition assays, suggesting TFE to be a bridging-factor between the promoter-bound TBP and the RNAP. Most likely, both effects in concert are responsible for a TFE-induced significant accumulation of short abortive transcripts with a length of 5 nt. Taken together, the results presented in this work suggest a detailed model for transcription initiation and dissect important roles of the E'/F-heterodimer and TFE during formation of the open complex.

This work gives evidence that unlike its eukaryotic homolog TFIIE, TFE is not only an initiation factor contributing important effects on the stability of initiation complexes but also is a part of elongation complexes and confers an important functional effect on the ternary complexes. Analysis of the resumption of transcription of paused elongation complexes revealed a significant TFE-induced stimulatory effect on the resumption efficiency of the complexes. KMnO₄-footprinting assays were used to document that the increase of resumption efficiency is caused by a stabilization of the transcription bubble by TFE. The evidence of TFE being part of elongation complexes comes from site-specific cross-links at the positions +9, +11, and +16 at the non coding strand. Additionally, TFE affects the

conformation of the ternary elongation complex. This work documents that the recruitment of TFE to the initiation complex is a prerequisite for the effect of TFE in elongating complexes.

The analysis of elongation complexes paused in the early phase of elongation also revealed a partial reorganization of the RNAP during transition from initiation to elongation. The RNAP subunit H, which is located at the downstream border in *P. furiosus* initiation complexes, is repositioned and located immediately downstream of the active centre of paused elongation complexes. This positioning resembles the location of the eukaryotic homolog of H, the C-terminal part of Rpb5 in polII complexes.

The present work also uncovers the function of the highly conserved N-terminal B-finger motif in TFB, which is naturally lacking in *Pfu* TFB2. Initiation complexes assembled with TFB2 show a TFB2-specific defect in stabilization of the open region and this effect can be bypassed with a pre-formed transcription bubble. The low activity of TFB2-induced complexes in bubble stabilization and transcription can be partly relieved by TFE. The results presented here indicate that the TFB B-finger motif is important for stabilization of early initiation complexes, and that stabilizing effect of TFE can compensate for defects caused by the lack of the B-finger.

VIII Literaturverzeichnis

Armache, K. J., H. Kettenberger, and P. Cramer. 2003. Architecture of initiation-competent 12-subunit RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:6964-8.

Armache, K. J., H. Kettenberger, and P. Cramer. 2005. The dynamic machinery of mRNA elongation. *Curr Opin Struct Biol* **15**:197-203.

Baliga, N. S., Y. A. Goo, W. V. Ng, L. Hood, C. J. Daniels, and S. DasSarma. 2000. Is gene expression in *Halobacterium* NRC-1 regulated by multiple TBP and TFB transcription factors? *Mol Microbiol* **36**:1184-5.

Bartholomew, B., D. Durkovich, G. A. Kassavetis, and E. P. Geiduschek. 1993. Orientation and topography of RNA polymerase III in transcription complexes. *Mol Cell Biol* **13**:942-52.

Bartlett, M. S. 2005. Determinants of transcription initiation by archaeal RNA polymerase. *Curr Opin Microbiol* **8**:677-84.

Bartlett, M. S., M. Thomm, and E. P. Geiduschek. 2000. The orientation of DNA in an archaeal transcription initiation complex. *Nat Struct Biol* **7**:782-5.

Bartlett, M. S., M. Thomm, and E. P. Geiduschek. 2004. Topography of the euryarchaeal transcription initiation complex. *J Biol Chem* **279**:5894-903.

Bell, S. D., and S. P. Jackson. 1998. Transcription and translation in Archaea: a mosaic of eukaryal and bacterial features. *Trends Microbiol* **6**:222-8.

Bell, S. D., and S. P. Jackson. 2000. The role of transcription factor B in transcription initiation and promoter clearance in the archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *J Biol Chem* **275**:12934-40.

Bell, S. D., P. L. Kosa, P. B. Sigler, and S. P. Jackson. 1999. Orientation of the transcription preinitiation complex in archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:13662-7.

Bell, S. D., C. P. Magill, and S. P. Jackson. 2001. Basal and regulated transcription in Archaea. *Biochem Soc Trans* **29**:392-5.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-54.

Buhler, J. M., F. Iborra, A. Sentenac, and P. Fromageot. 1976. Structural studies on yeast RNA polymerases. Existence of common subunits in RNA polymerases A(I) and B(II). *J Biol Chem* **251**:1712-7.

Bushnell, D. A., and R. D. Kornberg. 2003. Complete, 12-subunit RNA polymerase II at 4.1-Å resolution: implications for the initiation of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:6969-73.

Bushnell, D. A., K. D. Westover, R. E. Davis, and R. D. Kornberg. 2004. Structural basis of transcription: an RNA polymerase II-TFIIB cocrystal at 4.5 Å. *Science* **303**:983-8.

