

Analyse von hybriden eukaryotisch-archaeellen
RNA Polymerasen unter besonderer Berücksichtigung
der Untereinheiten Rpb5/RpoH und Rpb12/RpoP



Dissertation

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

vorgelegt von
Christoph Reich
aus Heide in Holstein

Regensburg, im Februar 2009

Promotionsgesuch eingereicht am: 05.02.2009

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

Prüfungsausschuss:	Vorsitzender:	Prof. Dr. W. Seufert
	1. Gutachter und Prüfer:	Prof. Dr. M. Thomm
	2. Gutachter und Prüfer:	Prof. Dr. H. Tschochner
	3. Prüfer:	Prof. Dr. R. Sterner

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I-II
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	III-IV
Einleitung	1-15
1. DNA abhängige RNA Polymerasen	2-15
1.1. Die archaeelle RNAP	3-5
1.2. Die bakterielle RNAP	6
1.3. Die eukaryotische RNAP	6-10
1.3.1. Das RNAP I Transkriptionssystem	7
1.3.2. Das RNAP II Transkriptionssystem	7-9
1.3.3. Das RNAP III Transkriptionssystem	9-10
1.4. Die RNAP Untereinheiten Rpb5 und RpoH	10-13
1.5. Die RNAP Untereinheiten Rpb12 und RpoP	13-15
2. Ziel der Arbeit	15
Material und Methoden	16-30
1. Material	16-21
1.1. Bezugsquellen von Proteinen und Chemikalien	16-17
1.1.1. Chemikalien	16-17
1.1.2. Enzyme Standards Kits	17
1.2. Bakterien- und Hefestämme	18
1.3. Plasmide	18-19
1.4. Oligonukleotide	19-21
2. Methoden	21-30
2.1. <i>In vitro</i> Transkription	21-23
2.2. Electrophoretic mobility shift assay	23
2.3. Kaliumpermanganat Footprinting	23
2.4. Western Blot Versuche	23-24
2.5. Einfügen der Mutationen in die RpoP Untereinheit	24
2.6. Reinigung von Rpb5	24
2.7. Reinigung von Rpb12	24
2.8. Reinigung der RpoP Varianten	24
2.9. Synthese der C-terminalen Domäne von RpoP	25
2.10. Komplementierungsversuche	25
2.11. Reinigung der RNAP II über eine TAP Reinigungshilfe	26-27
2.12. Puls-Chase Markierung von verschiedenen RNA Spezies	27
2.13. Reinigung der Gesamt-RNA aus <i>S. cerevisiae</i>	27-28
2.14. Agarose-Formaldehydgel	28
2.15. PA-Gel zur Auftrennung der kleinen RNA Spezies	28

2.16. Elektroblot	28
2.17. RNA Transfer mittels Kapillarblot	28
2.18. Detektion der ^3H markierten RNA	29
2.19. Hybridisierung des Northern Blots und Detektion	29
2.20. Sonden Herstellung	29
2.21. CD Spektroskopie	29-30
Ergebnisse	31-60
1. Funktionieren archaeelle RNAP Untereinheiten im eukaryotischen System?	31-41
1.1. Können archaeelle RNAP Untereinheiten gegen die entsprechenden Untereinheiten in der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ausgetauscht werden?	31-35
1.2. Funktioniert die archaeelle Untereinheit RpoH in der RNAP II <i>in vitro</i> ?	35-38
1.3. Welchen Einfluss hat die archaeelle Untereinheit RpoH auf die drei eukaryotischen RNAP <i>in vivo</i> ?	38-41
2. Funktionieren eukaryotische RNAP Untereinheiten im archaeellen System?	41-44
2.1. Können eukaryotische RNAP Untereinheiten in eine archaeelle RNAP rekonstituiert werden?	41-42
2.2. Funktioniert die archaeelle RNAP mit den Untereinheiten aus der Hefe?	42-44
3. Welche Funktionen können den RNAP Untereinheiten RpoH und RpoP zugeordnet werden?	44-60
3.1. Analyse des ΔH Enzyms	44-49
3.2 Analyse des ΔP Enzyms	49-60
Diskussion	61-70
Zusammenfassung	71-72
Summary	73
Literaturverzeichnis	74-82
Anhang	83-85
1. Abkürzungen	83-84
2. Buchstabencode der Aminosäuren	84
3. Anlage 1	84
Erklärung	
Danksagung	

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1 Struktur der archaeellen RNAP.	3
Abbildung 2 RNAP Untereinheiten in den drei Domänen des Lebens.	5
Abbildung 3 Funktionelle Elemente der RNAP II.	9
Abbildung 4 Die C-terminale Domäne von Rpb5 und RpoH zeigen große Übereinstimmungen.	11
Abbildung 5 Die RNAP Untereinheiten Rpb5 und RpoH im Enzymkomplex.	12
Abbildung 6 Die RNAP Untereinheiten Rpb12 und RpoP im Enzymkomplex.	14
Abbildung 7 A Fermentation von Hefezellen.	26
Abbildung 7 B Schematische Darstellung der RNAP II Reinigung über eine TAP Reinigungshilfe fusioniert an die C-Terminus von Rpb3.	27
Abbildung 8 Graphische Darstellung von Modell CD-Spektren	30
Abbildung 9 Das archaeelle RpoP kann die essentiellen Funktionen der Hefe Untereinheit Rpb12 komplementieren.	33
Abbildung 10 Hefezellen mit der archaeellen Untereinheit RpoP zeigen ein mit dem wt vergleichbares Wachstum bei 25 °C und der einen Wachstumsphänotyp bei 37 °C der durch Fusion mit der N-terminalen Domäne von Rpb12 aufgehoben werden kann.	34
Abbildung 11 Ergebnis der Aufreinigung der RNAP II	35
Abbildung 12 Das Fusionsprotein aus N-terminaler Domäne von Rpb5 und RpoH wird in die RNAP II eingebaut.	36
Abbildung 13 RNAP II mit Fusionsuntereinheit N-terminale Domäne Rpb5 und RpoH zeigt wt Aktivität <i>in vitro</i> .	37
Abbildung 14 Die N-terminale Domäne von Rpb5 ist für die Assemblierung der Untereinheit in die RNAP II entscheidend.	38
Abbildung 15 Das Fusionsprotein aus N-terminaler Domäne von Rpb5 und RpoH hat einen positiven Effekt auf RNAP I und III spezifische Transkription <i>in vivo</i> .	39
Abbildung 16 RNAP II funktioniert unabhängig von neusynthetisierter Rpb5 Untereinheit.	40
Abbildung 17 Die eukaryotischen Untereinheiten Rpb5 und Rpb12 können in eine archaeelle RNAP rekonstituiert werden.	42
Abbildung 18 Die archaeelle RNAP funktioniert mit der eukaryotischen Untereinheit Rpb5.	42
Abbildung 19 Rpb12 kann RpoP in der archaeellen RNAP funktional ersetzen.	43
Abbildung 20 Die ΔH RNAP bildet stabile Präinitiationskomplexe.	45
Abbildung 21 Untereinheit RpoH ist für die Bildung eines offenen Komplexes erforderlich.	45
Abbildung 22 Aktivität des ΔH Enzyms in der abortiven Transkription.	46
Abbildung 23 Pausierte ΔH RNAP Komplexe können die RNA effektiv bis zum Run-off elongieren.	47

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 24 Aktivität der ΔH RNAP auf einer Elongationsmatrize.	48
Abbildung 25 Die ΔH RNAP hat eine geringe Aktivität an einer vorgeformten Transkriptionsblase.	48
Abbildung 26 Die ΔP RNAP bildet stabile Präinitiationskomplexe.	50
Abbildung 27 Untereinheit RpoP ist für die Bildung eines offenen Komplexes erforderlich.	50
Abbildung 28 Analyse der mutierten Varianten von RpoP und von Rpb12 in der Run-off Transkription.	51
Abbildung 29 Analyse der mutierten Varianten von RpoP und von Rpb12 in der abortiven Transkription.	51
Abbildung 30 Transkription der mutierten Varianten von RpoP und von Rpb12 auf einer Elongationsmatrize.	52
Abbildung 31 Sekundärstruktur der RNAP Untereinheit RpoP.	53
Abbildung 32 Konservierte Elemente der Untereinheit RpoP und Rpb12.	53
Abbildung 33 Die C27/30S Mutante von RpoP besitzt in der Transkriptionsreaktion eine ähnliche Stabilität wie wt RpoP.	54
Abbildung 34 Analyse der mutierten Varianten von RpoP und von Rpb12 in der Single Round Transkription.	55
Abbildung 35 Die Zink-Ribbon Variante von RpoP besitzt eine veränderte Sekundärstruktur.	56
Abbildung 36 Die Zink-Ribbon Mutante von RpoP wird in der rekonstituierten RNAP schnell durch wt RpoP ersetzt.	57
Abbildung 37 Das C-terminale Peptid besitzt eine verringerte Stabilität in der Transkriptionsreaktion.	58
Abbildung 38 Wiederaufnahme der Transkription von pausierten RNAP Komplexen mit mutierten RpoP Varianten in der Single Round Transkription.	59
Abbildung 39 Die ΔP RNAP kann an einer vorgeformten Transkriptionsblase effektiv transkribieren.	59
Abbildung A1 Elutionsprofile der RpoP Varianten und Elutionsprofile der im Abschnitt über RpoP verwendeten RNAP.	85
Tabelle 1 Die archaeelle Untereinheit RpoP kann die essentiellen Funktionen von Rpb12 in der eukaryotischen RNAP ausführen.	31

Einleitung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen hybride RNA Polymerasen (RNAP). Diese Enzyme katalysieren den Vorgang der Transkription, also die Synthese einer RNA von einer DNA Matrize, und sind der wichtigste Ansatzpunkt der komplexen Genregulation. Eine genaue Charakterisierung der Transkriptionsvorgänge ist deshalb von großem Interesse. Der Schwerpunkt liegt dabei auf gemischten RNAP die aus eukaryotischen und archaeellen Komponenten aufgebaut sind. Diese Untersuchungen führen zu neuen Einblicken in die Evolution dieser interessanten Enzyme und liefern einen Beitrag zu einem besseren Detailverständnis des Transkriptionsvorganges. Die verwendeten Modellorganismen stammen wie bereits erwähnt aus der Domäne der Archaea und Eukarya, weshalb zuerst auf die Einteilung in die drei Domänen des Lebens und im Anschluss auf die noch relativ unbekannte Domäne der Archaea eingegangen wird.

Basierend auf Sequenzvergleichen der ribosomalen RNA wurde von Carl Woese eine Einteilung in die Domänen der Bacteria, Archaea und Eukarya vorgeschlagen (Woese *et al.*, 1990). Diese Einteilung widersprach der gängigen Klassifizierung nach phänotypischen Merkmalen, wurde aber bald aufgrund vieler unterstützender Daten wie z. B. der Sequenzierung des Genoms des Archaeons *Methanocaldococcus jannaschii* (Bult *et al.*, 1996) allgemein akzeptiert.

Die Domäne der Archaea zeichnet sich sowohl durch Gemeinsamkeiten mit der Domäne der Bacteria als auch mit der der Eukarya aus, besitzt aber auch Merkmale, die charakteristisch sind. So besitzen die prokaryotischen Archaea z. B. Etherlipide in ihrer Zellmembran (Koga und Morii 2007) und zeigen Besonderheiten im Stoffwechsel und in daran beteiligten Enzymen (Siebers und Schönheit 2005). Gemeinsamkeiten mit den Bacteria stellen neben den prokaryotischen Eigenschaften und morphologischen Ähnlichkeiten, Übereinstimmungen im Stoffwechsel und regulatorischen Vorgängen dar (Facciotti *et al.*, 2007). Mit den Eukarya verbindet sie vor allem eine Ähnlichkeit in der Verarbeitung der genetischen Information wie der DNA Replikation (Kelman und White 2007) und Transkription (Thomm 2007).

Das Vorkommen der Archaea ist durch Lebensräume charakterisiert in denen extreme Bedingungen in Bezug auf Temperatur, Salzkonzentration, Säuregehalt und Druck herrschen. Sie sind aber nicht auf extreme Lebensräume beschränkt, sondern sind in allen Ökosystemen verbreitet. Sie werden in die vier Reiche der *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota*, *Korarchaeota* und *Nanoarchaeota* unterteilt. Das Reich der *Nanoarchaeota* umfasst derzeit lediglich die Art *Nanoarchaeum equitans* (Hohn *et al.*, 2002). Die bisher nur aus Analysen von ribosomaler RNA bekannten *Korarchaeota* konnten kürzlich kultiviert und näher charakterisiert werden (Elkins *et al.*, 2008). Im Reich der *Euryarchaeota* ist der Modellorganismus *Pyrococcus furiosus* (Fiala und Stetter 1986) zu finden. Die „rasende Feuerkugel“ wurde vor der italienischen Insel Vulcano aus geothermal erhitzen Marinensedimenten isoliert. *Pyrococcus furiosus* ist strikt anaerob und wächst heterotroph bei einer optimalen Wachstumstemperatur von 100 °C. Eine Besonderheit ist die Generationszeit von nur 37 Minuten. Das kokoide Archaeon (d 0,8-2,5 µm) ist ausgeprägt begeißelt und das Genom wurde vollständig sequenziert (Poole *et al.*, 2005). Besondere Anwendung findet in dieser Arbeit das archaeelle *in vitro* Tanskriptionssystem von *Pyrococcus*.

(Hethke *et al.*, 1996), welches aufgrund seiner überschaubaren Komplexität, ein ideales Modellsystem für die detaillierte Untersuchung der basalen Vorgänge der Transkription darstellt. Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit befasst sich mit einem Modellorganismus aus der eukaryotischen Domäne des Lebens, der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dieser detailliert charakterisierte einzellige Pilz wurde als erster Eukaryot komplett sequenziert (Goffeau *et al.*, 1997). Umfangreiche Untersuchungen wurden in der Hefe vor allem zu Protein-Protein Wechselwirkungen und dem Zellzyklus durchgeführt (*Saccharomyces* Genome Database). *S. cerevisiae* besitzt zum einen die hohe Komplexität der eukaryotischen Transkriptionsvorgänge, zum anderen steht ein ausgefeiltes genetisches System zur Verfügung, welches eine Reihe von Untersuchungen erlaubt, die im hyperthermophilen archaeellen System zurzeit noch nicht möglich sind. Die Vorteile des basalen archaeellen *in vitro* Systems und des für genetische Untersuchungen leicht zugänglichen Hefesystems werden in dieser Arbeit genutzt, um den Vorgang der Transkription genauer zu charakterisieren. Hierbei steht die DNA abhängige RNA Polymerase (RNAP), die diesen Vorgang katalysiert, im Mittelpunkt des Interesses.

1. DNA abhängige RNA Polymerasen

An der Schlüsselstelle der Genexpression und damit auch der Genregulation steht die Transkription. Der Vorgang der Synthese einer RNA von einer DNA Matrize wird von hochentwickelten, nanomechanischen Maschinen durchgeführt, den RNA Polymerasen. Diese führen die Transkription mit einer erstaunlichen Genauigkeit und Geschwindigkeit durch (Edwards *et al.*, 1991) und besitzen Kräfte, die die von Motorproteinen im Cytoskelett übersteigen (Abbondanzieri *et al.*, 2005). Die chemischen Aspekte dieser Reaktion wurden detailliert untersucht und es ist wahrscheinlich, dass diese enzymatische Aktivität als eine der ersten in der Evolution entwickelt wurde (Seitz 1998).

Beim Vorgang der Transkription kopiert die RNAP einen Strang der DNA und baut Ribonucleosidtriphosphate (NTPs) nacheinander in die wachsende RNA ein. Der vereinfachte Ablauf besteht aus der Bindung des korrekten NTPs, dem Einbau des gebundenen Nucleosidmonophosphates in die RNA und dem Freisetzen des Pyrophosphates. Die synthetisierte RNA ist dabei komplementär zum kodierenden Strang der DNA und wächst in 5'-3' Richtung. Bestimmte mechanische Vorgänge der katalytischen Funktion, der Bewegung auf der DNA und im katalytischen Zentrum sind aber nach wie vor in der Diskussion (Tan *et al.*, 2008).

Die RNAP der Archaea, Bacteria und Eukarya unterscheiden sich grundsätzlich voneinander, zeigen aber auch Ähnlichkeiten. Bacteria und Archaea besitzen ein Enzym zur Synthese aller Arten von RNA. Die Eukarya besitzen drei RNAP (I, II, III). Die RNAP I synthetisiert die ribosomale RNA (rRNA), RNAP II messenger RNAs (mRNA) und RNAP III die transfer RNA (tRNA) Spezies sowie die 5S rRNA. Die stärkste Übereinstimmung zeigt die archaeelle RNAP, und das gesamte archaeelle Transkriptionssystem, mit dem eukaryotischen System (Langer *et al.*, 1995). Die archaeelle RNAP kann hierbei als eine vereinfachte Version der RNAP II angesehen werden (Abb. 2).

1.1. Die archaeelle RNAP

Die RNA Polymerase von *Pyrococcus furiosus* besteht aus elf Untereinheiten (RpoB, A', A'', D, E, F, L, H, N, P). In der eukaryotischen RNAP II (Pol II) gibt es zu allen diesen archaeellen Untereinheiten homologe Untereinheiten. Bisher bildeten lediglich die Pol II Untereinheiten Rpb9 und Rpb8 eine Ausnahme. Rpb9 zeigt allerdings deutliche Ähnlichkeiten zum archaeellen Transkriptionsfaktor S (TFS) und die Funktionsanalysen lassen ähnliche Aufgaben vermuten (Nesser *et al.*, 2006; Lange und Hausner 2004). Rpb8 wurde kürzlich durch Sequenzanalysen in den Genomen der Korarchaeota und hyperthermophilen Crenarchaeota entdeckt (Koonin *et al.*, 2007, Kwapisz *et al.*, 2008). Somit konnten für alle Pol II Untereinheiten Homologe im archaeellen System gefunden werden, dies gilt allerdings nicht für Pol I und Pol III spezifische Untereinheiten (zusammengefasst in Abb. 2).

Neue Einblicke in die Funktion der archaeellen RNAP lieferten die Kristallstruktur der *Sulfolobus* RNAP (Hirata *et al.*, 2008; Abb. 1) sowie Cryo-elektronenmikroskopische Untersuchungen der *Pyrococcus* RNAP (Kusser *et al.*, 2008). Bei einem Vergleich mit Strukturen eukaryotischer (Cramer *et al.*, 2001; Armache *et al.*, 2005) und bakterieller RNAP (Zhang *et al.*, 1999; Murakami *et al.*, 2002) konnten konservierte Strukturen z. B. am aktiven Zentrum identifiziert werden, die darauf schließen lassen, dass die grundlegenden Mechanismen der Transkription in allen zellulären RNAP konserviert sind. Diese Daten zeigen aber auch deutlich, dass die archaeelle RNAP und die eukaryotische Pol II sich in ihrer Gesamtarchitektur sehr ähnlich sind, und dass die archaeelle RNAP ein exzellentes Modell für die Analyse der eukaryotischen Transkription auf molekularer Ebene darstellt.

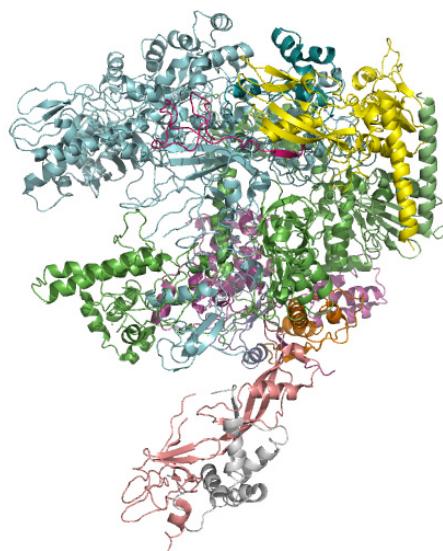


Abb. 1 Struktur der archaeellen RNAP. Die Struktur der archaeellen RNAP aus *Sulfolobus solfataricus* mit einer Auflösung von 3,4 Å ist als Ribbon-Model dargestellt (Hirata *et al.*, 2008; 2PMZ). Die 11 Untereinheiten sind farblich hervorgehoben (RpoA'-hellgrün, RpoA''-magenta, RpoB-hellblau, RpoD-gelb, RpoE-rosa, RpoF-grau, RpoH-lila, RpoK-orange, RpoL-dunkelgrün, RpoN-türkis, RpoP-rot). Das Modell wurde mit Hilfe der PyMOL Software erstellt.