- Bycroft, M., T. J. Hubbard, M. Proctor, S. M. Freund, and A. G. Murzin. 1997. The solution structure of the S1 RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold. *Cell* **88**:235-42.
- Chen, B. S., and M. Hampsey. 2004. Functional interaction between TFIIB and the Rpb2 subunit of RNA polymerase II: implications for the mechanism of transcription initiation. *Mol Cell Biol* **24**:3983-91.
- Chen, H. T., and S. Hahn. 2003. Binding of TFIIB to RNA polymerase II: Mapping the binding site for the TFIIB zinc ribbon domain within the preinitiation complex. *Mol Cell* **12**:437-47.
- Chen, H. T., and S. Hahn. 2004. Mapping the location of TFIIB within the RNA polymerase II transcription preinitiation complex: a model for the structure of the PIC. *Cell* **119**:169-80.
- Chen, H. T., L. Warfield, and S. Hahn. 2007. The positions of TFIIF and TFIIE in the RNA polymerase II transcription preinitiation complex. *Nat Struct Mol Biol* **14**:696-703.
- Choder, M. 2004. Rpb4 and Rpb7: subunits of RNA polymerase II and beyond. *Trends Biochem Sci* **29**:674-81.
- Cramer, P., D. A. Bushnell, J. Fu, A. L. Gnatt, B. Maier-Davis, N. E. Thompson, R. R. Burgess, A. M. Edwards, P. R. David, and R. D. Kornberg. 2000. Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science* **288**:640-9.
- Cramer, P., D. A. Bushnell, and R. D. Kornberg. 2001. Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science* **292**:1863-76.
- deHaseth, P. L., and J. D. Helmann. 1995. Open complex formation by Escherichia coli RNA polymerase: the mechanism of polymerase-induced strand separation of double helical DNA. *Mol Microbiol* **16**:817-24.
- Douziech, M., F. Coin, J. M. Chipoulet, Y. Arai, Y. Ohkuma, J. M. Egly, and B. Coulombe. 2000. Mechanism of promoter melting by the xeroderma pigmentosum complementation group B helicase of transcription factor IIH revealed by protein-DNA photo-cross-linking. *Mol Cell Biol* **20**:8168-77.
- Drapkin, R., and D. Reinberg. 1994. The multifunctional TFIIH complex and transcriptional control. *Trends Biochem Sci* **19**:504-8.
- Dvir, A. 2002. Promoter escape by RNA polymerase II. *Biochim Biophys Acta* **1577**:208-223.
- Edwards, A. M., C. M. Kane, R. A. Young, and R. D. Kornberg. 1991. Two dissociable subunits of yeast RNA polymerase II stimulate the initiation of transcription at a promoter in vitro. *J Biol Chem* **266**:71-5.
- Eloranta, J. J., A. Kato, M. S. Teng, and R. O. Weinzierl. 1998. In vitro assembly of an archaeal D-L-N RNA polymerase subunit complex reveals a eukaryote-like structural arrangement. *Nucleic Acids Res* **26**:5562-7.

- Facciotti, M. T., D. J. Reiss, M. Pan, A. Kaur, M. Vuthoori, R. Bonneau, P. Shannon, A. Srivastava, S. M. Donohoe, L. E. Hood, and N. S. Baliga. 2007. General transcription factor specified global gene regulation in archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:4630-5.
- Farago, M., T. Nahari, C. Hammel, C. N. Cole, and M. Choder. 2003. Rpb4p, a subunit of RNA polymerase II, mediates mRNA export during stress. *Mol Biol Cell* **14**:2744-55.
- Fiedler, U., and H. T. Timmers. 2001. Analysis of the open region of RNA polymerase II transcription complexes in the early phase of elongation. *Nucleic Acids Res* **29**:2706-14.
- Flores, O., H. Lu, and D. Reinberg. 1992. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Identification and characterization of factor IIIH. *J Biol Chem* **267**:2786-93.
- Forget, D., M. F. Langelier, C. Therien, V. Trinh, and B. Coulombe. 2004. Photo-cross-linking of a purified preinitiation complex reveals central roles for the RNA polymerase II mobile clamp and TFIIE in initiation mechanisms. *Mol Cell Biol* **24**:1122-31.
- Forget, D., F. Robert, G. Grondin, Z. F. Burton, J. Greenblatt, and B. Coulombe. 1997. RAP74 induces promoter contacts by RNA polymerase II upstream and downstream of a DNA bend centered on the TATA box. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:7150-5.
- Gajiwala, K. S., and S. K. Burley. 2000. Winged helix proteins. *Curr Opin Struct Biol* **10**:110-6.
- Geiduschek, E. P., and M. Ouhammouch. 2005. Archaeal transcription and its regulators. *Mol Microbiol* **56**:1397-407.
- Gnatt, A. L., P. Cramer, J. Fu, D. A. Bushnell, and R. D. Kornberg. 2001. Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science* **292**:1876-82.
- Goede, B., S. Naji, O. von Kampen, K. Ilg, and M. Thomm. 2006. Protein-protein interactions in the archaeal transcriptional machinery: binding studies of isolated RNA polymerase subunits and transcription factors. *J Biol Chem* **281**:30581-92.
- Goodchild, A., N. F. Saunders, H. Ertan, M. Raftery, M. Guilhaus, P. M. Curmi, and R. Cavicchioli. 2004. A proteomic determination of cold adaptation in the Antarctic archaeon, *Methanococcoides burtonii*. *Mol Microbiol* **53**:309-21.
- Goodrich, J. A., and R. Tjian. 1994. Transcription factors IIE and IIH and ATP hydrolysis direct promoter clearance by RNA polymerase II. *Cell* **77**:145-56.
- Grünberg, S., M. S. Bartlett, S. Naji, and M. Thomm. 2007. Transcription factor E is a part of transcription elongation complexes. *J Biol Chem.* in press.
- Hanzelka, B. L., T. J. Darcy, and J. N. Reeve. 2001. TFE, an archaeal transcription factor in *Methanobacterium thermoautotrophicum* related to eucaryal transcription factor TFIIEalpha. *J Bacteriol* **183**:1813-8.

- Hausner, W., and M. Thomm. 2001. Events during initiation of archaeal transcription: open complex formation and DNA-protein interactions. *J Bacteriol* **183**:3025-31.
- Hausner, W., J. Wettach, C. Hethke, and M. Thomm. 1996. Two transcription factors related with the eucaryal transcription factors TATA-binding protein and transcription factor IIB direct promoter recognition by an archaeal RNA polymerase. *J Biol Chem* **271**:30144-8.
- Hayashi, K., T. Watanabe, A. Tanaka, T. Furumoto, C. Sato-Tsuchiya, M. Kimura, M. Yokoi, A. Ishihama, F. Hanaoka, and Y. Ohkuma. 2005. Studies of *Schizosaccharomyces pombe* TFIIE indicate conformational and functional changes in RNA polymerase II at transcription initiation. *Genes Cells* **10**:207-24.
- Hethke, C., A. C. Geerling, W. Hausner, W. M. de Vos, and M. Thomm. 1996. A cell-free transcription system for the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Nucleic Acids Res* **24**:2369-76.
- Hieb, A. R., S. Baran, J. A. Goodrich, and J. F. Kugel. 2006. An 8 nt RNA triggers a rate-limiting shift of RNA polymerase II complexes into elongation. *Embo J* **25**:3100-9.
- Holstege, F. C., U. Fiedler, and H. T. Timmers. 1997. Three transitions in the RNA polymerase II transcription complex during initiation. *Embo J* **16**:7468-80.
- Holstege, F. C., D. Tantin, M. Carey, P. C. van der Vliet, and H. T. Timmers. 1995. The requirement for the basal transcription factor IIE is determined by the helical stability of promoter DNA. *Embo J* **14**:810-9.
- Holstege, F. C., and H. T. Timmers. 1997. Analysis of open complex formation during RNA polymerase II transcription initiation using heteroduplex templates and potassium permanganate probing. *Methods* **12**:203-11.
- Holstege, F. C., P. C. van der Vliet, and H. T. Timmers. 1996. Opening of an RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factors IIE and IIH. *Embo J* **15**:1666-77.
- Hsu, L. M. 2002. Promoter clearance and escape in prokaryotes. *Biochim Biophys Acta* **1577**:191-207.
- Huang, Y., E. McGillicuddy, M. Weindel, S. Dong, and R. J. Maraia. 2003. The fission yeast TFIIB-related factor limits RNA polymerase III to a TATA-dependent pathway of TBP recruitment. *Nucleic Acids Res* **31**:2108-16.
- Jasiak, A. J., K. J. Armache, B. Martens, R. P. Jansen, and P. Cramer. 2006. Structural biology of RNA polymerase III: subcomplex C17/25 X-ray structure and 11 subunit enzyme model. *Mol Cell* **23**:71-81.
- Jiang, Y., S. J. Triezenberg, and J. D. Gralla. 1994. Defective transcriptional activation by diverse VP16 mutants associated with a common inability to form open promoter complexes. *J Biol Chem* **269**:5505-8.
- Kahl, B. F., H. Li, and M. R. Paule. 2000. DNA melting and promoter clearance by eukaryotic RNA polymerase I. *J Mol Biol* **299**:75-89.