Die detaillierte Analyse der Transkription wird dadurch erleichtert, dass es im archaeellen System möglich ist, die RNAP aus heterolog exprimierten Untereinheiten zu rekonstituieren. Dies ist mit der eukaryotischen RNAP bisher nicht möglich und gelang bislang lediglich mit RNAP der

hyperthermophilen Archaea *Pyrococcus furiosus* (Naji *et al.*, 2007) und *Methanocaldococcus jannaschii* (Werner und Weinzierl 2002). Der Versuch, eine mesophile archaeelle RNAP zu rekonstituieren, schlug bisher fehl (Weinzierl, persönliche Mitteilung). Dies lässt vermuten, dass die hyperthermophilen archaeellen RNAP eine besondere Stabilität aufweisen und so z. B. die Denaturierungs- und Renaturierungsritte in der Rekonstitutionsprozedur überstehen. Basierend auf dem *Methanocaldococcus* System wurde eine RNAP Fabrik entwickelt, mit Hilfe derer die Untereinheiten systematisch mutiert werden können (Nottebaum *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2008). Darüber hinaus konnten auch gezielte Analysen beispielweise des aktiven Zentrums (Naji *et al.*, 2007), mechanistische Einblicke in die Funktion der Transkription geben, die die Momentaufnahmen der Kristallographie ergänzen.

Die großen Untereinheiten RpoB und RpoA, wobei RpoA häufig in RpoA' und RpoA'' gespalten vorliegt, bilden das Grundgerüst des Enzyms (siehe auch Rpb1 und Rpb2). Zusammen wird eine Klammer ausgebildet. In der Spalte dieser Klammer, befindet sich das aktive Zentrum. In Strukturen mit isolierter eukaryotischer RNA Polymerase (Cramer *et al.*, 2001) ist diese Klammer in geöffneter Position. In Komplexen der Pol II mit gebundener DNA und synthetisierter RNA hingegen ist diese Klammer geschlossen (Gnatt *et al.*, 2001). In der Kristallstruktur der isolierten archaeellen RNAP ist die Klammer in geschlossener Position (Hirata *et al.*, 2008).

In Kristallen mit der leicht dissoziierbaren Untereinheit Rpb7 bildet die Untereinheit einen Keil an der Verbindungsstelle der mobilen Klammer mit der C-terminalen Repeatregion (CTD). Möglicherweise haben daher die Dimere Rpb4/7 (Pol II) beziehungsweise RpoE'/F (archaeelle RNAP; Grünberg *et al.*, 2007) eine Aufgabe in der Stabilisierung der geschlossenen Klammer. Dies konnte allerdings bisher nicht experimentell nachgewiesen werden. Allerdings hat der RpoE'/F Komplex einen positiven Einfluss auf die Elongationsfähigkeit im archaeellen System (S. Naji, unveröffentlichte Daten). Für RpoE'/F wird außerdem angenommen, dass das Dimer die Bildung des offenen Komplexes bei niedrigen Temperaturen ermöglicht (Naji *et al.*, 2007). Darüber hinaus ist über die Aufgaben der kleineren Untereinheiten wie RpoH, K, L, N und P, die wichtig für die Funktionalität des Enzyms sind, kaum etwas bekannt.

Das basale archaeelle Transkriptionssystem besteht lediglich aus den beiden Initiationsfaktoren TBP und TFB (Homologe zum eukaryotischen TBP und TFIIB). Diese sind ausreichend für eine korrekte Initiation und Transkription im archaeellen System (Hausner *et al.*, 1996). Ein dritter Faktor, TFE, mit großer Sequenzähnlichkeit zur N-terminalen Domäne der α Untereinheit von TFIIE, stabilisiert die Bildung des offenen Komplexes (Grünberg *et al.*, 2007). Der schon angesprochene Transkriptionsfaktor S ist an der Korrekturfunktion der RNAP beteiligt, in dem er die Hydrolyse der RNA am 3' Ende des Transkriptes induziert (Lange und Hausner 2004).

Der archaeelle Promotor ähnelt dem Promotor der eukaryotischen Pol II. Er besitzt ein TATA-Element bei -30 bis -25 relativ zum Transkriptionsstart, davor ein TFB-Erkennungselement (BRE) sowie ein Initiatorelement (Inr), welches den Transkriptionsstart beinhaltet (Bartlett 2005). TBP bindet bei der Initiation der Transkription zuerst an das TATA-Element und rekrutiert anschließend TFB. Über eine gleichzeitige Interaktion von TFB mit dem BRE Element bekommt der Komplex eine korrekte Orientierung. TFB ist im Anschluss für die Rekrutierung der RNAP verantwortlich und ein Präinitiationskomplex kann sich bilden. Der Präinitiationskomplex erstreckt sich von -35 bis +20 relativ zum Transkriptionsstart (Bartlett *et al.*, 2004). Der offene Komplex bildet sich von -11 bis -1. Dieser Vorgang ist, im Gegensatz zur

RNAP II, unabhängig von der Hydrolyse von ATP (Hausner und Thomm 2001). Beim Übergang zur Elongation löst sich die Polymerase von den Transkriptionsfaktoren und es kommt zu Veränderungen im RNAP Komplex. Dabei vergrößert sich die Transkriptionsblase auf 17 nt (Spitalny und Thomm 2003).

Die Regulation der Genexpression bei den Archaea verläuft nach Mechanismen, die große Ähnlichkeit zur bakteriellen Genregulation zeigen (Bell und Jackson 1998/2001). Es kommt dabei hauptsächlich zu negativer Regulation über die Behinderung der Rekrutierung der RNAP (Geiduschek und Ouhammouch 2005). Seltener ist die positive Regulation, bei der es zur erleichterten Rekrutierung von TBP kommt (Ouhammouch *et al.*, 2003). Bei Halobakterien sind auch mehrere Paraloge von TBP und TFB bekannt, die eine differentielle Genexpression über alternative TBP-TFB-RNAP Komplexe vermuten lassen (Lu *et al.*, 2008).

Das archaeelle System zeigt also eine Kombination von Elementen der Bacteria und Eukarya. Viele transkriptionelle Regulatoren sind wie beschrieben von bakterieller Art. Die basale archaeelle Transkriptionsmaschinerie ähnelt hingegen sehr den Kernelementen des Pol II Transkriptionsapparates, was auch in den basalen Vorgängen der Initiation und der Bildung des Präinitiationskomplexes deutlich wird.

	Archaea <i>P. furiosus</i>	Eukarya <i>S.cervisiae</i>		Bacteria <i>E. coli</i>	
		RNAP I	RNAP II	RNAP III	
Kern der RNA Polymerase	RpoA' (103,5) / RpoA'' (44,4)	A190 (186,4)	Rpb1 (191,6)	C160 (162,3)	β' (155,1)
	RpoB (127)	A135 (135,7)	Rpb2 (138,8)	C128 (129,5)	β (150,6)
	RpoD (29,8)	AC40 (37,7)	Rpb3 (35,3)	AC40 (37,7)	$\alpha x2$ (36,5)
	RpoL (11,1)	AC19 (16,2)	Rpb11 (13,6)	AC19 (16,2)	
	RpoH (9,3)	A27 (25)	Rpb5 (25)	Rpb5 (25)	
	RpoN (7,8)	Rpb10 (7,8)	Rpb10 (7,8)	Rpb10 (7,8)	
	RpoK (6,2)	A23 (17,9)	Rpb6 (17,9)	Rpb6 (17,9)	ω (10,2)
	RpoP (5,8)	Rpb12 (7,7)	Rpb12 (7,7)	Rpb12 (7,7)	
	"TFS" (12,9)	A12,2 (13,7)	Rpb9 (14,3)	C11 (12,5)	
RpoE/F bzw. Rpb4/7 Subkomplex	RpoE (21,7)	A43 (36,2)	Rpb7 (19,1)	C25 (24,3)	
	RpoF (14,1)	A14 (14,6)	Rpb4 (25,4)	C17 (18,6)	
TFIIF-ählicher Subkomplex*		A49 (46,7)	Tfg1 (82,2)	C37 (32,1)	
		A34,5 (26,9)	Tfg2 (46,6)	C53 (46,7)	
RNAP III spezifische Untereinheiten				C82 (74)	
				C34 (36,1)	
				C31 (27,7)	
Gesamtgröße (ca. in kDa)	381	590	500	700	392
Summe der Untereinheiten	11	14	12	17	5

Abb. 2 RNAP Untereinheiten in den drei Domänen des Lebens. Die Untereinheitenzusammensetzung der RNAP von *Pyrococcus furiosus*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Escherichia coli* ist gezeigt. Die Molekulare Masse ist in kDa neben den Proteinen in Klammern angegeben. Homologe oder ähnliche Untereinheiten sind nebeneinander angeordnet und mit gleichem Hintergrund versehen. Homologe Untereinheiten zu Rpb8 wurden bisher lediglich in den Reichen der Cren- und Korarchaeota entdeckt (RpoG), (nach Cramer *et al.*, 2008, erweitert und modifiziert).

* Die Untereinheiten in der RNAP I und III bilden Heterodimere, die Teile des RNAP II Initiations- und Elongationsfaktors TFIIF ähneln, der aus den Untereinheiten Tfg1, 2 und 3 aufgebaut ist.

1.2. Bakterielle RNAP

Die bakterielle RNAP gilt aufgrund ihrer fünf Untereinheiten (α_2 , β , β' , ω) als die einfachste Form der hier beschriebenen Enzyme. Die Assemblierung verläuft zuerst über die beiden α Untereinheiten, die ein Dimer bilden, welches als Plattform für die Rekrutierung der katalytischen Untereinheiten β und β' dienen. Die ω Untereinheit ist für die katalytische Aktivität nicht zwingend erforderlich, dient aber der Stabilisierung der β' Untereinheit (Minakhin *et al.*, 2001). Die Kristallstruktur der *Thermus aquaticus* RNAP (Zhang *et al.*, 1999) zeigt in ihrer Gesamtarchitektur, wie die archaeelle RNAP und die eukaryotische Pol II, die Form einer Klammer, an deren Rückwand sich das aktive Zentrum befindet. Diese Grundstruktur ist damit in allen zellulären RNAP konserviert.

Die bakterielle RNAP kann wie die archaeelle RNAP aus Einzeluntereinheiten rekonstituiert werden (Heil und Zillig 1970). Unterschiede werden in der Rekrutierung der bakteriellen RNAP an die Promotor DNA deutlich. Daran ist eine Vielzahl von spezifischen σ -Faktoren beteiligt (Gribskov und Burgess 1986), was im Gegensatz zu den generellen Transkriptionsfaktoren im archaeellen und eukaryotischen System steht. Das Holoenzym wird also mit gebundenem σ -Faktor an die Promotor DNA rekrutiert. Die hierbei entscheidenden Stellen sind die sogenannte Pribnow-Sequenz (oder -10 Element) sowie das -35 Element. Nun kann ein offener Komplex gebildet werden und die Synthese der RNA beginnt. Nach der Synthese von abortiven Transkripten geht die Polymerase anschließend in die stabilere Elongationsphase über (Murakami *et al.*, 2002). Die essentiellen Komponenten der bakteriellen RNAP sind, wie beschrieben, in allen RNAP bis zu den Eukarya erhalten geblieben (Archambault und Friesen 1993), allerdings zeigen archaeelle und eukaryotische Polymerasen in ihrem Aufbau und Funktion deutlich größere Übereinstimmungen (Kyrides und Ouzounis 1999; Abb. 2). Die bakterielle Polymerase wird über einen grundsätzlich anderen Mechanismus rekrutiert und ist damit eher für generelle Untersuchungen der Enzymaktivität nützlich, und sollte der archaeellen und eukaryotischen Transkription nicht gleichgesetzt werden.

1.3. Eukaryotische RNAP

Die eukaryotische Zelle besitzt drei RNAP mit unterschiedlichen Spezifitäten und Aufgaben. Zusätzlich gibt es noch spezielle RNAP der Mitochondrien und Chloroplasten in den jeweiligen Kompartimenten. Die drei RNAP unterscheiden sich in Größe und Zusammensetzung der Untereinheiten (Pol I 14, Pol II 12 und Pol III 17 Untereinheiten), wobei einige Untereinheiten spezifisch sind, andere wiederum in allen drei RNAP vorkommen. Zu letzteren gehören Rpb5, Rpb6, Rpb8, Rpb10 und Rpb12 (nach Pol II Nomenklatur). Auch die großen katalytischen Untereinheiten zeigen deutliche Sequenzähnlichkeiten, die besonders um das aktive Zentrum ausgeprägt sind und einen konservierten transkriptionellen Mechanismus widerspiegeln. Es überwiegt also die Übereinstimmung der drei Polymerasen (Abb. 2). Nichts desto trotz zeigen alle Enzyme spezifische Anpassungen an ihre Funktion in der Zelle (zusammengefasst in Cramer *et al.*, 2008). Die Pol II kann dabei generell als ein Vorläufer angesehen werden, aus dem Pol I und III sich entwickelt haben könnten (Kwapisz *et al.*, 2008).

1.3.1. Das RNAP I Transkriptionssystem

In der Hefe ist die Pol I für 60 % der gesamten nukleären Transkription verantwortlich und die produzierte rRNA ist mit 80 % aller RNAs in der Zelle der größte Anteil (Warner 1999). Die 590 kDa großen Enzyme bestehen aus 14 Untereinheiten. Die von der Pol I synthetisierte rRNA stellt dabei den Ausgangspunkt für die Assemblierung der Ribosomen dar und ist damit auch entscheidend für die Regulation des Zellwachstums (Moss *et al.*, 2007).

Neben den gemeinsamen Untereinheiten aller drei RNAP und den Ähnlichkeiten in den großen katalytischen Untereinheiten kommen die Untereinheiten AC40 und AC19 in Pol I und III vor. Sie zeigen Übereinstimmungen mit Rpb3 und Rpb11 der Pol II. Die Untereinheiten A14/43 bilden ein Dimer, welches Ähnlichkeiten zum Rpb4/7 Dimer in der Pol II und zum C17/25 Dimer der Pol III aufweist (Meka *et al.*, 2003; Siaut *et al.*, 2003). A12,2 ist ein Homolog zu Rpb9 in der Pol II und zu C11 in der Pol III (Hu *et al.*, 2002) und besitzt eine intrinsische Aktivität zum Abbau des 3' Endes der RNA, die es dem Enzym erlaubt die RNA nach Falscheinbau zu korrigieren (Kuhn *et al.*, 2007). Die Untereinheiten A49 und A34,5 sind spezifisch für die Pol I. Sie bilden ein Heterodimer und sind für die Elongationsfähigkeit des Enzyms entscheidend. Das Dimer zeigt damit Ähnlichkeiten zum Faktor TFIIF im Pol II System (Kuhn *et al.*, 2007; zusammengefasst in Abb. 2).

Die einzige essentielle Funktion der Pol I in der Hefe ist die Synthese eines 35S rRNA Transkriptes, da der letale Phänotyp der Deletion der katalytischen Untereinheit Rpa135, durch die Synthese des 35S Transkriptes durch die Pol II unter der Kontrolle eines Galactose Promotors wieder aufgehoben werden kann (Nogi *et al.*, 1991). Dieses 35S Transkript wird in die reifen 18S, 5,8S und 25S rRNAs prozessiert, die Teil der Ribosomen sind. Der Pol I Promotor besteht aus zwei essentiellen Elementen. Zum einen gibt es ein Kernelement zwischen +5 und -40 relativ zum Transkriptionsstart und ein stromaufwärts gelegenes Element zwischen -60 und -155 (Choe *et al.*, 1992). Die beteiligten Faktoren sind der aus mehreren Untereinheiten bestehende Core Faktor, der upstream activator Faktor, TBP sowie der einzelne Faktor Rrn3. Die Pol I bildet zuerst einen Komplex mit Rrn3, der bereits eine basale Aktivität besitzt (Keener *et al.*, 1998). TBP und der upstream activator Faktor führen dann zur Bildung eines stabilen Präinitiationskomplexes und zur Bindung an das Promotorelement bei -60/-155. TBP rekrutiert dann den Core Faktor, der an den Kernpromotor bindet (Steffan *et al.*, 1996). Dies stabilisiert den Gesamtkomplex weiter und die Transkription kann mit voller Aktivität erfolgen.

1.3.2. Das RNAP II Transkriptionssystem

Die Pol II besteht aus einem Kern von 10 Untereinheiten (Abb. 2 und 3) und dem dissoziierbaren Dimer Rpb4/7. Die Größe beträgt 500 kDa und strukturell ist die Pol II die am besten untersuchte eukaryotische Polymerase (Cramer *et al.*, 2001; Kettenberger *et al.*, 2006; Westover *et al.*, 2004; Bushnell *et al.*, 2001). Die Kernuntereinheiten Rpb1, Rpb2, Rpb3 und Rpb11 zeigen deutliche sequenzielle und strukturelle Übereinstimmungen mit Untereinheiten der Pol I, Pol III, dem bakteriellem Enzym, sowie der archaeellen RNAP (Zhang *et al.*, 1999; Kusser *et al.*, 2008). Die Untereinheiten Rpb5, Rpb6, Rpb8, Rpb10 und Rpb12 kommen in allen drei eukaryotischen RNAP vor. Wie bereits beschrieben gibt es ein Homolog zu Rpb9 in der Pol I, aber auch in der Pol III. Rpb6 zeigt Ähnlichkeiten zur bakteriellen ω Untereinheit (Minakhin *et al.*, 2001). Im archaeellen Enzym gibt es nah verwandte Untereinheiten zu allen Pol II Untereinheiten (Abb. 2).

Die Pol II ist für die Synthese der mRNA in der Zelle verantwortlich. Dem Enzym fällt damit die komplexeste Aufgabe der eukaryotischen Polymerasen zu und sie ist Ziel umfangreicher Regulationsvorgänge. Die Regulation wird zum einen durch generelle Transkriptionsfaktoren durchgeführt, die für die korrekte Initiation der Pol II *in vitro* notwendig sind (Orphanides *et al.*, 1996). Darüber hinaus gibt es sogenannte Co-Aktivatoren wie z. B. Chromatin modifizierende Faktoren, die für die Aktivierung bestimmter Gene eine Rolle spielen (Woychik und Hampsey 2002). Einer der universellsten Co-Faktoren, der die regulatorischen Signale verschiedenster Faktoren auf die Pol II Maschinerie überträgt, ist ein umfangreicher Komplex, den man Mediator nennt (Meyers und Kornberg 2000). Der Mediator ist auf die Eukarya beschränkt und ermöglicht eine detaillierte Regulation der komplexen Genexpression in höheren Organismen (Boube *et al.*, 2002).

Der Pol II Transkriptionszyklus beginnt in der Regel mit der Bindung von Gen-spezifischen Faktoren in der Nähe des Transkriptionsstarts. Diese wiederum rekrutieren dann Faktoren, die die Chromatin Struktur verändern können (Kornberg und Lorch 1999), oder sie interagieren direkt mit Komponenten der Pol II Transkriptionsmaschinerie. Bei der Rekrutierung der Pol II an den Promotor bildet die Polymerase zusammen mit den generellen Transkriptionsfaktoren den sogenannten Präinitiationskomplex. Der am besten charakterisierte und weit verbreitete Core-Promotor, erstreckt sich ca. +/-35 bp um den Transkriptionsstart. Die charakteristischen Motive sind ein TFIIB Erkennungselement (BRE -37 bis -32), ein TATA-Element (-31 bis -26), ein Initiatorelement (Inr -2 bis +4) und ein stromabwärts gelegenes Core-Promotor Element (DPE +28 bis +32; zusammengefasst durch Smale und Kadonaga 2003). Diese Grundstruktur ist stark konserviert, allerdings gibt es ebenfalls Variationen in der Promotorstruktur, die eine Aufgabe in der Regulation der Genexpression wahrnehmen (Butler und Kadonaga 2002). Die Bildung eines Präinitiationskomplexes beginnt mit der Bindung der TBP Untereinheit von TFIID an die TATA-Box, darauf folgt die Rekrutierung von TFIIB, unphosphorylierter Pol II, TFIIF, TFIIE und TFIIH. Als nächsten Schritt kommt es zu einer Konformationsänderung des Komplexes und zu einem Aufschmelzen der DNA ca. 15 bp um den Transkriptionsstart. Der kodierende Strang wird im aktiven Zentrum positioniert und ein offener Komplex wird gebildet (Hahn 2004). Die Initiation beginnt mit der Synthese der ersten Phosphodiester Bindung der RNA. Hierbei kommt es zuerst meist zur Transkription kurzer abortiver Transkripte, bevor das Enzym dann in die Elongationsphase übergeht (Holstege *et al.*, 1997). Die Pol II verliert im Folgenden den Kontakt zu den Transkriptionsfaktoren und der Promotor DNA. Eine Vielzahl von Faktoren, die die Elongation beeinflussen, Chromatin modifizierenden Enzymen sowie RNA Prozessierungsfaktoren nehmen nun Kontakt zur der elongierenden Pol II auf (Bentley 2005). In einigen Fällen bleiben Teile der generellen Transkriptionsfaktoren weiter an der Promotor DNA gebunden und erlauben so eine schnellere Reinitiation (Yudkovsky *et al.*, 2000).