- Kaine, B. P., I. J. Mehr, and C. R. Woese. 1994. The sequence, and its evolutionary implications, of a *Thermococcus celer* protein associated with transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:3854-6.
- Kettenberger, H., K. J. Armache, and P. Cramer. 2004. Complete RNA polymerase II elongation complex structure and its interactions with NTP and TFIIS. *Mol Cell* **16**:955-65.
- Kim, T. K., R. H. Ebright, and D. Reinberg. 2000. Mechanism of ATP-dependent promoter melting by transcription factor IIH. *Science* **288**:1418-22.
- Kim, T. K., T. Lagrange, Y. H. Wang, J. D. Griffith, D. Reinberg, and R. H. Ebright. 1997. Trajectory of DNA in the RNA polymerase II transcription preinitiation complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:12268-73.
- Korzheva, N., A. Mustaev, M. Kozlov, A. Malhotra, V. Nikiforov, A. Goldfarb, and S. A. Darst. 2000. A structural model of transcription elongation. *Science* **289**:619-25.
- Kosa, P. F., G. Ghosh, B. S. DeDecker, and P. B. Sigler. 1997. The 2.1-Å crystal structure of an archaeal preinitiation complex: TATA-box-binding protein/transcription factor (II)B core/TATA-box. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:6042-7.
- Kugel, J. F., and J. A. Goodrich. 2002. Translocation after synthesis of a four-nucleotide RNA commits RNA polymerase II to promoter escape. *Mol Cell Biol* **22**:762-73.
- Kuldell, N. H., and S. Buratowski. 1997. Genetic analysis of the large subunit of yeast transcription factor IIE reveals two regions with distinct functions. *Mol Cell Biol* **17**:5288-98.
- Langelier, M. F., D. Forget, A. Rojas, Y. Porlier, Z. F. Burton, and B. Coulombe. 2001. Structural and functional interactions of transcription factor (TF) IIA with TFIIE and TFIIIF in transcription initiation by RNA polymerase II. *J Biol Chem* **276**:38652-7.
- Langer, D., J. Hain, P. Thuriaux, and W. Zillig. 1995. Transcription in archaea: similarity to that in eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:5768-72.
- Le, T. T., S. Zhang, N. Hayashi, M. Yasukawa, L. Delgermaa, and S. Murakami. 2005. Mutational analysis of human RNA polymerase II subunit 5 (RPB5): the residues critical for interactions with TFIIIF subunit RAP30 and hepatitis B virus X protein. *J Biochem (Tokyo)* **138**:215-24.
- Littlefield, O., Y. Korkhin, and P. B. Sigler. 1999. The structural basis for the oriented assembly of a TBP/TFB/promoter complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:13668-73.
- Liu, W., G. Vierke, A. K. Wenke, M. Thomm, and R. Ladenstein. 2007. Crystal structure of the archaeal heat shock regulator from *Pyrococcus furiosus*: a molecular chimera representing eukaryal and bacterial features. *J Mol Biol* **369**:474-88.
- Liu, Y., and A. Schepartz. 2001. Kinetic preference for oriented DNA binding by the yeast TATA-binding protein TBP. *Biochemistry* **40**:6257-66.
- Luse, D. S., and G. A. Jacob. 1987. Abortive initiation by RNA polymerase II in vitro at the adenovirus 2 major late promoter. *J Biol Chem* **262**:14990-7.

- Maillet, I., J. M. Buhler, A. Sentenac, and J. Labarre. 1999. Rpb4p is necessary for RNA polymerase II activity at high temperature. *J Biol Chem* **274**:22586-90.
- Meinhart, A., J. Blobel, and P. Cramer. 2003. An extended winged helix domain in general transcription factor E/II α . *J Biol Chem* **278**:48267-74.
- Meka, H., G. Daoust, K. B. Arnvig, F. Werner, P. Brick, and S. Onesti. 2003. Structural and functional homology between the RNAP(I) subunits A14/A43 and the archaeal RNAP subunits E/F. *Nucleic Acids Res* **31**:4391-400.
- Metzger, W., P. Schickor, and H. Heumann. 1989. A cinematographic view of *Escherichia coli* RNA polymerase translocation. *Embo J* **8**:2745-54.
- Micorescu, M., S. Grünberg, A. Franke, P. Cramer, M. Thomm, and M. Bartlett. 2007. Archaeal transcription: function of an alternative transcription factor B from *Pyrococcus furiosus*. *J Bacteriol.* in press.
- Miller, G., and S. Hahn. 2006. A DNA-tethered cleavage probe reveals the path for promoter DNA in the yeast preinitiation complex. *Nat Struct Mol Biol* **13**:603-10.
- Murakami, K. S., S. Masuda, E. A. Campbell, O. Muzzin, and S. A. Darst. 2002. Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. *Science* **296**:1285-90.
- Naji, S., M. G. Bertero, P. Spitalny, P. Cramer and M. Thomm. 2007. Structure-function analysis of the RNA polymerase cleft loops elucidates initial transcription, DNA unwinding, and RNA displacement. *Nucleic Acids Res.* in press
- Naji, S., S. Grünberg, and M. Thomm. 2007. The RPB7 orthologue E' is required for transcriptional activity of a reconstituted archaeal core enzyme at low temperatures and stimulates open complex formation. *J Biol Chem* **282**:11047-57.
- Oelgeschlager, T., C. M. Chiang, and R. G. Roeder. 1996. Topology and reorganization of a human TFIID-promoter complex. *Nature* **382**:735-8.
- Ohkuma, Y. 1997. Multiple functions of general transcription factors TFIIE and TFIIH in transcription: possible points of regulation by trans-acting factors. *J Biochem (Tokyo)* **122**:481-9.
- Ohkuma, Y., and R. G. Roeder. 1994. Regulation of TFIIH ATPase and kinase activities by TFIIE during active initiation complex formation. *Nature* **368**:160-3.
- Ohkuma, Y., H. Sumimoto, M. Horikoshi, and R. G. Roeder. 1990. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: purification and characterization of general transcription factor TFIIE. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:9163-7.
- Ohkuma, Y., S. Hashimoto, C. K. Wang, M. Horikoshi, and R. G. Roeder. 1995. Analysis of the role of TFIIE in basal transcription and TFIIH-mediated carboxy-terminal domain phosphorylation through structure-function studies of TFIIE- α . *Mol Cell Biol* **15**:4856-66.