Bei der Bildung des offenen Komplexes zeigt die Pol II ein besonderes Kennzeichen. Sie ist die einzige zelluläre RNAP, die für diesen Vorgang eine ATP-abhängige Helikase benötigt. Alle anderen Polymerasen führen dies über eine Stabilisierung der einzelnen DNA Strände durch, die über eine Art Keil an einem Transkriptionsfaktor getrennt werden (Murakami *et al.*, 2002). Eine zweite Besonderheit ist die C-terminale Domäne von Rpb1 (CTD). Diese beinhaltet repetitive heptamere Sequenzen, welche regulatorischen Phosphorylierungen unterworfen werden.

Verschiedene Varianten von Phosphorylierungen sind hierbei bekannt. Bei der Rekrutierung an den Promotor liegt die Pol II dephosphoryliert vor und wird dann im Laufe der Initiation phosphoryliert, was den Präinitiationskomplex destabilisiert und das Lösen vom Promotor unterstützt. Die CTD ist im Anschluss daran Angriffspunkt verschiedenster Faktoren, die Initiation, Elongation und Termination beeinflussen, sowie von Enzymen, die für die pre-mRNA Modifizierung nötig sind (Palancade und Bensaude 2003).

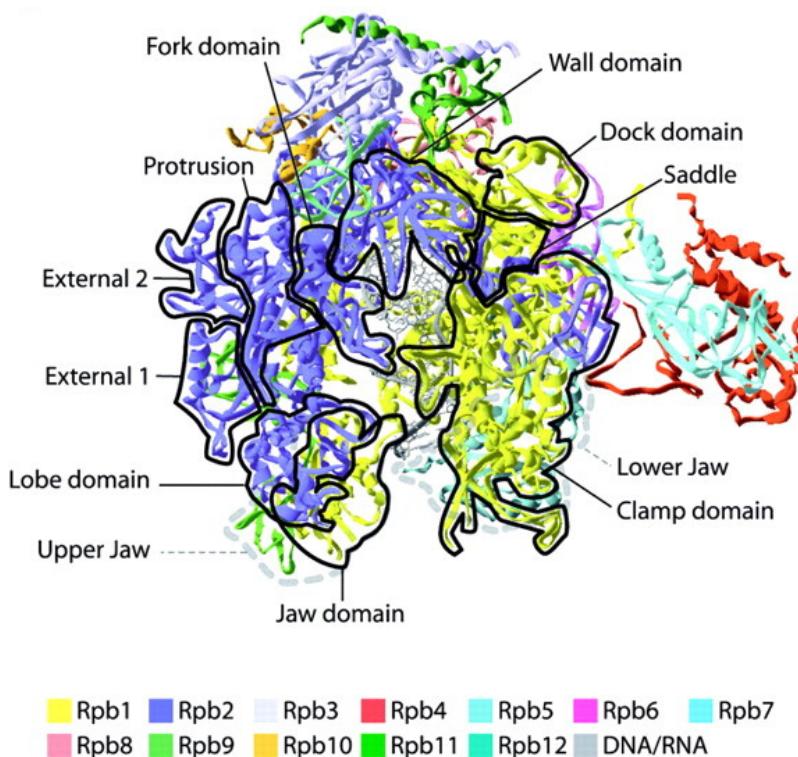


Abb. 3 Funktionelle Elemente der RNAP II. Die Struktur der an Nukleinsäuren gebundenen RNAP II aus *S. cerevisiae* ist dargestellt (1Y1W). Es sind die verschiedenen Untereinheiten und das DNA-RNA Hybrid hervorgehoben (Legende unter der Abb.). Einige funktionelle Domänen des Enzyms sind schwarz und grau umrahmt (aus Trinh *et al.*, 2006).

1.3.3. Das RNAP III Transkriptionssystem

Die Pol III hat eine Größe von ca. 700 kDa und besteht aus 17 Untereinheiten. Die katalytischen Untereinheiten C160 und C128 zeigen deutliche Übereinstimmungen mit den großen Untereinheiten der Pol I und II. Neben den mit der Pol II und Pol I gemeinsamen Untereinheiten, besitzt die Pol III acht zusätzliche Untereinheiten, die drei Unterkomplexe bilden, welche außen um den Kern der Polymerase angeordnet und teilweise leicht dissoziierbar sind (Lorenzen *et al.*, 2007). Die Subkomplexe C82/34/31 und C53/37/11 sind spezifisch für die Pol III, wobei C11 die angesprochenen Ähnlichkeiten zu Rpb9 und A12,2 aufweist (Cramer *et al.*, 2006). Der Subkomplex C17/25 weist die ebenfalls schon beschriebenen Ähnlichkeiten zum Rpb4/7 und Rpa14/43 Dimer auf. Für das C17/25 Dimer konnte eine Rolle in der Initiation der Pol III gezeigt werden, in dem es an Transkriptionsfaktoren bindet (Jasiak *et al.*, 2006; Abb. 2).

Die Funktion der Pol III in der Zelle ist auf die Produktion kleiner, struktureller oder katalytischer RNAs, darunter die 5S rRNA und tRNAs, beschränkt (Schramm und Hernandez 2002). Die

Aufgabe der Pol III ist damit weniger begrenzt als die der Pol I, allerdings nicht so umfangreich wie die der Pol II. Promotoren der Pol III lassen sich in drei Hauptgruppen einteilen. Promotoren für 5S und tRNAs sind dabei zweigeteilt, mit einer Box A getrennt von einer Box B oder Box C. tRNA Gene besitzen dabei die Box B und die Gene für die 5S rRNA eine Box C. Darüber hinaus werden noch Gene für kleine nukleäre RNAs transkribiert, die eine TATA-Box sowie sogenannte proximale und distale Sequenzelemente besitzen. An die beschriebenen Promotoren binden zuerst die aus mehreren Untereinheiten bestehenden Faktorkomplexe TFIIIA und TFIIIC. Der Faktor TFIIIB, bestehend aus TBP, Brf und Bdp1, wird dann durch TFIIIC rekrutiert und bindet stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle (Kassavetis *et al.*, 1990). Dort gebunden ist TFIIIB in der Lage, die Pol III unabhängig von den wieder dissoziierten Faktoren TFIIIC und TFIIIA, wiederholt zu rekrutieren. Dies ermöglicht eine effizientere Transkription als die jeweilige *de novo* Initiation. Die drei Faktoren TFIIIA, B und C sind ausreichend für eine Transkription *in vitro*. Es sind keine weiteren Elongations- und Terminationsfaktoren bekannt und die Gene für die jeweiligen Untereinheiten der Faktoren TFIIIA, B und C, sowie die 17 Pol III Untereinheiten sind alle essentiell (Kassavetis und Geiduschek 2006).

Im Folgenden wird detailliert auf zwei RNAP Untereinheiten eingegangen, die in allen drei eukaryotischen Polymerasen vorkommen. Es handelt sich zum einen um die größte (Rpb5) und zum anderen um die kleinste (Rpb12) der gemeinsamen Untereinheiten, die, zusammen mit der entsprechenden homologen archaeellen Untereinheit, beschrieben werden.

1.4. Die RNAP Untereinheiten RpoH und Rpb5

Die archaeelle RNAP Untereinheit RpoH hat eine Größe von 9,2 kDa und ist homolog zur C-terminalen Domäne der eukaryotischen Untereinheit Rpb5. Diese Homologie zeigt sich in einer konservierten Aminosäuresequenz, aber auch in der Struktur und in der Lage im Enzymkomplex (Abb. 4).

In vielen sequenzierten archaeellen Genomen ist das Gen welches für RpoH kodiert der Startpunkt eines Operons mit den Genen der katalytischen Untereinheiten RpoB-A'-A''. Dies lässt eine wichtige Funktion im RNAP Komplex vermuten. Im RNAP Komplex werden der Untereinheit Aufgaben in der Stabilisierung und Unterstützung der korrekten Faltung der großen katalytischen Untereinheiten zugeordnet (Hirata *et al.*, 2008).

Die Struktur der Untereinheit RpoH ist, zum einen aus einer Kristallstruktur für *Methanocaldococcus jannaschii* (Thiru *et al.*, 1999), sowie aus dem Enzymkomplex der *Sulfolobus* RNAP (Hirata *et al.*, 2008), bekannt. Sie ist aus vier gemischten β-Faltblättern aufgebaut, die auf einer Seite von drei kurzen α-Helices flankiert werden. Ein β-Ribbon Motiv besitzt dabei eine hydrophobe, basische Oberfläche (Abb. 4 B). Diese ist sehr wahrscheinlich entscheidend für Interaktionen mit anderen RNAP Untereinheiten und eventuell mit Nukleinsäuren. Bei Interaktionsstudien mit Untereinheiten im *Pyrococcus*-System konnte eine starke Bindung von RpoH an RpoA'' (Goede *et al.*, 2006) nachgewiesen werden. Die *Sulfolobus* Struktur bestätigt dieses Ergebnis (Abb. 1). RpoH liegt an der Schnittstelle von A' und A'', und zeigt eine deutliche Assoziation mit A'' (Hirata *et al.*, 2008; Abb. 5 A).

Im Initiationskomplex wird RpoH an der Position +12 bis +20 des *GDH* Promotors detektiert (Bartlett *et al.*, 2004). Vergleichbare Untersuchungen an Elongationskomplexen weisen darüber hinaus auf eine Umlagerung von RpoH beim Übergang in die Elongationsphase hin. In diesen

Komplexen tritt RpoH dann in der Nähe des aktiven Zentrums auf (S. Grünberg, unveröffentlichte Daten).

Untersuchungen mit RNAP, die ohne RpoH rekonstituiert wurden (Δ H RNAP), zeigten eine drastische Reduzierung der Aktivität in unspezifischen Transkriptionstests auf 10 % der wt Aktivität (Werner und Weinzierl 2002). Positive Regulatoren wie Ptr2 und auch TFE können die Transkriptionsaktivität des Δ H Enzyms in einem vergleichbaren Umfang stimulieren wie das wt Enzym (Ouhammouch *et al.*, 2004).

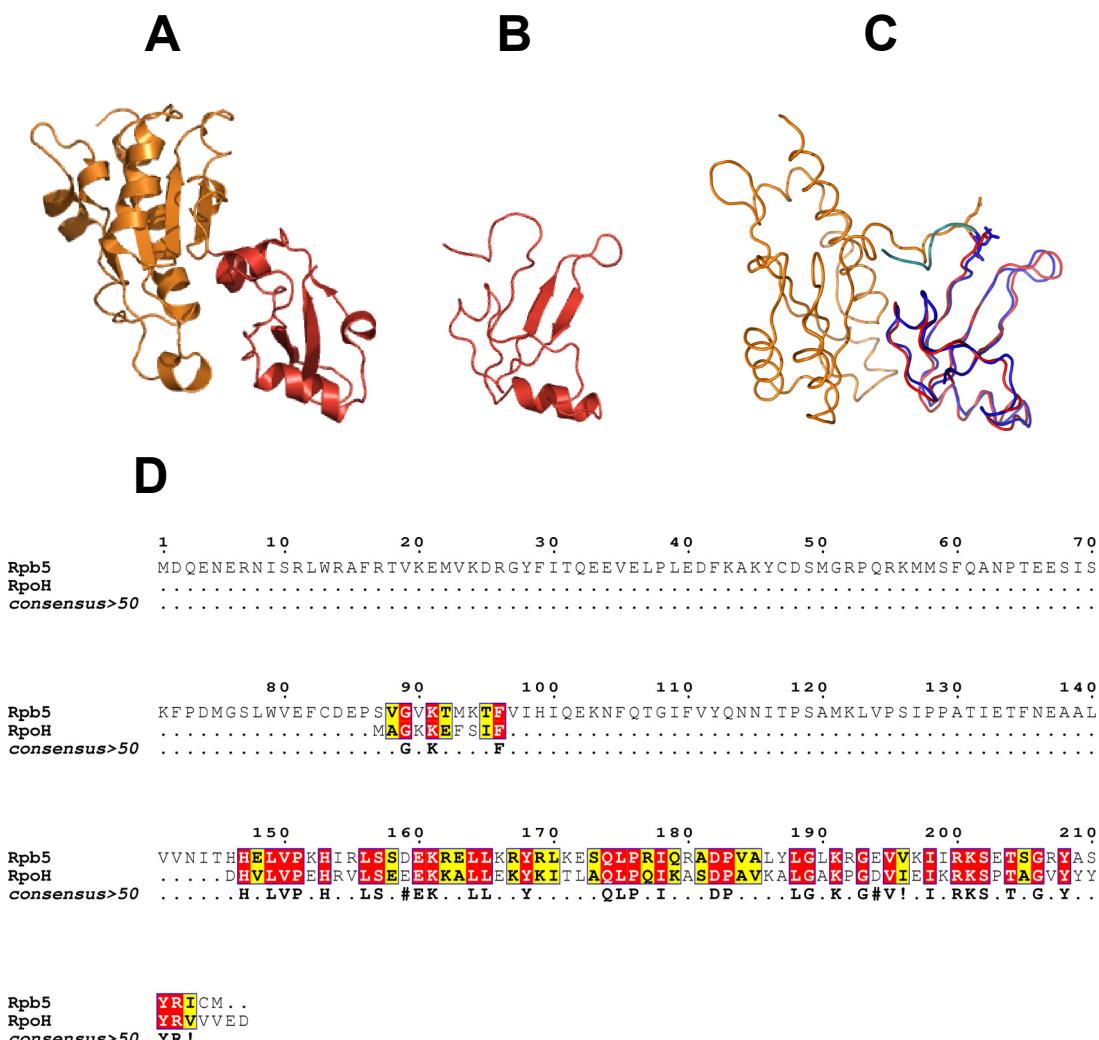


Abb. 4 Die C-terminale Domäne von Rpb5 und RpoH zeigen große Übereinstimmungen. A. Die Sekundärstruktur der eukaryotischen Untereinheit Rpb5 aus der RNAP II Kristallstruktur (Cramer *et al.*, 2001) ist dargestellt. Die N-terminale Domäne ist in orange, die C-terminale Domäne ist in rot eingefärbt. B. Die Sekundärstruktur der archaeellen Untereinheit RpoH (rot) aus der *Sulfolobus* RNAP-Struktur (Hirata *et al.*, 2008) ist dargestellt. C. Superpositionierung der Sekundärstrukturen von Rpb5 *S. cerevisiae* (N-terminale Domäne orange, C-terminale Domäne rot) und RpoH *S. solfataricus* (blau; 14 As am N-Terminus türkis) hergestellt mit der Dalilite Software, zur Verfügung gestellt von T. Seitz und B. Sommer. D. Alignment der Proteinsequenzen von Rpb5 aus *S. cerevisiae* und RpoH aus *P. furiosus*. Das Alignment wurde mit Hilfe von ClustalW Version 2.0 (Larkin *et al.*, 2007) erstellt. Für die Darstellung wurde die ESPript Software (Gouet *et al.*, 1999) verwendet. Die dargestellte Konsensussequenz wurde über eine Risler Matrix und einen Ähnlichkeitswert von 0,5 % berechnet (Großbuchstaben zeigen identische Aminosäuren, Kleinbuchstaben das Konsensusniveau an).

Die eukaryotische Untereinheit Rpb5, oder ABC27, hat eine Größe von 25 kDa und ist die größte gemeinsame Untereinheit der drei eukaryotischen RNAP. Das Protein unterteilt sich in eine konservierte C-terminale Domäne (ca. 9 kDa; As 143-215) und eine Eukaryoten-spezifische N-terminale Domäne (ca. 18 kDa; As 1-142). Mit Hilfe von Komplementierungsversuche in der Hefe konnte nachgewiesen werden, dass Rpb5 die einzige gemeinsame Untereinheit der drei RNAP ist, die nicht durch das menschliche Gegenstück ersetzt werden kann (Miyao und Woychik 1998). Der Austausch ist nur durch chimäre Untereinheiten möglich bei denen nahezu die gesamte N-terminale Domäne der Hefe erhalten bleibt. Die Expression von *RPB5* aus *S. pombe* führt hingegen zu normalem Wachstum der *S. cerevisiae* Nullmutante (Shpakovski *et al.*, 1999). Die Struktur der Untereinheit Rpb5 wurde aufgeklärt und zeigt eine mit der archaeellen Untereinheit RpoH vergleichbare C-terminalen Domäne (Todone *et al.*, 2000; Abb. 4 C). Der N-terminale Teil bildet die sogenannte Jaw Domäne, die das Ende des DNA Kanals im RNAP II Kristall markiert (Cramer *et al.*, 2001; Abb. 3 und 5). Kontakte im Enzym werden hauptsächlich über die C-terminale Domäne mit Rpb1 ausgebildet. Dies ist vergleichbar mit Kontakten von RpoH mit RpoA''.

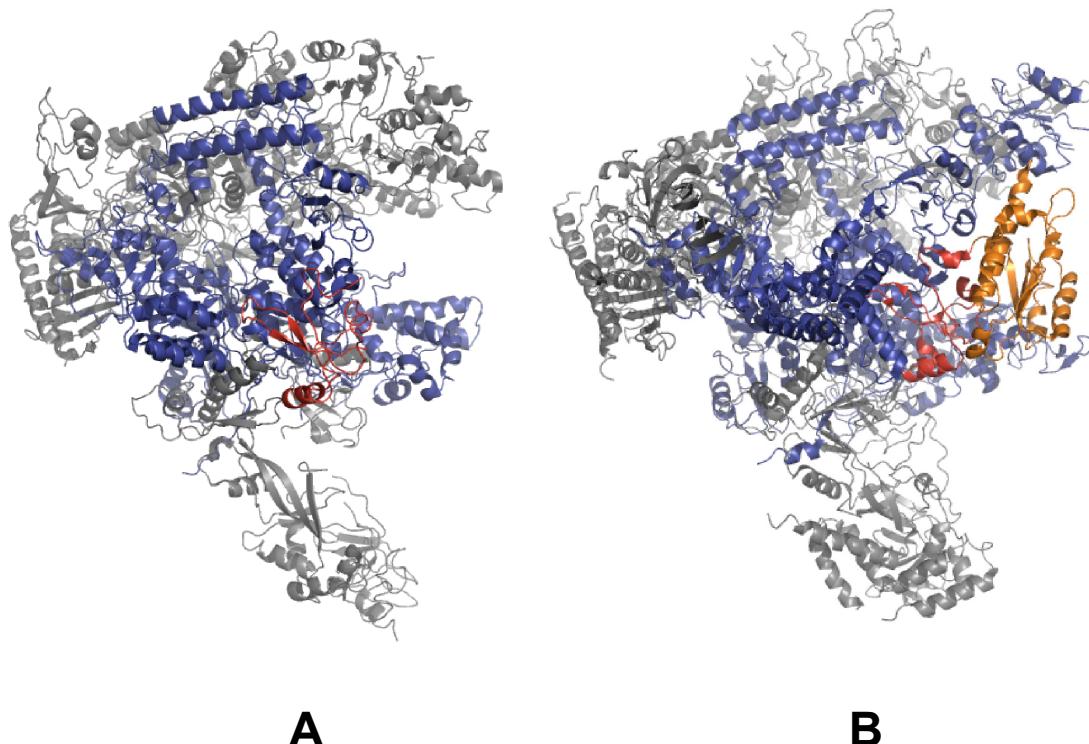


Abb. 5 Die RNAP Untereinheiten Rpb5 und RpoH im Enzymkomplex. *A.* Die Struktur der archaeellen RNAP aus *Sulfolobus solfataricus* mit einer Auflösung von 3,4 Å ist als Ribbon-Modell dargestellt (Hirata *et al.*, 2008; 2PMZ). RpoH ist in rot, RpoA' und RpoA'' in blau hervorgehoben. *B.* Die Struktur der elongierenden RNAP II aus *S. cerevisiae* mit einer Auflösung von 3,8 Å ist dargestellt (Kettenberger *et al.*, 2006; 1Y1V). Analog zu *A* sind Rpb5 (C-terminale Domäne in rot und N-terminale Domäne in orange) und Rpb1 hervorgehoben. Das Modell wurde mit Hilfe der PyMOL Software erstellt.

Die N-terminale Domäne ist wahrscheinlich für den DNA Kontakt von Rpb5, 15-20 nt stromabwärts des offenen Komplexes, verantwortlich (Kim *et al.*, 1997). In Two-Hybrid Analysen konnte nachgewiesen werden, dass Rpb5 neben Rpb1 auch mit Rpa190, dem Homolog

der Untereinheit Rpb1 in der Pol I, interagiert (Miyao *et al.*, 1998). Die Untereinheit Rpb5 liegt in der Peripherie der Polymerase und kann aufgrund ihrer exponierten Lage verschiedenste Kontakte ausbilden. Es konnte nachgewiesen werden, dass Rpb5 mit einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren interagiert, darunter der Faktor Rpa30 des TFIIF Komplexes (Wei *et al.*, 2001), das Hepatitis B Virus X Protein (Le *et al.*, 2005), TFIIB (Lin *et al.*, 1997) und TFIIE (Hayashi *et al.*, 2005). Rpb5 könnte damit eine Aufgabe in der Kommunikation zwischen dem RNAP Kern und einer Reihe von basalen und Gen-spezifischen Transkriptionsfaktoren spielen. Diese Annahme wird auch dadurch unterstützt, dass Rpb5 eine entscheidende Funktion bei der Aktivierung der Transkription an einigen Promotoren besitzt. Mutationen von Rpb5 zeigten hierbei vergleichbare Auswirkungen wie Mutationen der C-terminalen Domäne von Rpb1, die auf ähnliche Aufgaben in der Aktivierung der Transkription hindeuten könnten (Miyao und Woyschik 1998).

In detaillierten Mutationsanalysen von Rpb5 im Hefesystem von Zaros *et al.*, 2007, konnte nachgewiesen werden, dass im eukaryotischen Teil, die große N-terminale Helix sowie ein kurzes Motiv vor dem Übergang zur C-terminalen Domäne für die Funktion essentiell sind. Entscheidende Teile der konservierten C-terminale Domäne liegen an der Kontaktstelle zu Rpb1. Die Autoren vermuten dabei, dass die Hauptaufgabe dieser Interaktion in der korrekten Positionierung der Bridge Helix und des Switch 1 Loop im aktiven Zentrum liegt. Die Bridge Helix dirigiert den kodierenden Strang in das aktive Zentrum und sorgt für eine korrekte Positionierung des DNA-RNA Hybrids im aktiven Zentrum. Die Aminosäuresequenz der Bridge Helix ist in RNAP aus den drei Domänen des Lebens hochkonserviert und ist als kontinuierliche, leicht geknickte α -helicale Struktur beschrieben (Cramer *et al.*, 2001; Hirata *et al.*, 2008; Vassylyev *et al.*, 2007). Der Switch 1 Loop bindet ebenfalls den kodierenden Strang, allerdings am stromabwärts gelegenen Ende der Transkriptionsblase. Die konservierte Struktur ist nur in den eukaryotischen und archaeellen RNAP zu finden (Gnatt *et al.*, 2001).

Diese Funktion von Rpb5 im Polymerasekomplex scheint demnach zweigeteilt zu sein. Zum einen gibt es vor allem im für Eukaryoten spezifischen Teil Interaktion mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren, die eine indirekte Aufgabe in der komplexen Genregulation höherer Organismen vermuten lassen. Zum anderen scheint der konservierte C-terminale Teil eine strukturelle Aufgabe in der Positionierung und Stabilisierung entscheidender katalytischer Domänen im offenen Komplex zu haben. Aufgrund der großen Ähnlichkeit von C-terminaler Domäne und RpoH wäre eine vergleichbare Funktion für RpoH in der archaeellen Polymerase denkbar.

1.5. Die RNAP Untereinheiten RpoP und Rpb12

Die archaeelle Untereinheit RpoP ist mit 5,8 kDa die kleinste Untereinheit der RNAP und ist homolog zu der eukaryotischen Untereinheit Rpb12. Strukturell besitzt die Untereinheit eine konservierte C-terminale Domäne, die im Polymerasekomplex eine β -Faltblattstruktur ausbildet, welche im Komplex verankert ist. Das zweite Strukturmotiv der Untereinheit ist ein Zink-Ribbon in der N-terminalen Domäne, der sich an der Oberfläche des Gesamtkomplexes befindet (Abb. 6). Auch für diese Untereinheit werden, ähnlich wie für RpoH, hauptsächlich strukturelle Aufgaben vermutet (Hirata *et al.*, 2008). Interaktionsstudien mit der *Pyrococcus* Polymerase zeigten eine starke Bindung an RpoD (Goede *et al.*, 2006). Dies wurde auch im *Methanocaldococcus*-System

bestätigt und ist mit der Interaktion von Rpb3 und Rpb12 im Pol II System vergleichbar. Darüber hinaus gibt es die Vermutung, dass RpoP im Komplex mit RpoD-RpoL-RpoN als eine Art Plattform für die Rekrutierung der großen katalytischen Untereinheiten dient (Werner *et al.*, 2000). In der *Sulfolobus* Struktur liegt RpoP an der Schnittstelle der Untereinheiten RpoD und RpoB und soll dort eine stabilisierende Funktion ausüben (Hirata *et al.*, 2008; Abb. 6). In Untersuchungen der archaeellen RNAP, die in Abwesenheit von RpoP rekonstituiert wurde (ΔP RNAP), konnte in unspezifischen Tests eine drastische Reduktion der transkriptionellen Aktivität nachgewiesen werden. Die restlichen Untereinheiten des Enzyms scheinen in Abwesenheit von RpoP korrekt assembliert zu werden (Werner und Weinzierl 2002).

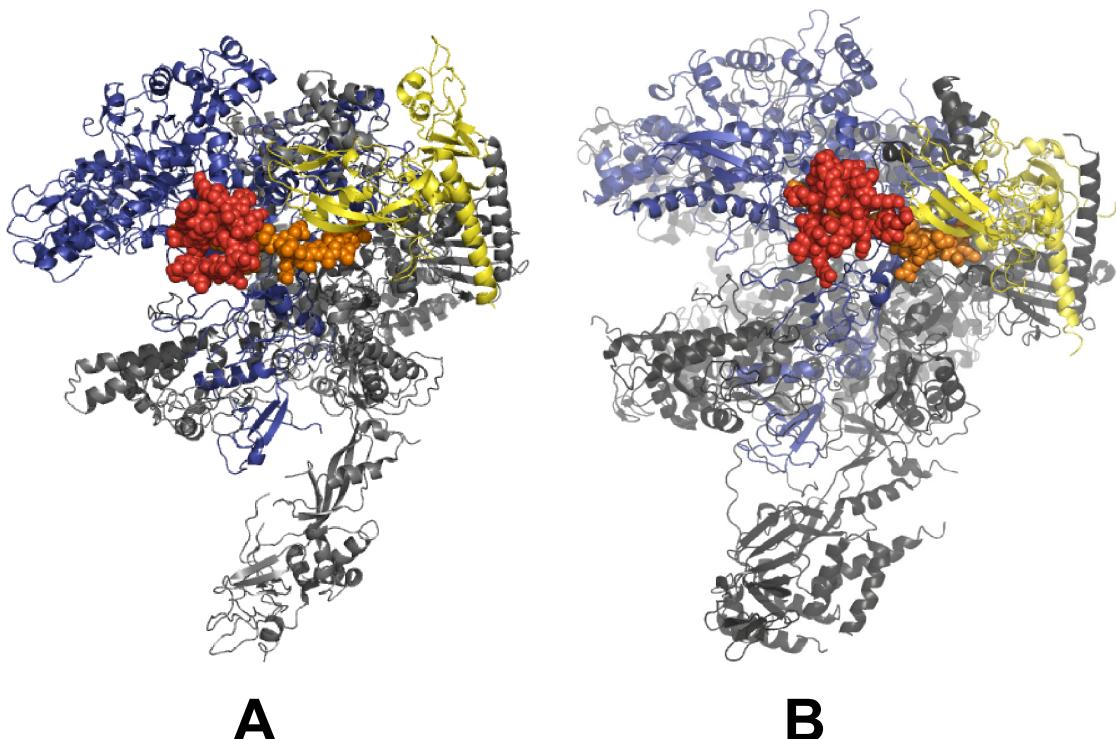


Abb. 6 Die RNAP Untereinheiten Rpb12 und RpoP im Enzymkomplex. A. Die Struktur der archaeellen RNAP aus *Sulfolobus solfataricus* mit einer Auflösung von 3,4 Å ist dargestellt (Hirata *et al.*, 2008; 2PMZ). RpoP ist als Kalottenmodell hervorgehoben (N-terminaler Bereich in rot, die C-terminale Domäne in orange) der Rest des Enzyms ist als Ribbon-Modell dargestellt. RpoD ist in gelb und RpoB in blau hervorgehoben. B. Die Struktur der elongierenden RNAP II aus *S. cerevisiae* mit einer Auflösung von 3,8 Å ist dargestellt (Kettenberger *et al.*, 2006; 1Y1V). Analog zu A sind Rpb12, Rpb3 und Rpb2 hervorgehoben. Das Modell wurde mit Hilfe der PyMOL Software erstellt.

Rpb12 ist mit 7,7 kDa die kleinste gemeinsame Untereinheit der drei eukaryotischen RNAP (Carles *et al.*, 1991). Im Vergleich zu RpoP besitzt Rpb12, genauso wie Rpb5, eine zusätzliche N-terminale Domäne von ca. 2 kDa. Die Bezeichnung ABC10 α ist für diese Untereinheit ebenfalls gebräuchlich. Die Strukturmotive sind vergleichbar mit RpoP ein β -Faltblatt in der C-terminalen Domäne und ein Zink-Ribbon im N-terminalen Bereich. Die Untereinheit ist essentiell und das kodierende Gen *RPB12/RPC10* aus *S. cerevisiae* kann dort durch die Expression der Gene der homologen Untereinheiten aus *S. pombe* und *H. sapiens* ersetzt werden (Treich *et al.*, 1992; Shapakovski *et al.*, 1995). In der Kristallstruktur der Pol II interagiert Rpb12 mit der Rpb2 und Rpb3 (Cramer *et al.*, 2001; Abb. 6). In Two-Hybrid Analysen konnte

nachgewiesen werden, dass die Untereinheit mit der C-terminalen Domäne der zweitgrößten Untereinheit der Pol I (Rpa135) interagiert (Rubbi *et al.*, 1999). Damit diese Interaktion zustande kommen kann, muss das in den Untereinheiten der Archaea und Eukarya konservierte Zink-Ribbon Motiv (CX₂C...CX₂C) intakt sein. Mutationsanalysen haben gezeigt, dass im CX₂C...CX₂C Motiv lediglich das erste Cystein essentiell ist und das Mutationen der drei weiteren Cysteine zu temperatursensitiven Phänotypen führt (Rubbi *et al.*, 1999). Eine Mutation im dritten Cystein wurde dabei auf transkriptioneller Ebene untersucht und zeigte einen negativen Effekt auf alle drei RNAP bei 37 °C *in vivo*. Worauf dieser transkriptionelle Defekt beruht, konnte nicht nachgewiesen werden. Die Untereinheit könnte darüber hinaus ein limitierender Faktor bei der Assemblierung der Polymerasen sein, da die Halbierung der Gendosis von *RPB12* zu einem verlangsamten Wachstum führt (Rubbi *et al.*, 1999). In der Pol III spezifischen Transkription konnte eine Interaktion der C-terminalen Domäne von Rpb12 mit TFIIIC gezeigt werden, was auf einen direkten Kontakt der Pol III mit diesem Transkriptionsfaktor schließen lässt (Dumay *et al.*, 1999).

2. Ziel der Arbeit

Das archaeelle Transkriptionssystem gilt als eine vereinfachte Version der eukaryotischen Pol II Transkriptionsmaschinerie. Es sollte deshalb untersucht werden, ob die Übereinstimmung des basalen archaeellen und des komplexeren eukaryotischen Systems soweit geht, dass Untereinheiten zwischen den RNA Polymerasen ausgetauscht werden können. Zu diesem Zweck wurde zum einen das etablierte genetische System der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* genutzt. In Komplementierungsversuchen wurde dabei untersucht, ob die essentiellen eukaryotischen Untereinheiten durch archaeelle Untereinheiten aus *Pyrococcus furiosus* *in vivo* ersetzt werden können. Zum anderen wurden Hefe Untereinheiten mit Hilfe der rekonstituierten *Pyrococcus* RNAP *in vitro* auf Funktionalität im archaeellen System getestet. In erster Linie standen dabei die kleinen Untereinheiten im Mittelpunkt der Untersuchungen, über deren Funktion nur wenig bekannt ist. Von besonderem Interesse waren dabei die Untereinheiten RpoP/Rpb12 sowie RpoH/Rpb5. Rpb12 und Rpb5 sind gemeinsame, essentielle Untereinheiten der drei eukaryotischen RNAP und besitzen im Vergleich zu ihren homologen archaeellen Untereinheiten zusätzliche N-terminale Domänen. Rpb5 zeigt einen zweigeteilten Aufbau und soll sowohl Aufgaben in der Genregulation als auch strukturelle Funktionen wahrnehmen. Über die Funktion von Rpb12 ist bisher wenig bekannt. Es wird vermutet, dass das Protein stabilisierend auf die großen Untereinheiten wirkt. Versuche mit archaeellen RNAP denen entweder RpoP (ΔP) oder RpoH (ΔH) fehlte zeigten schwere transkriptionelle Defekte auf (Werner und Weinzierl 2002; Naji *et al.*, 2007). Diese Erkenntnisse wurden aus unspezifischen Tests gewonnen, die keinen Hinweis auf die genaue Ursache dieser Defekte liefern konnten. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte deshalb, durch eine detaillierte Charakterisierung der Δ -Polymerasen, versucht werden die essentiellen Funktionen von RpoH und RpoP im Enzym aufzudecken. Eine solche ausführliche Untersuchung ist bisher nur im archaeellen System möglich und lässt, aufgrund der großen Übereinstimmung zum eukaryotischen Transkriptionssystem, auch Rückschlüsse auf die Funktion der entsprechenden eukaryotischen Untereinheiten zu.

Material und Methoden

1. Material

1. 1. Bezugsquellen von Proteinen und Chemikalien

1.1. 1. Chemikalien

Agarose Serva, Heidelberg

Ampicillin Roth, Karlsruhe

APS Merck, Darmstadt

Bacto Agar Difco, Detroit (USA)

Bacto Hefeextrakt Difco, Detroit (USA)

Bacto Pepton Difco, Detroit (USA)

Bacto Trypton Difco, Detroit (USA)

Bromphenolblau Serva, Heidelberg

BSA Fraktion V Sigma-Aldrich, Seelze

Chloroform/Isoamylalkohol Roth, Karlsruhe

CSM –His –Leu –Trp MP Biomedicals, Illkirch (Frankreich)

DEPC Sigma-Aldrich, Seelze

dNTPs MP Biomedicals, Illkirch (Frankreich)

EDTA Serva, Heidelberg

Ethanol Mallinckrodt Baker, Griesheim

Ethidiumbromid Serva, Heidelberg

Ficoll Sigma-Aldrich, Seelze

5-Fluoroorotic Acid Monohydrat (FOA) Toronto Research Chemicals, Kanada

Formaldehydlösung (37 %) Merck, Darmstadt

Formamid Sigma-Aldrich, Seelze

Galactose Roth, Karlsruhe

Genomische Hefe DNA Novagen, Madison (USA)

Glukose Merck, Darmstadt

Glykogen Ambion, St. Austin (USA)

Glycerol Sigma-Aldrich, Seelze

GpU/GpC Sigma-Aldrich, Seelze

Histidin Sigma-Aldrich, Seelze

Isotope [$(\gamma^{32}\text{P})\text{ATP}$]; [$(\alpha^{32}\text{P})\text{UTP}$]; [$(\alpha^{32}\text{P})\text{GTP}$] Hartmann Analytik, Braunschweig

Lauroylsarcosin Sigma-Aldrich, Seelze

Leucin Sigma-Aldrich, Seelze

Lithiumactetat Sigma-Aldrich, Seelze

Magnesiumchlorid Merck, Darmstadt

Maleinsäure Merck, Darmstadt

MOPS Sigma-Aldrich, Seelze

Natriumacetat Merck, Darmstadt
Natriumcitrat Trihydrat Merck, Darmstadt
Natriumchlorid Merck, Darmstadt
NaOH Merck, Darmstadt
Nylonmembran Roche, Mannheim
PEG Sigma-Aldrich, Seelze
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Roth, Karlsruhe
Polyvinylpyrrolidone Sigma-Aldrich, Seelze
Primer Eurogentec, Seraing (Belgien)
RnaseZap Ambion, St. Austin (USA)
Salmon Sperm DNA Eppendorf, Hamburg
SDS Serva, Heidelberg
TEMED Roth, Karlsruhe
Tris USB, Cleveland (USA)
Tryptophan Sigma-Aldrich, Seelze
Whatman-Papier 3MM, Maidstone (GB)
Xylencyanol Sigma-Aldrich, Seelze
YNB (+ Ammoniumsulfat) MP Biomedicals, Illkirch (Frankreich)

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

1.1.2. Enzyme, Standards, Kits

Antarctic Phosphatase New England Biolabs, Ipswich (USA)
BamHI New England Biolabs, Ipswich (USA)
EcoRI New England Biolabs, Ipswich (USA)
Phusion High Fidelity DNA-Polymerase New England Biolabs, Ipswich (USA)
PstI New England Biolabs, Ipswich (USA)
SmaI New England Biolabs, Ipswich (USA)
Taq-DNA-Polymerase New England Biolabs, Ipswich (USA)
T4-Polynukleotidkinase New England Biolabs, Ipswich (USA)
T4-DNA-Polymerase New England Biolabs, Ipswich (USA)
GeneRulerTM1kb DNA Ladder Fermentas, St. Leon-Rot
6x Loading Dye Fermentas, St. Leon-Rot
RiboRuler RNA Ladder Fermentas, St. Leon-Rot
Micro-Bio-Spin 6 Chromatography Columns Bio-Rad, München
Micro Elute Gel Extraction Kit VWR, Darmstadt
QIAquick Nucleotide Removal Kit Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit Qiagen, Hilden
QIAquick Spin Miniprep Kit Qiagen, Hilden
Quick Ligation Kit New England Biolabs, Ipswich

1.2. Bakterien- und Hefestämme

S. cerevisiae Shuffle Stämme:

YGVS015 MAT α his3-Δ200 leu2-3,112 lys2-Δ201 ade2-1 ura3-52 rpb10-Δ1::HIS3 (pGVS102: 2μ URA3 RPB10 [Sc10b]) (Shpakovski *et al.*, 1995)

DLY200 MAT α ura3-52 hisΔ200 trp1Δ lys2-801 ade2-101 rpc19::HIS3 pLS135 (Ura3, CEN4, ARS1, RPC19) (Lalo *et al.*, 1993)

JAY444 MAT α CAN1-100 his3-11, 15 leu2-3,112 trip1-1 ura3-1 ade2-1 rpb6::LEU2 (pRPO26 = Rpb6 CEN URA3) (Archambault *et al.*, 1990)

YFN2 MAT α ade2-101 lys2-801 ura3-52 trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1 rpb5::URA3::LEU2 //pPL44-Rpb5 (Navarro und Thuriaux 2000) zusätzlich wurde der Leucin Marker durch eine Kanamycinresistenz ersetzt (Marker swap, Voth *et al.*, 2003)