- Orlicky, S. M., P. T. Tran, M. H. Sayre, and A. M. Edwards. 2001. Dissociable Rpb4-Rpb7 subassembly of rna polymerase II binds to single-strand nucleic acid and mediates a post-recruitment step in transcription initiation. *J Biol Chem* **276**:10097-102.
- Ouhammouch, M., F. Werner, R. O. Weinzierl, and E. P. Geiduschek. 2004. A fully recombinant system for activator-dependent archaeal transcription. *J Biol Chem* **279**:51719-21.
- Pal, M., A. S. Ponticelli, and D. S. Luse. 2005. The role of the transcription bubble and TFIIB in promoter clearance by RNA polymerase II. *Mol Cell* **19**:101-10.
- Palmer, J. R., and C. J. Daniels. 1995. In vivo definition of an archaeal promoter. *J Bacteriol* **177**:1844-9.
- Pan, G., and J. Greenblatt. 1994. Initiation of transcription by RNA polymerase II is limited by melting of the promoter DNA in the region immediately upstream of the initiation site. *J Biol Chem* **269**:30101-4.
- Parvin, J. D., and P. A. Sharp. 1993. DNA topology and a minimal set of basal factors for transcription by RNA polymerase II. *Cell* **73**:533-40.
- Parvin, J. D., B. M. Shykind, R. E. Meyers, J. Kim, and P. A. Sharp. 1994. Multiple sets of basal factors initiate transcription by RNA polymerase II. *J Biol Chem* **269**:18414-21.
- Patikoglou, G. A., J. L. Kim, L. Sun, S. H. Yang, T. Kodadek, and S. K. Burley. 1999. TATA element recognition by the TATA box-binding protein has been conserved throughout evolution. *Genes Dev* **13**:3217-30.
- Peyroche, G., E. Levillain, M. Siaut, I. Callebaut, P. Schultz, A. Sentenac, M. Riva, and C. Carles. 2002. The A14-A43 heterodimer subunit in yeast RNA pol I and their relationship to Rpb4-Rpb7 pol II subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:14670-5.
- Peyroche, G., P. Milkereit, N. Bischler, H. Tschochner, P. Schultz, A. Sentenac, C. Carles, and M. Riva. 2000. The recruitment of RNA polymerase I on rDNA is mediated by the interaction of the A43 subunit with Rrn3. *Embo J* **19**:5473-82.
- Pinto, I., W. H. Wu, J. G. Na, and M. Hampsey. 1994. Characterization of sua7 mutations defines a domain of TFIIB involved in transcription start site selection in yeast. *J Biol Chem* **269**:30569-73.
- Qureshi, S. A., P. Baumann, T. Rowlands, B. Khoo, and S. P. Jackson. 1995. Cloning and functional analysis of the TATA binding protein from *Sulfolobus shibatae*. *Nucleic Acids Res* **23**:1775-81.
- Rivetti, C., and M. Guthold. 2003. Single DNA molecule analysis of transcription complexes. *Methods Enzymol* **371**:34-50.
- Renfrow, M. B., N. Naryshkin, L. M. Lewis, H. T. Chen, R. H. Ebright, and R. A. Scott. 2004. Transcription factor B contacts promoter DNA near the transcription start site of the archaeal transcription initiation complex. *J Biol Chem* **279**:2825-31.