YGVS019 (MAT α his3-Δ200 lys2-801 trp1-Δ1 ura3-52 ade2-1 rpc10-Δ::HIS3 (pFL44-RPC10: 2 mm URA3 RPC10 [Sc10a]) (Shpakovski *et al.*, 1995)

YGVS072 MAT α , ade2-101, his3-Δ,Δ-leu2-3,112, lys2-Δ, trp1-Δ, ura3-52, rpb11-Δ::HIS3, (pRP11/8 = URA3, ARS1, CEN4, RPB11) (Grandemange *et al.*, 2001)

Escherichia coli DH5 α (Bethesda Research Laboratories; Taylor *et al.*, 1993)

Escherichia coli, BL21-Codon Plus (DE3)-RIL (Stratagene, La Jolla USA)

Escherichia coli, Tuner (Novagen)

1.3. Plasmide

pRS314 (Sikorski *et al.*, 1989)

YCplac22, YEplac191, YEplac112 (Gietz und Sugino 1988)

pRS423 (Christianson *et al.*, 1992)

petblue1, pET17b (Novagen)

K520 YEplac195-pRPS28 (Ferreira-Cerca *et al.*, 2007)

M2926 (Voth *et al.*, 2003)

Shuffle-Plasmide mit *Pyrococcus furiosus* Untereinheiten:

pRS314-Promotor Rpb12-RpoP-Terminator Rpb12

pRS314-Promotor Rpb12-RpoP (*Methanosarcina*)-Terminator Rpb12

pRS314-Promotor Rpb11-RpoL-Terminator Rpb11

pRS314-Promotor Rpb10-RpoN-Terminator Rpb10

pRS314-Promotor Rpb6-RpoK-Terminator Rpb6

pRS314-Promotor Rpc19-RpoL-Terminator Rpc19

pRS314-Promotor Rpb5-RpoH-Terminator Rpb5

pRS314-Promotor Rpb5-N-terminale Domäne Rpb5-RpoH-Terminator Rpb5

C1 Ycplac22-RpoP *RPS28B* Promotor

C2 Ycplac22-N-terminale Domäne Rpb12-*RPS28B* Promotor

C3 Ycplac22-N-terminale Domäne Rpb12-RpoP *RPS28B* Promotor

C4 Ycplac22-Rpb12-*RPS28B* Promotor

Ycplac22- *RPS28B* Promotor-N-terminale Domäne Rpb5-RpoH

Ycplac22- *RPS28B* Promotor- HisTag-N-terminale Domäne Rpb5-RpoH

Ycplac22- *RPS28B* Promotor –HisTag-RpoH

pRS423-N5-H konstitutiver Promotor (Diplomarbeit Bettina Bauer)

YCplac22-RPB5 Galactose Promotor (Diplomarbeit Bettina Bauer)

Expressionsplasmide:

pET Blue-Rpb5

pET17b-Rpb12

pET17b-RpoP (Dissertation B. Goede)

pET17b-RpoP(R26)

pET17b-RpoP(S32)

pET17b-RpoP(C27/30S)

Weitere Plasmide:

pNoy Helper Plasmid (Nogi *et al.*, 1991)

Tap-Tag Plasmid für C-terminale Klonierung (Puig *et al.*, 2001)

1.4. Oligonukleotide

prom12f 5' ATTGACATTGTCTCATGACCACGACATT 3'

prom12r 5' CATTGTTATACTTGTGGACTTTATTCTTG 3'

rpoPf 5' TCCACAAGTATAACAATGGTTGAGGCCGTGTAT 3'

rpoPr 5' AATGGCCTTACCCCTCTTGAACCTGGGTCT 3'

ter12r 5' CACCTTTTCATTAATATAATCTCTAAGTGAT 3'

ter12f 5' AGGGTAAAGGCCATTGAATGGAGAGACTGAAA 3'

rpb12 F NTerm BamHI 5' GGATCCATGTCTCGCGAAGGGTTCC 3'

revN-term Rpb12 überlap. P ab Y6 5' CTAAAACATCTATACTTCAAAGTTGCCGTTCTAG 3'

rpoP F Y(6) Start 5' GAAGTATAGATGTTAACGTGTGGTAG 3'

rpoP R PstI 5' CTGCAGTCAAATGGCCTTACCCCTTCTTG 3'

ded1 F 5'TAACAAACAACGGCGGCTACA 3'

ded1 R 5'CCATCAAATCTGCCGTTG 3'

rps6BF 5'ATGAAGGTATGTAATATCACCC 3'

rps6BR 5'TTAAGCCTCAAAGAAGAAGC 3'

rpoPC27/30F 5' CAAGGGATCTCGTTCTCCATATTCTGGTAGCAAGATTCTATAC 3'

rpoPC27/30R 5' GTATAGAACATCTGCTACCAGAACATGGAGAACGGAGATCCCTTG 3'

rpoPR26F 5' CCATAACAAGGGATCTCGTTGTCATATTGTGGTAGCAAG 3'

rpoPR26R 5' CTTGCTACCACAATATGGACAAGCGAGATCCCTGTTATGG 3'

rpoPS32F 5' CTCCGTTGTCATATTGTGGGCCAAGATTCTATACAAGCC 3'

rpoPS32R 5' GGCTTGATAGAACATTGGCACCAATATGGACAACGGAG 3'

his+RpoHF 5'ATGCATCATCATCATCATCACAATATTACTCACCACGAAAGCATATTGATCATGTGTTAG 3'

prom5R+His 5'GTGATGATGATGATGATGATGCATTGTCTTAGCTTATTAGTAATATC 3'

prom5F(neu) 5' AATGTATTGTTGTCCTC 3'

hybrid rpoH R 5'CAAATCTGCAGCTAGTCTCAAACAC 3'

hf 5' AATATTACTCACCAAGAA AGCATATTGATCATGTGTTAG 3'

ec-NT (C-Matrise) 5'TAAGTACTTGAGCTTGGCTGCTGTAATGGATCTCCATATGGGGAGGTAAGGGTGG 3'

ec-T (C-Matrise)

5'CCACCCCTACCTCCACCATATGGGAGATCCATTACAGCAGCCAAGCTCAAGTACTTACGCCGGTCATTACTAGTACTGCCGG 3'

up Rpb3 Tap 5'GCATCTCAAATGGTAATACTGGATCAGGAGGGTATGATAATGCTGGTCCATGGAAAAGAGAAG 3'

down Rpb3 neu Tap 5'TTCGGTTCGITCACTTGTGTTTTCTATTACGCCACTTGAGAATACGACTCACTATAGGG 3'

Material und Methoden

ycplac F Hind 5' AAGCTTGCATGCCTGCAG 3'
ycplac R Nar 5' CGCATCAGGCGCCATT 3'
promKFeco 5' GAATTGCTTATTGATGTTC 3'
promKHis 5' ATGATGATGATGATGCATTGATCCGGTACCAAG 3'
pETBlue down 5' GTTAAATTGCTAACGCAGTC 3'
pET Blue up 5' TCACGACGTTGAAAACGAC 3'
prom5f 5' AATGTATTGTTGTCCTC 3'
prom5r 5' CATTGTCTTAGCTTATTAG 3'
rpoHf 5' TAATAAGCTAACACAATGGCGGGAAAAAGGAA 3'
rpoHr 5' GTCTTCAACAAACACCC 3'
ter5r 5' GATATGTCATGGTGAAG 3'
ter5f 5' GTTGGTGTGAAGACTAGAGTGGCATTGGATT 3'
nRPB5r 5' TTCGTGGTGAGTAATATTAAC 3'
nrom5F EcoRI 5' GAATTCAATGTATTGTTGTCCTC 3'
rPB5F BamHI 5' GGATCCATGGACCAAGAAAATGAAAG 3'
rPB5R PST I 5' CTGCAGCTACATACAGATTCTGTAAC 3'
5F exp Nde1 5' CTAAGACATATGGACCAAG 3'
5R exp BamHI 5' ATGGATCCCTACATACATTC 3'
nRPB5-H F 5' AGCTGGATCCATGGACCAAGAAAATG 3'
hybrid rpoH R 5' CAAATCTGCAGCTAGTCTTCAACAAAC 3'
his+RPB5F 5' ATGCATCATCATCATCATCACGACCAAGAAAATGAAAGAAC 3'
prom5R+His 5' GTGATGATGATGATGATGATGCATTGCTTAGCTTATTAGTAATATC 3'
prom5F(neu) 5' AATGTATTGTTGTCCTC 3'
rPB3F 5' ATATTGACATATGAGTGAAGAAGGTCC 3'
rPB3R 5' CTTGGATCCTACCAAGCATTATCATACC 3'
rPB11ExpF 5' ACTGCCATATGAATGCTCCAGACAG 3'
rPB11ExpR 5' CCGGATCCTAAATGCGTCGTCGGC 3'
rPB6fexp 5' ACAAGTGCATATGTCAGACTACGAGGAG 3'
rPB6rexp 5' GGAATTCTCACAAATCCACAATGAG 3'
prom11f 5' GTAAGCCTCGTCGGTAG 3'
prom11r 5' CATGATGCAGTTGTC 3'
rpoLf-11 5' GGACACAACATGCATCATGAAGATAGAAGTGATAAG 3'
rpoL-11r 5' TCAGCTCTCACCGCC 3'
ter11r 5' GACTCGATCATATAAGAAAAG 3'
ter11f 5' AAGGCGGTGAAGAGCTGATATAGGAGTTAATACTATAG 3'
rpb2 S3 5' GAACTTATGGCTATGAACATTACACCACGTTATATACCGATCGTCGAGAGATTTCGTACGCTGCAGGTCGAC 3'
rpb2 S2 5' CAGCACAAATGAAATGTTTTATTATTTACTTCTAGAGTTACAACATTATTCATCGATGAATTGAGCTCG 3'
12F exp 5' AAGTATACATATGTCGCGAAGG 3'
12R exp 5' CGAATTCATCTAGCTTCAAATTG 3'
10F exp 5' ATAATACCATATGATTGTCGG 3'
10R exp 5' GGAATTCTTAATCTTTCTAATGGG 3'
cterm5F exp 5' CTGCCTTACATATGAATATTACTCACC 3'
cterm5R exp 5' TGAATTCTACATACAGATTCTGTAAC 3'
prom6f 5' TTCATTATTTAGAACCTC 3'
prom6r 5' CATGATCACTGTAGCC 3'
rpoKf 5' AGGCTACAAGTGATCATGTTCAAGTACGAGG 3'
rpoKr 5' TCAGCTCGGTCTAGTTAC 3'

ter6r 5' CAATCACCGATTAAATATTC 3'
ter6f 5' GTAATCAGACCGAGCTGATTACACCTGCATTTTC 3'
rpoKf2 5' AAGATTTCACACAGCA ATGTTCAAGTATACGAGG 3'
nRPB6r 5' TGCTGTTGAAAATCTTCTG 3'
prom10f 5' TTCATATTCTTGAGGTTTAAGCCAAAA 3'
prom10r 5' CATTGTATTATTATTTGCTTATTGAGG 3'
rpoNf 5' AAATAATAATACAAATGGGGCAAGTCCCGTG 3'
rpoNr 5' ATACACTCTGTAATGCATTATGTCATCAATTAG 3'
ter10r 5' AGATATATATATATTATTTCTATTATTTGGA 3'
ter10f 5' CATTACAGAGTGTATTAAGTGTTCCTCAATATG 3'
ter10rex 5' CTTTCATTGCGAGTTTTC 3'
prom10fex 5' ATTCAATCTTGGTTTCAAG 3'
prom19f 5' TACCAACAACGTGATAAACCTTGTCTAAT 3'
prom19r 5' CATTGCCTGGTACTTATG TGAAGTTCAA 3'
rpoLf 5' TAAAGTACCAGGCAAATGAAGATAGAAGTGATAAAG 3'
rpoLr 5' CTAGCTCTCACCGCCTTC TCCCAGCCTCTAA 3'
ter19r 5' ATTTTCAATCATTCAATACG GAATACGCC 3'
ter19f C-Terminus RPB5 forward 5' ACTCACCAACGAATTGGTTC 3'
pRS314 forward 5' GCCGCTCTAGAACTAGTGGATC 3'
pRS314 reversed 5' CTTGATATCGAATTCCCTGCAG 3'
s3 RPA190 5'TGAACAATGTTGGTACGGGTTCATTTGATGTGTTAGCAAAGGTTCAAATGCGGCTCGTACGCTGCAGGTCGAC 3'
s2 RPA190 5'CTCCTTCAAATAAACTAATATTAAATCGTAATAATTATGGGACCTTGCCTGCTTATCGATGAATTGAGCTCG 3'
c-Terminus RPB5F BamH1 5' GGATCCATGACTCACCAACGAATTGGTTC 3'
c-Terminus RPB5 Promotor R BamH1 5' GGATCCTGTCTTAGCTTATTAGTAATATC 3'

2. Methoden

Alle gängigen molekularbiologischen und biochemischen Methoden, auf die nicht näher eingegangen wird, wurden nach Standardprotokollen (Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel *et al.*; Molecular Cloning Sambrook und Russel 2001) durchgeführt.

2.1. *In vitro* Transkription

A. Promotor-abhängige Run-off *in vitro* Transkription

Standard Run-off Transkriptionsreaktionen, beinhalten 100 ng des *GDH* Promotors (250bp), 25 nM RNAP, 50 nM TFB und 60 nM TBP in einem Gesamtvolumen von 25 µl. Es wurde für Transkriptionen mit archaeeller RNAP ein Transkriptionspuffer mit 40 mM NaHEPES, pH 7,3, 250 mM NaCl, 2,5 mM MgCl₂, 5 % (v/v) Glycerol, 0,1 mM EDTA, 5 mM β-Mercaptoethanol und 0,1 mg/ml bovinem Serumalbumin verwendet. Für die RNAP II aus *S. cerevisiae* wurde eine Transkriptionspuffer bestehend aus 1 mM Kaliumacetat pH 7,6, 20 mM NaHEPES pH 7,6, 1 mM EDTA, 5 mM Magnesiumacetat, 2,5 mM DTT, 2,5 % Glycerol (v/v), 7,7 µg/µl Phospho Kreatin, 1 Unit Kreatin Phospho Kinase und 2 Units RNase Inhibitor verwendet. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei 30 °C, darüber hinaus wurde die RNAP II wie die archaeelle RNAP behandelt. ATP, GTP und CTP wurden in einer Konzentration von 40 µM sowie UTP in 2 µM eingesetzt. Pro Reaktion wurden 0,15 MBq (110 TBq/mmol) radioaktiv markiertes [α -³²P] UTP verwendet. Die Komponenten sowie einzelne RNAP Untereinheiten wurden bei 4 °C vereinigt und

anschließend wurde die archaeelle RNAP für 30 Minuten bei 70 °C inkubiert. Die RNA wurde über Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt. Das Pellet wurde gewaschen und die RNA in Wasser gelöst. Die Probe wurde anschließend mit Formamidaufragspuffer versetzt und 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die markierte RNA wurde elektrophoretisch in 6 % (w/v) Polyacrylamid-Harnstoffgelen aufgetrennt. Die Transkripte wurden über die Belichtung von Imaging Plates und mit Hilfe eines Phosphoimagers (FLA-5000, Fuji, Japan) ausgewertet.

B. Single Round Transkription

Imobilisierte ternäre Komplexe wurden bei Position +20 relativ zum Transkriptionsstart gestellt und isoliert (Spitalny *et al.*, 2003). Die Komplexe wurden mit 1x Transkriptionspuffer versetzt und mit 0,1 % N-Lauroylsarcosin (NLS) gewaschen, um freie RNAP und Transkriptionsfaktoren von der Promotor DNA zu entfernen. Die isolierten Komplexe wurden in Transkriptionspuffer resuspendiert. Durch Zugabe aller vier Nukleotide (je 40 µM) aber ohne zusätzliche Radioaktivität wurden dann für 1-3 Minuten bei 70 °C die Transkripte bis zum Run-off verlängert. Die Reaktion wurde mit Hilfe einer Phenol/Chloroform Extraktion gestoppt.

C. Abortive *in vitro* Transkription an einer geschlossenen Matrize

Diese Transkriptionsreaktion wurde ähnlich wie die Standard Run-off Transkription durchgeführt (A). Als Matrize wurde allerdings die –C/+20 Kassette des *GDH* Promotors nach Spitalny *et al.*, 2003 verwendet. Die Reaktion wird durch das vorliegende Dinukleotid (GpU) gestartet und durch Zugabe von 3,3 pmol radioaktiv markiertem UTP entsteht ein 3 nt Transkript. Die Transkription wird für 7 Minuten bei 70 °C durchgeführt. Die 3 nt RNA wurde auf einem 28 %igen (w/v) Polyacrylamid-Harnstoffgel analysiert.

D. Abortive *in vitro* Transkription an einer vorgeformten Transkriptionsblase

In einigen Transkriptionsversuchen wurden Matrizen verwendet, die einen offenen Komplex simulieren (Schema Abb. 13 A). Diese Reaktionen wurden mit dem Dinukleotid GpC (40 µM) gestartet und die Markierung erfolgte über den Einbau von 3,3 pmol radioaktiv markierten GTP. Die Reaktion wurde in Anwesenheit von Transkriptionsfaktoren 7 Minuten bei 70 °C durchgeführt. Das 4 nt RNA Transkript wurde auf einem denaturierenden 24 %igen (w/v) Polyacrylamidgel analysiert.

E. Transkription auf einer Elongationsmatrize

In diesen Ansätzen wurde in isolierter Form der Elongationsschritt im Transkriptionszyklus untersucht. Die RNAP muss hier lediglich eine vorgegebene RNA verlängern und dabei den nichtkodierenden Strang verdrängen. Die Reaktion wurde mit denselben Salz- und NTP Konzentrationen wie in der Standard *in vitro* Transkription (A) aber ohne Transkriptionsfaktoren durchgeführt. Die Matrize (Schema Abb. 13 B) wurde nach Kireeva *et al.*, 2000 zusammengesetzt. RNAP Untereinheiten wurden in einer Endkonzentration von 70 nM zugegeben und die Komponenten wurden bei 4 °C vereinigt. In einem ersten Schritt wurde die 13 nt RNA an dem kodierenden Strang (83 nt) hybridisiert. Beide Komponenten wurden dazu für 3 Minuten auf 95 °C erhitzt und anschließend im Heizblock übernacht auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach der Inkubation dieses Hybrids mit der RNAP für 5 Minuten bei 25 °C wurde der

komplementäre nichtkodierende Strang zugegeben und der Ansatz wurde für weitere 5 Minuten bei 25 °C inkubiert. Die Menge an Matrize betrug 10 pmol. Nun erfolgte eine Transkriptionsreaktion bei 70 °C für 30 Minuten und die RNA wurde auf einem 24 %igen (w/v) Polyacrylamid-Harnstoffgel analysiert.

2.2. Electrophoretic mobility shift assay

Mit diesem Ansatz wurde untersucht, ob die ΔPolymerasen in Abhängigkeit von Transkriptionsfaktoren an die Promotor DNA rekrutiert werden können. Hierzu wurden DNA Fragmente der *GDH* Promotorregion von -60 bis +37 verwendet (Goede *et al.*, 2006). Die Reaktion enthielt 63 nM rekonstituierte RNAP, 126 nM TBP, 106 nM TFB, 50 nM *GDH* Promotor und als unspezifische Kompeditor DNA 1 µg poly[d(I-C)]. Protein-DNA Komplexe wurden in 25 µl Gesamtvolumen assembliert. Die Reaktion wurde in 40 mM Na-HEPES pH 7,3, 250 mM NaCl, 25 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 5 mM β-Mercaptoethanol, 5 % (v/v) Glycerol und 0,1 µg/ml bovinem Serumalbumin durchgeführt. Die DNA wurde für 5 Minuten bei 70 °C mit den Transkriptionsfaktoren vorinkubiert. Dann wurde die RNAP zugegeben und die Reaktion wurde auf 37 °C abgekühlt, anschließend wurde die Kompeditor DNA zugegeben und für 10 Minuten bei 37 °C weiterinkubiert. Die DNA-Protein Komplexe wurden anschließend auf einem 5 %igen nativen Polyacrylamidgel analysiert (1x TBE, 4 % Glycerol, 40 mM β-Mercaptoethanol). Nach einer Elektrophorese bei 160 V (ca. 30 °C) wurden die Komplexe über Imaging Plates ausgewertet.

2.3. Kaliumpermanganat Footprinting

In diesen Versuchen wurde die Fähigkeit der RNAP untersucht, nach der Rekrutierung an die Promotor DNA, einen offenen Komplex zu bilden. Die Thymine im offenen Komplex wurde über Behandlung mit KMNO₄ nachgewiesen (Grünberg *et al.*, 2007). Die Footprintreaktion wurde mit 70 nM RNAP rekonstituierter RNAP, 500 nM TFE, 440 nM RpoE'/F, 60 nM TBP und 50 nM TFB durchgeführt. Die Proteine wurden zusammen mit einem DNA Fragment, das für den *GDH* Promotor kodiert, 5 Minuten bei 70 °C vorinkubiert. RpoP Varianten (70 nM), wt RpoP (70 nM), Rpb12 (70 nM), Rpb5 (520 nM) und RpoH (180 nM) wurden direkt in die Footprintreaktion mit den jeweiligen rekonstituierten RNAP gegeben. Die Positionen der reaktiven Thymidine wurde über einen Sequenzstandard, mit einem radioaktivmarkierten Primer in Gegenwart von ddTTP, bestimmt.

2.4. Western Blot Versuche

Wt RpoP und RpoP Varianten wurden in der rekonstituierten RNAP (Superdex200 Fraktionen) über Western Blot Analysen nachgewiesen. Das Fusionsprotein mit 7x His-Tag aus N-terminaler Domäne von Rpb5 und RpoH sowie RpoH mit 7x His-Tag wurden ebenfalls über Western Blot Versuche in der TAP-Tag gereinigten RNAP II (2.11.) nachgewiesen. Die Proteine wurden durch SDS PAGE in einem 15 %igen PA Gel aufgetrennt und wurde über semi-dry blotting auf eine PVDF Membran übertragen (Immobilon-PSQ; 0,2 µm; Millipore). Die Membran wurde im Falle von RpoP mit Primärantikörper gegen RpoP (1:750) und Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper (1:5000) aus Huhn behandelt. Bei den 7x His gekoppelten Untereinheiten

wurde Anti-His6 Antikörper (1:1000) von Sigma und Peroxidase gekoppelter Sekundärantikörper (1:2000) aus Maus verwendet. Die gebundenen Antikörper wurden mit Hilfe des Lumi-light Western blotting Substrates (Roche) nach den Angaben des Herstellers detektiert. Die Signale wurden über Biomax light Filme (Kodak) sichtbar gemacht.

2.5. Einfügen der Mutationen in die RpoP Untereinheit

Hierzu wurde das QuickChange II site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA) verwendet. Die Reaktion wurde nach Angaben des Herstellers mit 10 µM der beiden Primer, 25 ng Matrizen Plasmid (pET17b-RpoP, Novagen), 0,5 µl des 10 mM dNTP Mixes, 2,5 µl des 10x Reaktionspuffers und 0,5 µl der *Pfu* DNA Polymerase (2,5 Units/µl) durchgeführt. Das Volumen wurde mit Wasser auf 25 µl eingestellt. Alle weiteren Schritte wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.6. Reinigung von Rpb5

Die eukaryotische Untereinheit Rpb5 wurde aufgrund des basischen isoelektrischen Punktes, über eine 5 ml SP XL Kationenaustauschersäule (GE Healthcare) aufgereinigt. Die Expression erfolgte nach Klonierung in den pETBlue1 Vektor (Novagen) in Tuner Zellen (Novagen). Der verwendete Reinigungspuffer bestand aus 40 mM Hepes-Na pH 8, 10 % Glycerol, 1 mM PMSF, 5 mM β-Mercaptoethanol sowie Complete Proteaseinhibitorcocktail (Roche). Das Protein eluierte in einem linearen Gradienten (10 mM bis 1 M NaCl) bei 320 mM NaCl. Die Untereinheit wurde anschließend über eine Superdex 75 Gelfiltrationssäule (GE Healthcare) weiter aufgereinigt. Die Elution von dieser Säule deutete daraufhin, dass das Protein in monomerer Form vorlag. Die Proteinkonzentration wurde über einen Bradford Test bestimmt.

2.7. Reinigung von Rpb12

Die eukaryotische Untereinheit Rpb12, mit einem basischen isoelektrischen Punkt von 9,5 wurde wie RpoP über eine 1 ml SP XL Kationenaustauschersäule (GE Healthcare) gereinigt. Die Expression erfolgte in BL21 (DE3) CP Zellen (Stratagene). Das lösliche Protein eluierte in einem linearen Gradienten (50 mM bis 1 M NaCl) bei 300 mM NaCl. Die Bestandteile des Reinigungspuffers waren NaCl, 40 mM Hepes-Na pH 7,6, 10 % Glycerol, 1 mM ZnSO4, 1 mM PMSF, 5 mM β-Mercaptoethanol sowie Complete Proteaseinhibitorcocktail (Roche). Die Proteinkonzentration wurde über einen Bradford Test bestimmt.

2.8. Reinigung der RpoP Varianten

Die mutierten Formen der RpoP Untereinheit wurden in BL21 (DE3) CP Zellen (Stratagene) exprimiert (Naji *et al.*, 2008). Der Rohextrakt wurde für 10 Minuten bei 70 °C hitzebehandelt und der lösliche Überstand wurde über eine 1 ml SP XL Säule (GE Healthcare) weiter aufgereinigt. Die RpoP Varianten konnten dann aufgrund ihres stark basischen isoelektrischen Punktes mit einem linearen Salzgradienten von 10 mM bis 1 M NaCl eluiert werden. Die Varianten eluierten, wie der wt, bei ca. 400 mM NaCl. Die verwendeten Puffer beinhalteten 40 mM Hepes-Na pH 7,6, 10 % Glycerol, 1 mM ZnSO4, 1 mM PMSF und 5 mM β-Mercaptoethanol. Die Proteinkonzentration wurde über einen Bradford Test bestimmt.

2.9. Synthese der C-terminalen Domäne von RpoP

Das siebzehn Aminosäuren umfassende Peptid (KILYKPRPKVPRRVKAI) wurde von JPT Peptide Technologies (Berlin) synthetisiert. Der Reinheitsgrad lag über 90 %.

2.10. Komplementierungsversuche

Es wurden die in Material und Methoden angegebenen Hefestämme für die Komplementierungsversuche verwendet (Material 1.2.). Hierbei wurde getestet, ob die essentiellen RNAP Untereinheiten Rpb12, Rpb10, Rpb11/Rpc19, Rpb6 und Rpb5 durch die jeweils ähnlichen archaeellen Untereinheiten oder hybride Untereinheiten aus eukaryotischen und archaeellen Teilen ersetzt werden können. Die Gene für die archaeellen Untereinheiten RpoP aus *Pyrococcus furiosus* (PF 2009) sowie *Methanoscincus mazei* (MM 2626), RpoL aus *Pyrococcus furiosus* (PF 0044), RpoN aus *Pyrococcus furiosus* (PF 1632), RpoK aus *Pyrococcus furiosus* (PF 1223), RpoH aus *Pyrococcus furiosus* (PF 1558) wurden in den zentromeren Vektor pRS314 kloniert. Die Gensequenzen wurden mit 200 bp der Promotor- und Terminatorregion der jeweiligen eukaryotischen Untereinheit aus *Saccharomyces cerevisiae* fusioniert.

Zusätzlich wurden chimäre Untereinheiten aus der Gensequenz der N-terminalen Domäne von Rpb5 und RpoH, aus der N-terminalen Domäne von Rpb6 und RpoK sowie aus der N-terminalen Domäne von Rpb12 und RpoP konstruiert und unter die Kontrolle des endogenen Promotors gestellt. Die kodierende Sequenz für RpoH, RpoP (C1), Rpb12 (C4), die N-terminale Domäne von Rpb12 (C2), die chimäre Untereinheit aus der N-terminalen Domäne von Rpb5 und RpoH sowie der N-terminalen Domäne von Rpb12 und RpoP (C3) wurden auch in Fusion mit der Hefe *RPS28B* Promotorregion aus dem Plasmid K520/YEplac195-pRPS28 (Ferreira-Cerca *et al.*, 2007) kloniert. Mit dem entsprechenden Stopcodon aus der Hefe wurde das Konstrukt aus der N-terminalen Domäne von Rpb12 und RpoP in den zentromeren Vektor YCplac22 (Gietz and Sugino 1988) kloniert und das Konstrukt aus N-terminaler Domäne von Rpb5 und RpoH in den 2 μ Vektor YEplac 112 (Gietz and Sugino 1988).

Alle angesprochenen Konstrukte wurden in die entsprechenden Austauschstämmen transformiert (1.2.). Das zu untersuchende wt Allel, welches chromosomal deletiert nur auf einem Plasmid mit einem *URA3* Marker vorlag, konnte auf Fluorourat (FOA) haltigem Minimalmedium gegenselektioniert werden. Bei dem Wachstum auf FOA-haltigem Medium entsteht durch die Aktivität der durch *URA3* kodierten Orotidine-5'phosphate Decarboxylase, einem Enzym welches für die Synthese von Uracil benötigt wird, aus FOA das für die Zelle toxische 5-Fluorouracil. Zellen die keinen *URA3* Marker besitzen sind resistent gegen FOA. Nach der Transformation und Selektion gegen die entsprechenden Marker des Austauschplasmids kann durch plattieren auf FOA auf den Verlust des Plasmids mit dem wt Allel selektioniert werden. Auf diese Weise können die archaeellen Untereinheiten sowie die chimären Konstrukte auf die Komplementierung der eukaryotischen Untereinheit *in vivo* getestet werden. Der Austausch wurde bei vier Temperaturen (18, 25, 30 und 37 °C) auf Minimalmedium (SDC; MP Biomedicals) mit Fluorourat (1 g/l, Toronto Research Chemicals) analysiert (Widlund und Davis 2005).

2.11. Reinigung der RNAP II aus der Hefe über eine TAP Reinigungshilfe

Es wurde ein System etabliert, um die RNAP II aus Hefezellen zu reinigen. Dazu wurde über homologe Rekombination an die C-terminale Domäne von Rpb3 ein TAP-Tag fusioniert (Tandem Affinity Purification (TAP) Method, Rigaut *et al.*, 1999; Puig *et al.*, 2001). Die Reinigung beinhaltet zwei Reinigungsschritte. Die Extraktpräparation und die Reinigung wurden nach dem detaillierten Protokoll zugänglich unter www.emblheidelberg.de/ExternalInfo/seraphin/TAP.html durchgeführt und hier nur kurz skizziert (Schema Abb. 7 B). Zuerst erfolgt die Bindung, über einen ProteinA-Tag, an IgG gekoppelte Sepharose. Dann wird die RNAP II eluiert, indem sie über eine TEV Protease vom ProteinA-Tag abgeschnitten wird. Die zweite Bindung erfolgt über eine Calmodulinbindestelle an Calmodulin gekoppelter Agarose. In Gegenwart von Ca-Ionen bindet die RNAP II. Die Elution wird nativ mit EGTA durchgeführt. Mit Hilfe dieses Reinigungssystems konnte eine sehr saubere RNAP II gereinigt werden (~700 ng/µl, Menge: ca. 700 µg aus 3 l spätlogarythmischer Hefekultur).

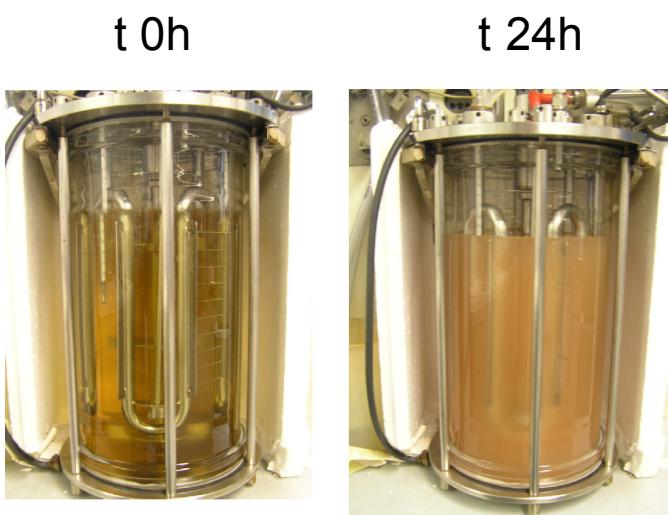


Abb. 7 A Fermentation von Hefezellen. Wachstum von Hefezellen (Stamm YFN2) in einem 10 l Biostat-Glasfermenter in Minimalmedium. (Braun Biotech; Gasdruck 0,05 Bar; Durchmischung ca. 500 U/min; Inkubationstemperatur 27 °C)

Die Hefe wurde in An- und Abwesenheit der Hybriduntereinheit aus N-terminaler Domäne von Rpb5 und RpoH gezüchtet. Die Hybriduntereinheit, die zusätzlich mit einem 7x His-Tag an der N-terminalen Domäne versehen wurde, lag auf einem 2µ Plasmid vor und wurde unter der Kontrolle des *RPS28B* Promoters überexprimiert (Abb. 7 A). Die Promotorregion stammte aus dem Plasmid K520/YEplac195-pRPS28 (Ferreira-Cerca *et al.*, 2007). Es wurde ebenfalls die RNAP aus Zellen gereinigt, in denen die RpoH Untereinheit überexprimiert wurde.

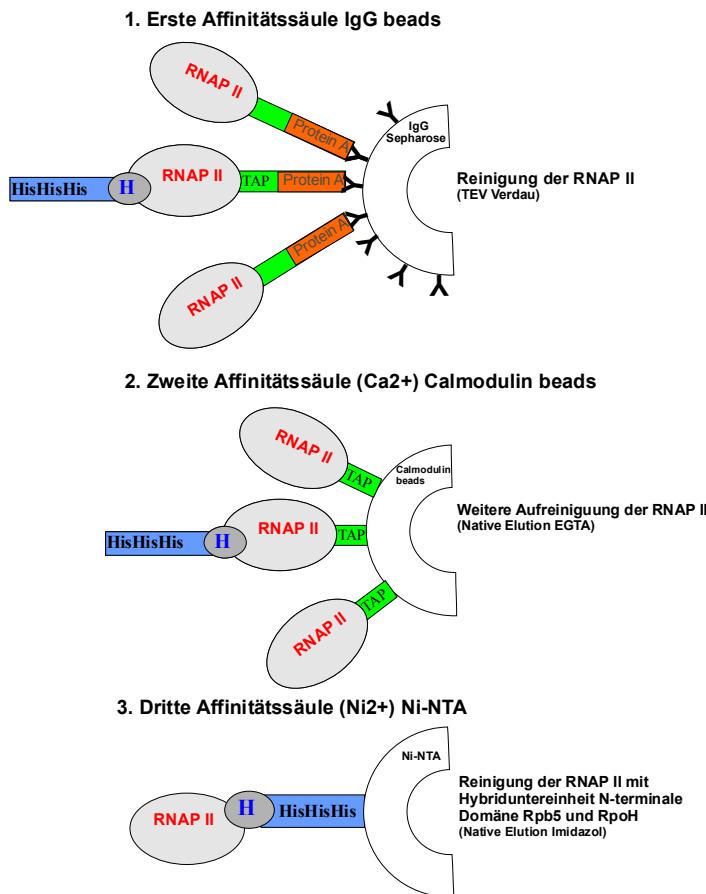


Abb. 7 B Schematische Darstellung der RNAP II Reinigung über eine TAP Reinigungshilfe fusioniert an die C-Terminus von Rpb3.

2.12. Pulse-Chase Markierung von verschiedenen RNA Spezies

Zellen des Hefestamms YFN2 wurden bei 25 °C bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase in YPG gezüchtet. Die Zellen enthielten das Gen für die Untereinheit Rpb5 unter der Kontrolle des Galactose Promoters. Nun wurden die Zellen geerntet und in YPD Medium überführt. In Gegenwart von Glucose wird das Gen für die Untereinheit Rpb5 nicht mehr abgelesen und die Neusynthese wird gestoppt. 2 OD Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten abzentrifugiert und in 200 µl Recovery Medium resuspendiert. 0,74 MBq 5,6-³H-Uracil (45 Ci/mmol, 1 mCi/ml, Amersham Biosciences) wurden jeweils zu der Probe dazugegeben. Darauf folgte eine 20 minütige Inkubation bei 30 °C unter leichtem Schütteln. Die Reaktion wurde durch Inkubation der Proben in Eisswasser gestoppt. Die Zellen wurden abzentrifugiert und die Zellpellets bei -80 °C bis zur RNA Extraktion aufgehalten.

2.13. Reinigung der GesamtRNA aus *S. cerevisiae*

Es wurde eine sogenannte Hot-Phenol Extraktion sowohl für ³H-markierte RNA als auch für unmarkierte RNA angewendet. Bei dieser Methode werden in Acetatpuffer und 1 % SDS resuspendierte Hefen durch Mischen mit saurem Phenol und gleichzeitigem Erhitzen auf 65 °C aufgebrochen. Nach der Phenolisierung wird die RNA mittels Ethanolfällung isoliert.

Im Einzelnen wurden die Zellpellets in 500 µl AE-Puffer und 50 µl 10 %ige SDS Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von 500 µl Phenol (äquilibriert in AE-Puffer) wurden die Proben gevortext und 5 Minuten mit 14000 rpm bei 65 °C auf einem Thermomixer geschüttelt.

Anschließend wurden die Ansätze auf Eis abgekühlt und 2 Minuten bei 14000 rpm und RT zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde erneut phenolisiert und darauf folgend mit 500 µl Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase wurde nun einer Ethanolfällung unterzogen und mehrere Stunden bei -20 °C inkubiert. Dann wurden die Proben 15 Minuten mit 13000 rpm bei 4 °C zentrifugiert und die präzipitierte RNA wurde in 25 µl Solubilisierungspuffer (für PA Gele) oder Formaldehydladepuffer (Agarosegel) aufgenommen. Vor dem Auftrag wurden die Proben bei 65 °C für 10 Minuten denaturiert.

(20xSSC: 3 M NaCl, 0,3 M Tri-Na-Citrat Dihydrat; 10x Formaldehyd Laufpuffer: 20 mM NaAc Trihydrat, 0,2 M MOPS, 10 mM EDTA pH 7; AE-Puffer: NaAc Trihydrat pH 5,3, 10 mM EDTA)

2.14. Agarose-Formaldehyd Gel

Zur Auf trennung der großen RNA Spezies (25S, 18S) wurde ein 1,3 %iges Formaldehyd-Agarosegel (200 ml) verwendet. Die Agarose wurde hierzu in Wasser gelöst und nach Abkühlung auf 60 °C wurde Formaldehyd-Laupfuffer in einfacher Konzentration dazugegeben. Zusätzlich wurden noch 2 % (v/v) Formaldehyd und 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die Elektrophorese wurde übernacht bei 40 V in formaldehydhaltigem Laupfuffer durchgeführt (Sub-Cell GT-Kammer; BioRad).

(Formaldehydladepuffer: Glycerin 50 % (v/v), EDTA 10 mM, Bromphenolblau 0,25 % (v/v))

2.15. PA-Gel zur Auftrennung kleiner RNA Spezies

Zur Auftrennung von kleinen RNAs wie z. B. tRNAs und 5S rRNA wurde ein denaturierendes 6 %iges PA Gel (7 M Urea; 0,5x TBE) verwendet. Die Elektrophorese wurde für 2-3 h bei 150 V durchgeführt. Anschließend wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und dokumentiert.

(Solubilisierungspuffer: 1x Formaldehydgelpuffer, 8 % (v/v) Formaldehyd, 50 % (v/v) Formamid).

2.16. Elektroblot

Die im denaturierenden PA Gel aufgetrennte RNA wurde mittels Elektro-Nass-Transfer (Trans Blot Cell; BioRad) auf eine positiv geladene Nylonmembran (Positive, Qbiogene) übertragen. Der Transfer wurde in 0,5x TBE für ca. 1,5 h bei 50 V durchgeführt.