- Robert, F., M. Douziech, D. Forget, J. M. Egly, J. Greenblatt, Z. F. Burton, and B. Coulombe. 1998. Wrapping of promoter DNA around the RNA polymerase II initiation complex induced by TFIIF. *Mol Cell* **2**:341-51.
- Rowlands, T., P. Baumann, and S. P. Jackson. 1994. The TATA-binding protein: a general transcription factor in eukaryotes and archaebacteria. *Science* **264**:1326-9.
- Ruet, A., A. Sentenac, P. Fromageot, B. Winsor, and F. Lacroute. 1980. A mutation of the B220 subunit gene affects the structural and functional properties of yeast RNA polymerase B in vitro. *J Biol Chem* **255**:6450-5.
- Sadhale, P. P., and N. A. Woychik. 1994. C25, an essential RNA polymerase III subunit related to the RNA polymerase II subunit RPB7. *Mol Cell Biol* **14**:6164-70.
- Samkurashvili, I., and D. S. Luse. 1998. Structural changes in the RNA polymerase II transcription complex during transition from initiation to elongation. *Mol Cell Biol* **18**:5343-54.
- Santangelo, T. J., L. Cubonova, C. L. James, and J. N. Reeve. 2007. TFB1 or TFB2 is sufficient for *Thermococcus kodakaraensis* viability and for basal transcription in vitro. *J Mol Biol* **367**:344-57.
- Sheffer, A., M. Varon, and M. Choder. 1999. Rpb7 can interact with RNA polymerase II and support transcription during some stresses independently of Rpb4. *Mol Cell Biol* **19**:2672-80.
- Shilatifard, A., R. C. Conaway, and J. W. Conaway. 2003. The RNA polymerase II elongation complex. *Annu Rev Biochem* **72**:693-715.
- Shockley, K. R., D. E. Ward, S. R. Chhabra, S. B. Connors, C. I. Montero, and R. M. Kelly. 2003. Heat shock response by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Appl Environ Microbiol* **69**:2365-71.
- Shpakovskii, G. V., G. M. Baranova, V. Wood, R. G. Gwilliam, E. K. Shematorova, O. L. Korol'chuk, and E. N. Lebedenko. 1999. [Molecular cloning of some components of the translation apparatus of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* and a list of its cytoplasmic proteins genes]. *Bioorg Khim* **25**:450-63.
- Siaut, M., C. Zaros, E. Levivier, M. L. Ferri, M. Court, M. Werner, I. Callebaut, P. Thuriaux, A. Sentenac, and C. Conesa. 2003. An Rpb4/Rpb7-like complex in yeast RNA polymerase III contains the orthologue of mammalian CGRP-RCP. *Mol Cell Biol* **23**:195-205.
- Spitalny, P., and M. Thomm. 2003. Analysis of the open region and of DNA-protein contacts of archaeal RNA polymerase transcription complexes during transition from initiation to elongation. *J Biol Chem* **278**:30497-505.
- Starich, M. R., K. Sandman, J. N. Reeve, and M. F. Summers. 1996. NMR structure of HMfB from the hyperthermophile, *Methanothermus fervidus*, confirms that this archaeal protein is a histone. *J Mol Biol* **255**:187-203.

- Tantin, D., and M. Carey. 1994. A heteroduplex template circumvents the energetic requirement for ATP during activated transcription by RNA polymerase II. *J Biol Chem* **269**:17397-400.
- Thomm, M. 2007 in *Archaea Molecular and Cellular Biology* (Cavicchioli, R. ed) chapter 6, pp. 139-157, American Society for Microbiology, Wahsington, D.C.
- Thomm, M., and W. Hausner 2006 in *Archaea: Evolution, Physiology and Molecular Biology* (Garrett, R., and Klenk, H.-P., eds) pp. 185-198, Blackwell Publishing, Oxford, UK
- Thomm, M. 1996. Archaeal transcription factors and their role in transcription initiation. *FEMS Microbiol Rev* **18**:159-71.
- Thomm, M., and G. Wich. 1988. An archaebacterial promoter element for stable RNA genes with homology to the TATA box of higher eukaryotes. *Nucleic Acids Res* **16**:151-63.
- Todone, F., P. Brick, F. Werner, R. O. Weinzierl, and S. Onesti. 2001. Structure of an archaeal homolog of the eukaryotic RNA polymerase II RPB4/RPB7 complex. *Mol Cell* **8**:1137-43.
- Todone, F., R. O. Weinzierl, P. Brick, and S. Onesti. 2000. Crystal structure of RPB5, a universal eukaryotic RNA polymerase subunit and transcription factor interaction target. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6306-10.
- Trinh, V., M. F. Langelier, J. Archambault, and B. Coulombe. 2006. Structural perspective on mutations affecting the function of multisubunit RNA polymerases. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**:12-36.
- Tyree, C. M., C. P. George, L. M. Lira-DeVito, S. L. Wampler, M. E. Dahmus, L. Zawel, and J. T. Kadonaga. 1993. Identification of a minimal set of proteins that is sufficient for accurate initiation of transcription by RNA polymerase II. *Genes Dev* **7**:1254-65.
- Ujvari, A., and D. S. Luse. 2006. RNA emerging from the active site of RNA polymerase II interacts with the Rpb7 subunit. *Nat Struct Mol Biol* **13**:49-54.
- Vassilyev, D. G., S. Sekine, O. Laptenko, J. Lee, M. N. Vassilyeva, S. Borukhov, and S. Yokoyama. 2002. Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature* **417**:712-9.
- Vieille, C., D. S. Burdette, and J. G. Zeikus. 1996. Thermozyes. *Biotechnol Annu Rev* **2**:1-83.
- Vierke, G., A. Engelmann, C. Hebbeln, and M. Thomm. 2003. A novel archaeal transcriptional regulator of heat shock response. *J Biol Chem* **278**:18-26.
- Westover, K. D., D. A. Bushnell, and R. D. Kornberg. 2004. Structural basis of transcription: separation of RNA from DNA by RNA polymerase II. *Science* **303**:1014-6.
- Werner, F., and R. O. Weinzierl. 2005. Direct modulation of RNA polymerase core functions by basal transcription factors. *Mol Cell Biol* **25**:8344-55.