2.17. RNA Transfer mittels Kapillarblot

Die in denaturierenden Agarosegelen aufgetrennte RNA wurde mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran übertragen. Zunächst wurde das Formaldehyd entfernt, wozu die Gele 5 Minuten im 5 fachen Gellvolumen Wasser und 20 Minuten in 0,05 N NaOH geschwenkt wurden. Durch die Natronlauge wurde die RNA partiell hydrolysiert, was den anschließenden Transfer erleichtert. Im Anschluss wurde das Gel 2x 20 Minuten in 10x SSC Puffer äquilibriert. Die verwendeten Whatman Papiere und die eingesetzte Nylonmembran (Positive, Qbiogene) wurden ebenfalls mit 10x SSC angefeuchtet. Der Blot wurde wie beschrieben aufgebaut (Current Protocols) und die RNA wurde übernacht übertragen. Im Anschluss wurde der Blot kurz in 2x SSC gewaschen, getrocknet und für ca. 2 Minuten mit UV-Licht (256 nm) bestrahlt und so die RNA kovalent an die Membran gekoppelt.

2.18. Detektion der ^3H markierten RNA

Auf die vollständig getrocknete Membran wurde ein Phosphoimager-Screen (IP BAS-MS 2040, Fuji) aufgelegt. Nach 2-3 tägiger Exposition wurde die IP wie beschrieben ausgewertet.

2.19. Hybridisierung des Northern Blots und Detektion

Die Membran wurde in eine Hybridisierungsröhre eingeführt und mit 2x SSC Puffer angefeuchtet. Anschließend wurde die Membran in einem Hybridisierungsofen 3h bei RT in Prähybridisierungslösung inkubiert. Zu der Membran wurde dann die radioaktiv markierte Sonde gegeben und der Ansatz übernacht weiterinkubiert. Zur Entfernung der unspezifisch gebundenen Sonden wurde die Membran nun in der Röhre 2x 15 Minuten mit je 50 ml 2x SSC/ 0,1 % SDS sowie 2x 15 Minuten mit 50 ml 1x SSC/0,1 % SDS gewaschen. Die Waschschritte wurden bei 37 °C mit vorgewärmten Puffern durchgeführt. Nun wurde die Membran auf ein Whatman-Papier gelegt, in Frischhaltefolie eingepackt und die Signale wurden mit Hilfe einer Imaging Plate wie beschrieben ausgewertet.

(Prähybridisierungslösung: Formamid 50 % (v/v), 5x SSC, SDS 0,5 % (v/v), 5x Denhardts; 50x Denhardts: Ficoll 10 mg/ml, Polyvinylpyrrolidone 10 mg/ml, BSA Fraktion V 10 mg/ml)

2.20. Sonden Herstellung

Die angegebenen Oligosonden wurden über eine T4-Polynukleotidkinase (NEB) endmarkiert. Die 5' Markierung wurde mit (γ - ^{32}P)-ATP (0,37 MBq) bei 37 °C durchgeführt. Die markierte Sonde wurde anschließend über eine Micro Bio-Spin 6 Gelfiltrationssäule (Bio-Rad) von der überschüssigen Radioaktivität getrennt. Die Aktivität wurde mit einem Szintillationszähler bestimmt.

Die mRNA Sonden (*DED1*, Rubbi *et al.*, 1999 und *RPS6B*, Wang *et al.*, 2002) wurden mit einem Random Primed DNA Labeling Kit (DECAprime II; Ambion) intern markiert. Die *RPS6B*-Sonde umfasste die gesamte Sequenz der mRNA (1063 nt) und die *DED1*-Sonde lediglich 425 Nukleotide der 1815 nt mRNA. Es wurden zur Markierung 25 ng PCR Produkt zuerst denaturiert und dann nach Angaben des Herstellers mit Hilfe von (α - ^{32}P) dATP (0,37 MBq) über ein Exonuklease-freies Klenow Enzym markiert. Die markierte Sonde wurde wie beschrieben über Gelfiltration von der überschüssigen Radioaktivität getrennt und vor der Zugabe zur Membran noch 10 Minuten bei 90 °C in Einzelstränge überführt.

2.21. CD Spektroskopie

Die CD Spektren wurde mit einem JASCO Spectropolarimeter Model J-720 aufgenommen. Es wurde bei 23 °C der Wellenlängenbereich von 185-260 nm gemessen und die Daten über einen Algorithmus (Savitzky und Golay 1964) geglättet. Die Proteine wurden vor der Spektroskopie mit Hilfe einer NAP-10 bzw. NAP-5 Gelfiltrationssäule (GE Healthcare) in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 umgepuffert, da die Komponenten des Reinigungspuffers (HEPES, NaCl, β -Mercaptoethanol) die Messung behindern würden. Die Berechnung der Elliptizität erfolgte über: $[\theta]_{\text{MRW}} = (\theta \times M_r \times 100) \times \{(c \times d \times \text{Anzahl der As}) \times 10^{-1}\}$ [grad x cm² x dmol⁻¹]. Daraus errechnet sich nach der Methode von Cheng und Yang (1977) der Anteil an α -helicalen Bereichen wie folgt: % an α -Helices = { [θ]bei 220 nm +3380/(-27700)} x 100. Hierbei spielt die

Bestimmung der Konzentration eine entscheidende Rolle. Die Abbildung 8 zeigt drei Standardspektren, wie sie mit Hilfe der CD-Spektroskopie ermittelt werden können.

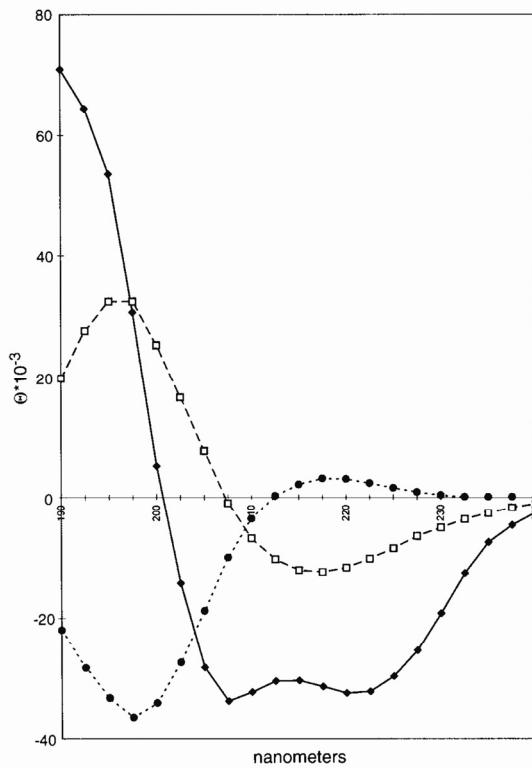


Abb. 8 Graphische Darstellung von Modell CD-Spektren. Die α -Helix ist mit ♦, das β -Sheet mit □ und das Coil-Motiv mit ● markiert (aus Reed und Reed, 1997).

Ergebnisse

1. Funktionieren archaeelle RNAP Untereinheiten im eukaryotischen System?

1.1. Können archaeelle RNAP Untereinheiten gegen die entsprechenden Untereinheiten in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ausgetauscht werden?

Es wurden die RNAP Untereinheiten RpoP, RpoL, RpoK und RpoH aus *Pyrococcus furiosus* sowie die RpoP Untereinheit aus *Methanoscarcina mazei* in Austauschexperimenten untersucht. Zusätzlich wurden Fusionsuntereinheiten aus der N-terminalen Domäne von Rpb6 und RpoK, Rpb12 und RpoP sowie der N-terminalen Domäne von Rpb5 und RpoH hergestellt. Darüber hinaus wurde untersucht, ob die C-terminale Domäne von Rpb5, die essentiellen Funktionen von Rpb5 ersetzen kann (zusammengefasst in Tab. 1).

Untereinheiten der RNAP	Ergebnis: ist ein Austausch möglich
Rpb12/RpoP <i>Pyrococcus</i> (zentromerer Vektor; <i>RPS</i> Promotor)	ja
Fusion N-terminale Domäne Rpb12 und RpoP <i>Pyrococcus</i> (zentromerer Vektor; <i>RPS</i> Promotor)	ja
Rpb12/RpoP <i>Pyrococcus</i> (zentromerer Vektor; <i>RPB12</i> Promotor)	nein
Rpb12/RpoP <i>Methanoscarcina</i> (zentromerer Vektor; <i>RPB12</i> Promotor)	nein
Rpc19/RpoL <i>Pyrococcus</i> (zentromerer Vektor; <i>RPC19</i> Promotor)	nein
Rpb11/RpoL <i>Pyrococcus</i> (zentromerer Vektor; <i>RPB11</i> Promotor)	nein
Rpb6/RpoK <i>Pyrococcus</i> (zentromerer Vektor; <i>RPB6</i> Promotor)	nein
Fusion N-terminale Domäne Rpb6 und RpoK <i>Pyrococcus</i> (zentromerer Vektor; <i>RPB6</i> Promotor)	nein
Rpb5/RpoH <i>Pyrococcus</i> (zentromerer Vektor; <i>RPB5</i> Promotor)	nein
Rpb5/RpoH <i>Pyrococcus</i> (2μ Vektor; <i>RPS</i> Promotor)	nein
C-terminale Domäne Rpb5 (zentromerer Vektor; <i>RPB5</i> Promotor)	nein
Fusion N-terminale Domäne Rpb5 und RpoH <i>Pyrococcus</i> (2μ Vektor; <i>RPS</i> Promotor)	nein
Fusion N-terminale Domäne Rpb5 und RpoH <i>Pyrococcus</i> (2μ Vektor; <i>RPS</i> Promotor)+pNOY Hilfsplasmid	nein

Tabelle 1 Die archaeelle Untereinheit RpoP kann die essentiellen Funktionen von Rpb12 in der eukaryotischen RNAP ausführen. Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der Austauschversuche von RNAP Untereinheiten. Es wurden Untereinheiten aus der Hefe *S. cerevisiae* gegen archaeelle Untereinheiten aus *P. furiosus* (RpoP ebenfalls *M. mazei*) und chimäre Untereinheiten aus Teilen der Untereinheiten aus *S. cerevisiae* und *P. furiosus* ausgetauscht. Die Untereinheiten wurden zum einen unter die Kontrolle des jeweiligen endogenen Promoters und Terminators gestellt. Des Weiteren wurden einige Untereinheiten unter der Kontrolle des starken konstitutiven *RPS28B* Promoters, zum Teil zusätzlich auf einem 2μ Vektor überexprimiert, getestet. Es wurde untersucht, ob die archaeellen Gene oder Fusionskonstrukte die letalen Phänotypen der Deletion der Gens, welches für die wt Untereinheiten kodiert, aufheben können. Der Austausch wurde bei Temperaturen von 18-37 °C untersucht.

Die archaeellen Untereinheiten wurden zum einen unter die Kontrolle des ursprünglichen Promoters und Terminators gestellt. Es wurde ein zentromerer Vektor, der in ca. 1-2 Kopien pro Zelle vorliegt, verwendet. Als Positivkontrolle diente die ursprüngliche eukaryotische Untereinheit. Zusätzlich wurde untersucht, ob bei einer starken Expression einiger Untereinheiten ein Austausch gegen die eukaryotische Untereinheit möglich ist. Dies wurde für die RpoP Untereinheit, die Fusionsuntereinheit aus N-terminaler Domäne von Rpb12 und RpoP und die Fusionsuntereinheit aus N-terminaler Domäne von Rpb5 und RpoH überprüft. Dazu wurde das Konstrukt, unter die Kontrolle eines starken konstitutiven *RPS* Promoters (Ferreira-Cerca *et al.*, 2007) gestellt und im Falle des Fusionsproteins aus N-terminalen Domäne von Rpb5 und RpoH zusätzlich noch in einen 2 μ Vektor kloniert, der in hoher Kopienzahl in der Zelle vorliegt. Für die Fusionsuntereinheit aus N-terminaler Domäne von Rpb5 und RpoH wurde auch überprüft, ob der Wachstumsdefekt RNAP I abhängig ist. Dazu wurde ein so genanntes Hilfsplasmid (pNOY; Nogi *et al.*, 1991) in die Zellen transformiert. Dieses Plasmid trägt die von der RNAP I produzierten, essentiellen Vorläufer rRNAs unter einem Galactose Promotor. Dadurch kann die RNAP II die Vorläufer rRNAs transkribieren und so die essentielle Aufgabe der RNAP I übernehmen.

Für den Austausch wurden sogenannte Shuffle Stämme verwendet. In diesen Stämmen wurden die ausnahmslos essentiellen Untereinheiten aus dem Genom deletiert. Die Untereinheit liegt lediglich auf einem Plasmid in der Zelle vor, welches einen *URA3* Marker trägt. Die Selektion erfolgt über 5-Fluoroorotat (FOA), welches von der Orotidin-5'-Monophosphat Decarboxylase, kodiert von *URA3*, in das für die Zelle giftige Fluorouridin-5'-Monophosphat umgesetzt wird. Die Zellen können auf FOA-haltigem Medium nur überleben, wenn sie das Plasmid mit dem *URA3* Marker verlieren. Es liegt zusätzlich ein Plasmid mit der kodierenden archaeellen Sequenz für die zu untersuchende Untereinheit in der Zelle vor. Ist die archaeelle Untereinheit in der Lage, die wesentlichen Funktionen in den RNAP der Hefe zu erfüllen, können die Zellen wachsen. Das Wachstum mit der zu untersuchenden Untereinheit wurde bei 4 Temperaturen überprüft (18, 25, 30, 37 °C), um eventuelle temperatursensitive Phänotypen zu erkennen.

Nur die stark exprimierte archaeelle Untereinheit RpoP war in der Lage die Hauptfunktionen der entsprechenden eukaryotischen Untereinheit in der RNAP zu erfüllen (Abb. 9 und 10).

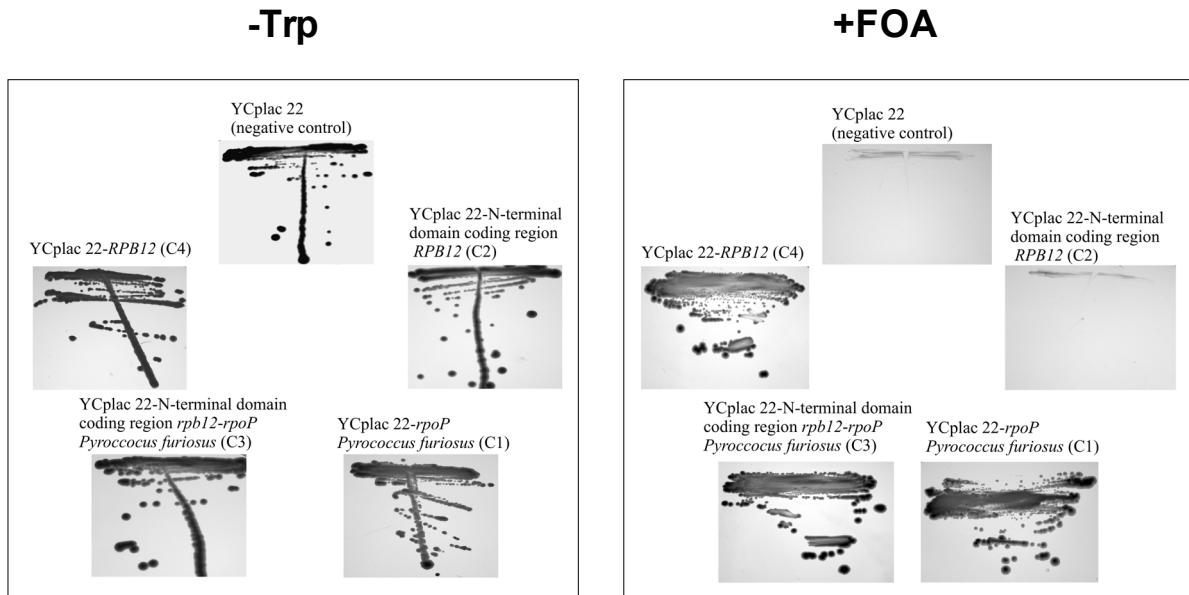


Abb. 9 Das archaeelle RpoP kann die essentiellen Funktionen der Hefe Untereinheit Rpb12 komplementieren. Die für RpoP kodierende DNA Region aus *P. furiosus* wurde mit dem starken *RPS28B* Promotor fusioniert und in das zentromere Plasmid YCplac22 inseriert (C1). Die Konstrukte wurden in den Hefestamm YGVS019, der eine chromosomal Deletion von *RPB12* trägt, transformiert. Der letale Phänotyp wurde durch ein *RPB12/URA3* Plasmid (pFL44-RPC10) aufgehoben. Die Transformanten wurden auf FOA-haltigen Platten gegen das Plasmid pFL44-RPC10 selektiert. Die Platten wurden dazu 5 Tage bei 25 °C inkubiert. Die Zellen, die RpoP exprimieren (C1) wachsen bei 25 °C vergleichbar wie Zellen die Rpb12 exprimieren (C4). Ein ähnliches Konstrukt mit einem chimären Gen, welches für die N-terminale Domäne von Rpb12 fusioniert mit RpoP aus *Pyrococcus* kodiert (C3), konnte ebenfalls die essentiellen Funktion von RPB12 komplementieren. Die kodierende Region der N-terminalen Domäne von Rpb12 (C2) konnte alleine nicht die essentielle Funktion von *RPB12* ersetzen.

Wachstumsversuche bei verschiedenen Temperaturen haben hierbei gezeigt, dass die archaeelle Untereinheit in dem Hefestamm zu einem stark gehemmten Wachstum bei 37 °C führt (Abb. 10 B). Bei 25 °C war das Wachstum von Zellen mit der Untereinheit RpoP nicht vom wt Stamm zu unterscheiden (Abb. 10 A). Das überexprimierte Fusionsprotein aus N-terminaler Domäne von Rpb12 und RpoP konnte ebenfalls die essentiellen Funktionen von Rpb12 ersetzen (Abb. 9). Der Austausch von Rpb12 gegen die stark exprimierte chimäre Untereinheit aus N-terminaler Domäne von Rpb12 und RpoP führte zu normalem Wachstum sowohl bei 25 °C als auch bei 37 °C (Abb. 10 C und D).

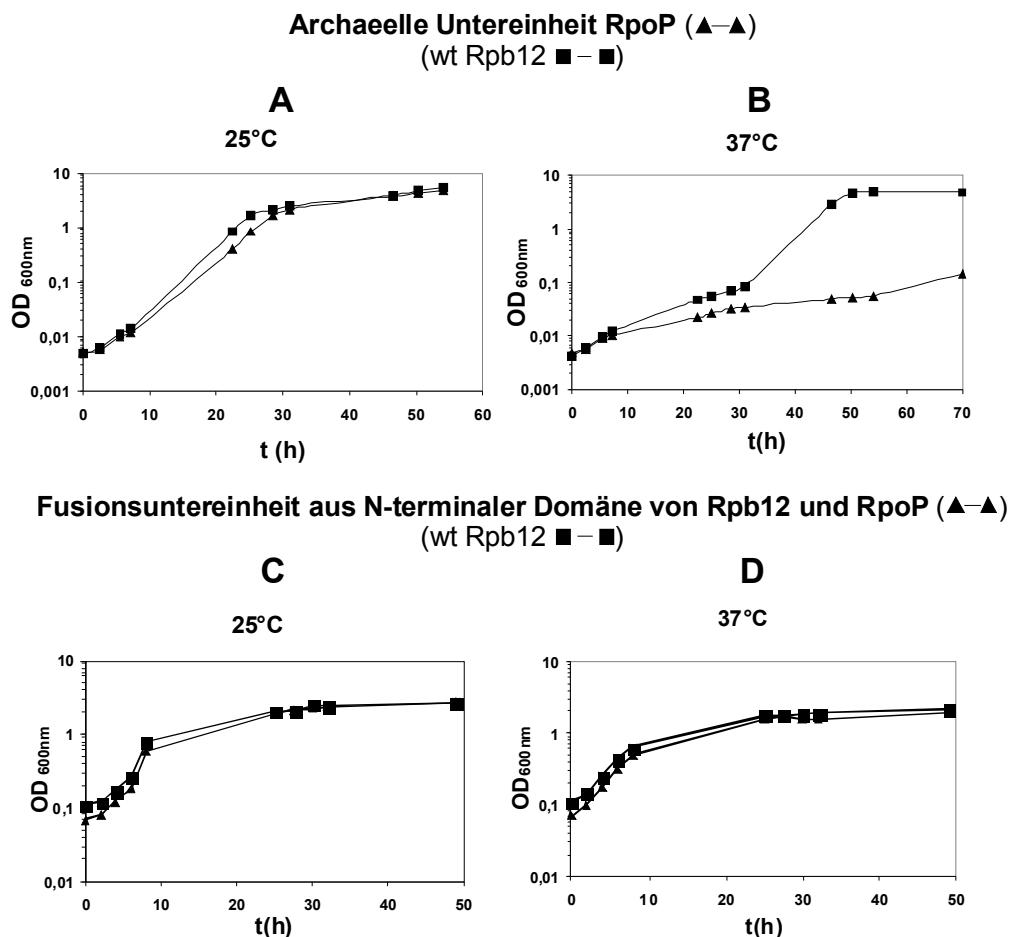


Abb. 10 Hefezellen mit der archaeellen Untereinheit RpoP zeigen ein mit dem wt vergleichbares Wachstum bei 25 °C und einen Wachstumsphänotyp bei 37 °C der durch Fusion mit der N-terminalen Domäne von Rpb12 aufgehoben werden kann. Die Diagramme zeigen das Wachstum des Hefestamms YGVS019 in YPD Medium nach dem Austausch des Plasmids pFL44-RPC10 mit den in Abb. 9 beschriebenen Konstrukten A (C1 ▲-▲) oder (C4 ■-■) bei 25 °C Wachstumstemperatur. B. Wachstum von Zellen mit C1 oder C4 bei 37 °C. C. Wachstum von Zellen mit den Konstrukten C3 (▲-▲) oder C4 (■-■) anstelle von pFL44-RPC10 bei 25 °C. D. Analog zu C wurde Versuch auch bei 37 °C durchgeführt. Die OD_{600nm} wurde während des Wachstums gemessen und in Beziehung zur Zeit dargestellt.