- Werner, F., J. J. Eloranta, and R. O. Weinzierl. 2000. Archaeal RNA polymerase subunits F and P are bona fide homologs of eukaryotic RPB4 and RPB12. *Nucleic Acids Res* **28**:4299-305.
- Werner, F., and R. O. Weinzierl. 2002. A recombinant RNA polymerase II-like enzyme capable of promoter-specific transcription. *Mol Cell* **10**:635-46.
- Wei, W., D. Dorjsuren, Y. Lin, W. Qin, T. Nomura, N. Hayashi, and S. Murakami. 2001. Direct interaction between the subunit RAP30 of transcription factor IIF (TFIIF) and RNA polymerase subunit 5, which contributes to the association between TFIIF and RNA polymerase II. *J Biol Chem* **276**:12266-73.
- Worbs, M., G. P. Bourenkov, H. D. Bartunik, R. Huber, and M. C. Wahl. 2001. An extended RNA binding surface through arrayed S1 and KH domains in transcription factor NusA. *Mol Cell* **7**:1177-89.
- Woychik, N. A., and M. Hampsey. 2002. The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell* **108**:453-63.
- Woychik, N. A., S. M. Liao, P. A. Kolodziej, and R. A. Young. 1990. Subunits shared by eukaryotic nuclear RNA polymerases. *Genes Dev* **4**:313-23.
- Xie, Y., and J. N. Reeve. 2004. Transcription by *Methanothermobacter thermoautotrophicus* RNA polymerase in vitro releases archaeal transcription factor B but not TATA-box binding protein from the template DNA. *J Bacteriol* **186**:6306-10.
- Yan, M., and J. D. Gralla. 1997. Multiple ATP-dependent steps in RNA polymerase II promoter melting and initiation. *Embo J* **16**:7457-67.
- Yee, A., V. Booth, A. Dharamsi, A. Engel, A. M. Edwards, and C. H. Arrowsmith. 2000. Solution structure of the RNA polymerase subunit RPB5 from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6311-5.
- Yuan, X., J. Zhao, H. Zentgraf, U. Hoffmann-Rohrer, and I. Grummt. 2002. Multiple interactions between RNA polymerase I, TIF-IA and TAF(I) subunits regulate preinitiation complex assembly at the ribosomal gene promoter. *EMBO Rep* **3**:1082-7.
- Zaros, C., J. F. Briand, Y. Boulard, S. Labarre-Mariotte, M. C. Garcia-Lopez, P. Thuriaux, and F. Navarro. 2007. Functional organization of the Rpb5 subunit shared by the three yeast RNA polymerases. *Nucleic Acids Res* **35**:634-47.
- Zaychikov, E., L. Denissova, and H. Heumann. 1995. Translocation of the *Escherichia coli* transcription complex observed in the registers 11 to 20: "jumping" of RNA polymerase and asymmetric expansion and contraction of the "transcription bubble". *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:1739-43.
- Zhu, W., Q. Zeng, C. M. Colangelo, M. Lewis, M. F. Summers, and R. A. Scott. 1996. The N-terminal domain of TFIIB from *Pyrococcus furiosus* forms a zinc ribbon. *Nat Struct Biol* **3**:122-4.

IX Anhang

1. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APB	Azidophenacyl Bromid
APS	Ammoniumperoxidisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
Bq	Bequerelle
BRE	Faktor B Recognition Element
BSA	Bovine Serum Albumin
CTD	C-terminale Domäne
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ddNTP	Di-Desoxynukleotidtriphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EK	Endkonzentration
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
endRNAP	endogene RNA Polymerase
et al.	et alii
Fe-BABE	Fe(III) (S)-1-(p-Bromoacetamido-benzyl)ethylene diamine tetraacetic acid
gdh	Glutamat-Dehydrogenase
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
kDa	kiloDalton
<i>M. jannaschii</i>	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>
min	Minute
MP	Magnetpartikel
MPS	Magnetpartikelseparator
mRNA	messenger RNA
NaAc	Natrium-Acetat
NER	nucleotide excision repair
nt	Nukleotid
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	Optische Dichte
Oligo	Oligonukleotid
PA	Polyacryalmid
PAGE	Polyacryalmid-Gelelektrophorese
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>Pfu, P. furiosus</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PIC	Präinitiationskomplex
PNK	Polynukleotid Kinase
polI-III	eukaryotische RNA Polymerase I-III
psi	Pound-force per square inch
rekRNAP	rekonstituierte RNA Polymerase

RG	Reaktionsgefäß
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	RNA Polymerase
RNAP Δ E'F	rekonstituierte RNA Polymerase ohne E'/F
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Taq	Thermus aquaticus
TBP	TATA-Box-Bindeprotein
TE'	10 mM Tris, 0.1 mM EDTA
TEAB	Triethylammonium Bicarbonat Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TFIIB	Transkriptionsfaktor B der RNA Polymerase II
TFIIE	Transkriptionsfaktor E der RNA Polymerase II
TFIIE α	α -Untereinheit des Transkriptionsfaktors E der RNA Polymerase II
TFIIF	Transkriptionsfaktor F der RNA Polymerase II
TFIIH	Transkriptionsfaktor H der RNA Polymerase II
TFB(1, 2)	Transkriptionsfaktor B (1, 2)
TFE	Transkriptionsfaktor E
TP	Transkriptionspuffer

Symbole für den Nukleinsäurecode:

A	Desoxyadenosin
C	Desoxycytidin
G	Desoxyguanosin
T	Desoxythymidin
U	Uridin

Symbole für Aminosäuren

A	Alanin	N	Asparagin
C	Cytein	P	Prolin
D	Asparaginsäure	Q	Glutamin
E	Glutaminsäure	R	Arginin
F	Phenylalanin	S	Serin
G	Glycin	T	Threonin
H	Histidin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptohan
L	Leucin	Y	Tyrosin
M	Methionin		

2. Danksagung

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Michael Thomm für die Vergabe dieses faszinierenden Themas, die Betreuung dieser Arbeit und das Ermöglichen meines Aufenthalts in Portland/Oregon (USA) während meiner Zeit als Doktorand. Seine große Unterstützung, sein Vertrauen in meine wissenschaftlichen Fähigkeiten und stetiges Interesse haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Dr. Mike Bartlett vom *Department of Biology* der *Portland State University* in Portland/Oregon (USA) möchte ich sehr für die Gastfreundschaft während meiner Zeit in seinem Labor sowie seine großartige Unterstützung danken. Ich freue mich besonders, dass diese Kooperation nicht nur wissenschaftliche Erfolge, sondern auch eine echte Freundschaft hervorgebracht hat.

Ein besonders herzlicher Dank geht an Partizia Spitalny, die mich von meinen ersten molekularbiologischen Schritten an begleitet hat und mir jederzeit eine große Hilfe war – sei es in zahllosen Diskussionen, praktischen Fragen oder als Motivationsstütze. Vielen Dank auch für die kritische Durchsicht von Teilen dieser Arbeit. Ich werde die gemeinsame Zeit sicherlich schmerzlich missen.

Da es unmöglich ist, alle Kollegen und Mitarbeiter, die mich während meiner Zeit am *Lehrstuhl für Mikrobiologie und Archaeenzentrum* in Regensburg unterstützt haben, hier aufzuzählen und das Hervorheben Einzelner auch keinen Anspruch auch Vollständigkeit erheben könnte, beschränke ich mich auf einen tief empfunden Dank an die Mitarbeiter des gesamten Lehrstuhls für die gute Zusammenarbeit und das mehr als angenehme Arbeitsklima.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken, die mir alles bedeuten und ohne deren Unterstützung diese Promotion nicht möglich gewesen wäre.

3. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit war bisher noch nicht Bestandteil eines Prüfungsverfahrens, andere Promotionsversuche wurden nicht unternommen.

Teilergebnisse dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht worden:

Grünberg, S., M. S. Bartlett, S. Naji, and M. Thomm. 2007. Transcription factor E is a part of transcription elongation complexes. *J Biol Chem.* in press.

Naji, S., S. Grünberg, and M. Thomm. 2007. The RPB7 orthologue E' is required for transcriptional activity of a reconstituted archaeal core enzyme at low temperatures and stimulates open complex formation. *J Biol Chem* **282**:11047-57.

Micorescu, M., S. Grünberg, A. Franke, P. Cramer, M. Thomm, and M. Bartlett. 2007. Archaeal transcription: function of an alternative transcription factor B from *Pyrococcus furiosus*. *J Bacteriol.* in press.

Regensburg, im November 2007