Die Fusionsuntereinheiten Rpb6/RpoK sowie Rpb5/RpoH (Abb. 4 C, blau und orange), bestehend aus Teilen der eukaryotischen Untereinheit aus *S. cerevisiae* sowie der *Pyrococcus* Untereinheit, konnten die essentiellen Funktionen der eukaryotischen Untereinheiten nicht erfüllen. Die Überexpression der Fusionsuntereinheit N-terminale Domäne von Rpb5 mit RpoH sowie das zusätzliche Hilfsplasmid in diesem Stamm ermöglichen keinen Austausch (zusammengefasst in Tab. 1).

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine archaeelle Untereinheit die essentielle Funktion einer eukaryotischen Untereinheit in den RNAP I, II und III der Hefe *in vivo* ausführen kann. Dies ist ein weiterer deutlicher Hinweis auf eine große Ähnlichkeit der archaeellen und eukaryotischen RNAP.

Die zweite Untereinheit, die im Focus dieser Arbeit steht ist RpoH. Diese Untereinheit ist selbst in Fusion mit der eukaryotischen N-terminalen Domäne von Rpb5 nicht in der Lage, alle wichtigen Funktionen von Rpb5 in der Hefezelle auszuführen. Strukturell ist allerdings ein hoher Grad an Übereinstimmung zwischen RpoH und der C-terminalen Domäne von Rpb5 zu beobachten

(Abb. 4 C). Es wurde im Folgenden untersucht, warum in diesem Fall ein Austausch nicht möglich war. Es konnte dabei ausgeschlossen werden, dass der Defekt allein RNAP I spezifisch ist, da in Zellen, in denen die RNAP II über ein Hilfsplasmid die essentielle Funktion der RNAP I übernimmt, ebenfalls keine Komplementierung möglich ist. Die archaeelle RNAP zeigt die größte Übereinstimmung mit dem RNAP II System. Daher lag es nahe, in einem ersten Schritt zu untersuchen, ob RpoH in die RNAP II eingebaut werden kann und sie dort die Funktion der C-terminalen Domäne von Rpb5 ausüben kann.

1.2. Funktioniert die archaeelle Untereinheit RpoH in der RNAP II *in vitro*?

Immunpräzipitationsversuche (IP) haben erste Hinweise darauf gegeben, dass die coexprimierte Fusionsuntereinheit aus N-terminaler Domäne von Rpb5 und RpoH zu einem geringen Prozentsatz in die RNAP I und II eingebaut wird (Daten nicht gezeigt; RNAP III wurde nicht getestet).

Daraufhin wurde ein System etabliert, um die RNAP II aus Hefezellen zu reinigen (Methoden 2.11.). Die Reinigung erfolgte in drei Schritten über eine TAP und Histidin Reinigungshilfe (Tag). Diese Reinigung beinhaltet zuerst eine Bindung an IgG gekoppelte Sepharose und anschließend eine Bindung an Calmodulin gekoppelte Agarose. Die Elution erfolgte jeweils nativ. Der letzte Reinigungsschritt erfolgte über eine Ni-NTA Säule. Ein zusätzlicher Histidin-Tag an der N-terminalen Domäne der Fusionsuntereinheit ermöglichte eine spezifische Aufreinigung der RNAP II Fraktion, die die Fusionsuntereinheit eingebaut hat.

Die Fusionsuntereinheit aus N-terminaler Domäne von Rpb5 und RpoH wurde unter Kontrolle des *RPS28B* Promotors und mit Hilfe eines in hoher Kopienzahl vorliegenden Vektors überexprimiert. Zusätzlich wurde auch mit der archaeellen Untereinheit RpoH alleine (mit Histidin-Tag versehen) ein ähnlicher Vektor hergestellt.

Mit Hilfe der ersten beiden Reinigungsschritte konnte hochreine RNAP II mit einer Konzentration von ca. 700 ng/ μ l gereinigt werden. Die Gesamtmenge aus 2,5 l spät logarithmischer Hefekultur betrug ca. 700 μ g.

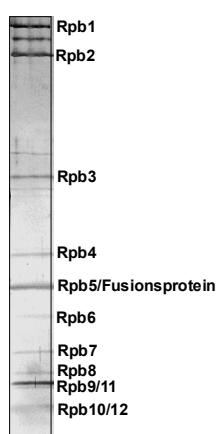


Abb. 11 Ergebnis der Aufreinigung der RNAP II. In einem SDS-PAGE Gradientengel (7-20 %) wurden 150 μ g RNAP II aus *S. cerevisiae*, die über einen TAP-Tag am C-Terminus von Rpb3 aufgereinigt wurde, aufgetrennt und das Gel silbergefärbt. In den Zellen wurde die chimäre Untereinheit N-terminale Domäne Rpb5 und RpoH unter der Kontrolle eines *RPS* Promotors auf einem 2 μ Plasmid coexprimiert.

In einem Westernblot mit gegen den Histidin-Tag gerichteten Antikörpern konnte nachgewiesen werden, dass die Fusionsuntereinheit in die RNAP II eingebaut wurde (Abb. 12 Spur 3 und 4). Die wt RNAP zeigte kein Signal mit dem verwendeten Anti-His Antikörper (Abb. 12 Spur 6-7). Um abschätzen zu können welcher Prozentsatz der RNAP II die Fusionsuntereinheit eingebaut hat, wurden mehrere Westernblots quantifiziert. Es stand kein Hefestamm mit einer RNAP II Untereinheit, die mit einen zusätzlichen His-Tag versehen wurde, zur Verfügung. Aus diesem Grund wurde TFE, welches eine ähnliche Größe besitzt und einen Histidin-Tag in derselben Länge aufwies, als Standard verwendet (Abb. 12 Spur 1-2).

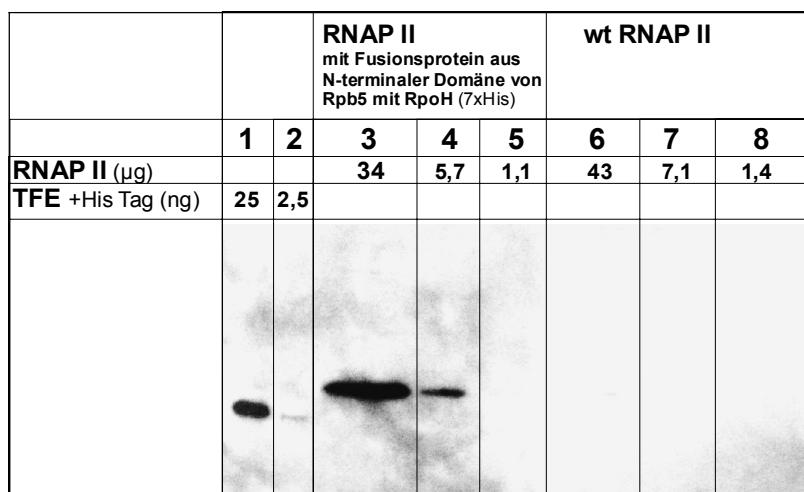


Abb. 12 Das Fusionsprotein aus N-terminaler Domäne von Rpb5 und RpoH wird in die RNAP II eingebaut. Mit Hilfe eines Westernblots wurde gereinigte RNAP II (über TAP-Tag) aus *S. cerevisiae* auf die Gegenwart der chimären Untereinheit N-terminale Domäne Rpb5 und RpoH hin untersucht. Die Untereinheit wurde in *S. cerevisiae* unter der Kontrolle des *RPS* Promotors auf einem 2 μ Plasmid coexprimiert. Der Westernblot wurde mit Anti-His Antikörpern (Sigma) gegen den zusätzlichen 7x His-Tag am N-Terminus des Fusionsproteins durchgeführt. In Spur 1 und 2 ist TFE mit 7x His-Tag zur Konzentrationsabschätzung aufgetragen. In Spur 3-5 ist RNAP II aufgetragen, die aus Zellen mit coexprimierter Fusionsuntereinheit stammt. Spur 6-8 enthält wt RNAP II.

Die Quantifizierung ergab, dass die Signalintensität welches durch 25 ng TFE gebildet wird mit ca. einem Drittel des Signals in 34 µg RNAP II und der doppelten Signalintensität in 5,7 µg RNAP II vergleichbar ist. Der Antikörper zeigt keine unspezifische Bindung an die wt RNAP und das Fusionsprotein ist damit für die Signale in der RNAP II, aus Zellen mit coexprimierter Fusionsuntereinheit, verantwortlich. Kalkuliert man die theoretische Menge an Rpb5 Untereinheit in der Polymerase und vergleicht diese mit der detektierten Menge an Fusionsprotein, abgeschätzt über das Standardprotein, ergibt sich ein Wert von ca. 4 % der gesamten RNAP II Population die die Fusionsuntereinheit eingebaut hat.

Diese 4 % wurden dann über Ni-NTA Agarose aufgereinigt, um sie von der wt Fraktion der RNAP II zu trennen. Eine unspezifische Bindung der RNAP II an das Säulenmaterial konnte durch Zugabe von 40 mM Imidazol in den Säulenpuffer verhindert werden. Die hybride RNAP II mit eingebauter Fusionsuntereinheit eluierte bei 150 mM Imidazol (Daten nicht gezeigt). Eine Proteinbestimmung ergab eine Proteinmenge von ca. 3 % der Gesamtpolymerasemenge, die spezifisch über die Ni-NTA Agarose gereinigt werden konnte. Die Quantifizierung erfolgte über Proteinbestimmungen nach Bradford. Diese Proteinmenge korreliert mit der Abschätzung aus

dem Westernblot Experiment (Abb. 12), die darauf hingedeutet hat, dass ca. 4 % der gesamten RNA II Population das Fusionsprotein eingebaut haben.

Die Fraktion der RNAP II, die die Fusionsuntereinheit eingebaut hat, wurde anschließend auf ihre Aktivität hin getestet. In diesem Zusammenhang konnten lediglich Transkriptionsfaktor-unabhängige Versuche durchgeführt werden, da die nötigen generellen Transkriptionsfaktoren des RNAP II Systems nicht zur Verfügung standen.

Die Polymerase wurde zum einen in einer Dinukleotid gestarteten Reaktion an einer vorgeformten Transkriptionsblase (Abb. 13 A) getestet. Der dritte Test erfolgte auf einer Elongationsmatrize rekonstituiert nach Kireeva *et al.*, 2000 (Abb. 13 B). Der Vergleich von wt RNAP sowie RNAP mit Fusionsuntereinheit (Abb. 13 Spur 1 und 3 zeigen wt, 2 und 4 die chimäre RNAP) zeigte bei beiden faktorunabhängigen Transkriptionen die gleiche Aktivität. Die eukaryotische RNAP II ist damit in der Lage, mit der archaeelle Untereinheit RpoH, in Fusion mit der N-terminalen Domäne von Rpb5, effektiv den Elongationsschritt im Transkriptionszyklus durchzuführen.

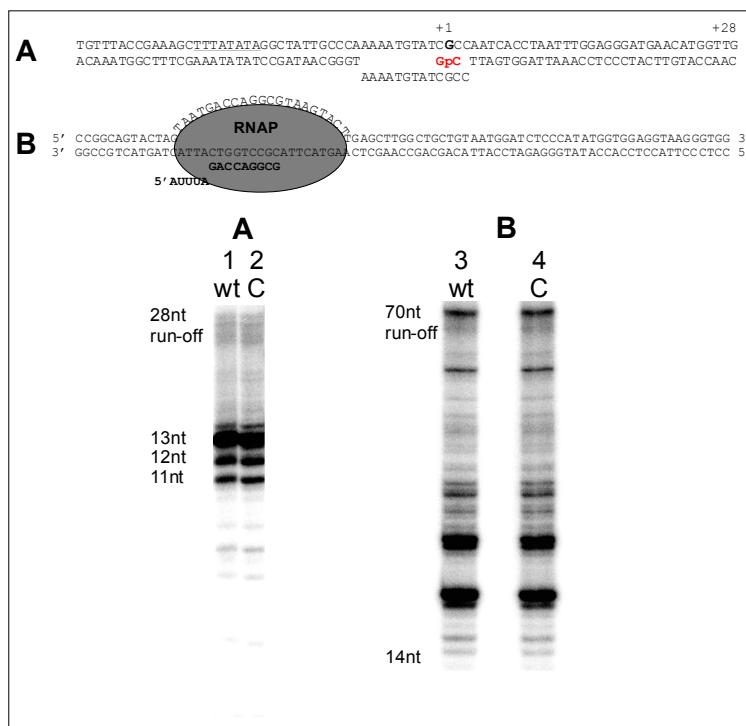


Abb. 13 RNAP II mit Fusionsuntereinheit N-terminale Domäne Rpb5 und RpoH zeigt wt Aktivität *in vitro*. A vorgeformte Transkriptionsblase. Die Dinukleotid (GpC) gestartete Transkription wurde an einer vorgeformten Transkriptionsblase durchgeführt. B Elongationsmatrize. Die Elongationsmatrize wurde hergestellt, indem eine 13 nt RNA hybridisiert mit dem kodierenden Strang, mit der RNAP bei 25 °C inkubiert wird. Anschließend wird die Matrize durch die Zugabe des nichtkodierenden Stranges fertig gestellt. Spur 1 und 3 zeigt die Aktivität des wt RNAP II Enzyms, Spur 2 und 4 die der RNAP II mit eingebauter chimärer Untereinheit N-terminale Domäne Rpb5 und RpoH. Alle Transkripte wurden auf einem 24 %igen denaturierenden PA Gel untersucht.

Untersuchungen einer archaeellen RNAP, der RpoH fehlt (ΔH RNAP), zeigte eine deutlich reduzierte Aktivität auf einer Elongationsmatrize, wie sie in Abb. 13 B verwendet wurde (Abb. 24 Spur 1 und 2). RpoH ist demnach wichtig für die effektive Transkription auf einer solchen Matrize. Dies legt die Vermutung nahe, dass auch in der RNAP II, die C-terminale Domäne von Rpb5 Einfluss auf die Elongationsfähigkeit hat. Da RpoH, ausgetauscht gegen die

C-terminale Domäne von Rpb5, in der RNAP II wt Aktivität herstellen kann, kann man folgern, das RpoH diese Domäne in der Elongation funktionell ersetzen kann.

Die Interaktion von Rpb5 mit der RNAP II erfolgt hauptsächlich über die C-terminale Domäne (Abb. 5). Da das Fusionsprotein in die RNAP II eingebaut wurde, wurde als nächstes getestet, ob RpoH alleine auch in die RNAP II eingebaut wird. Dazu wurde RpoH, ebenfalls mit einem Histidin-Tag versehen, genau wie die Fusionsuntereinheit in der Hefe überexprimiert.

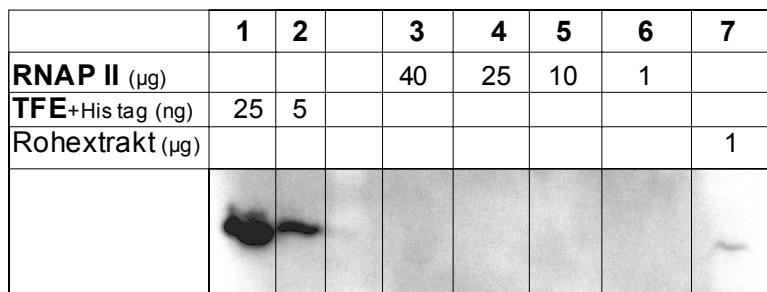


Abb. 14 Die N-terminale Domäne von Rpb5 ist für die Assemblierung der Untereinheit in die RNAP II entscheidend. Mit Hilfe eines Westernblots wurde gereinigte RNAP II (über TAP-Tag) aus *S. cerevisiae* auf die Gegenwart archaeellen Untereinheit RpoH hin untersucht. Die Untereinheit wurde in *S. cerevisiae* unter der Kontrolle des *RPS* Promotors auf einem 2 μ Plasmid coexprimiert. Der Westernblot wurde mit Anti-His Antikörpern (Sigma) gegen den zusätzlichen 7x His-Tag am N-Terminus der Untereinheit durchgeführt. Die aufgetragene Menge an RNAP II (Spur 3-6) ist angegeben. In Spur 1 und 2 ist TFE (7x- His-Tag) zur Konzentrationsabschätzung aufgetragen und Spur 7 enthält 1 µg Rohextrakt.

Aus der Hefe wurde wie bereits beschrieben die RNAP II gereinigt und über einen Westernblot wurde der Einbau quantifiziert. Das Ergebnis war diesmal negativ (Abb. 14 Spur 3-6). Die RpoH Untereinheit alleine wird nicht in die RNAP II eingebaut, sie ist im Rohextrakt aber nachweisbar (Abb. 14 Spur 7). Quantifiziert man dieses Ergebnis anhand des Standardproteins TFE (mit 7x His-Tag) so ergibt sich eine Nachweigrenze von 0,3 %. Dies bedeutet, dass in weniger als 0,3 % der RNAP II Komplexe RpoH (7x His-Tag) vorliegt. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass die N-terminale Domäne von Rpb5 bei der Assemblierung in die RNAP II eine wichtige Funktion wahrnimmt.

1.3. Welchen Einfluss hat die archaeelle Untereinheit RpoH auf die drei eukaryotischen RNAP *in vivo*?

Die Komplementationsversuche mit dem Fusionsprotein aus N-terminaler Domäne von Rpb5 und RpoH sind negativ ausgefallen. Allerdings lieferten IP Experimente einen Hinweis auf Einbau in die RNAP I und II. Im RNAP II System konnte außerdem, gezeigt werden, dass die Fusionsuntereinheit aus N-terminaler Domäne von Rpb5 und RpoH *in vitro*, die Elongation der RNAP II unterstützt (siehe 1.2.).

Es wurde daraufhin untersucht, wodurch der letale Phänotyp bedingt ist und, ob dieser besonders durch den Defekt einer der drei RNAP begründet ist. Zu diesem Zweck wurden Northern Blot Experimente für die RNAP II spezifische Transkription sowie sogenannte Puls Experimente für die RNAP I und III spezifische Transkription durchgeführt. Die Fusionsuntereinheit lag unter der Kontrolle eines konstitutiven *RPS* Promotors und die ursprüngliche Untereinheit Rpb5 unter der

Kontrolle eines regulierbaren Galactose Promotors vor. Die Rpb5 Untereinheit wird nur exprimiert, wenn die Zellen in Galactose-haltigem Medium wachsen.

Die Zellen wurde zu Beginn in Galactose-haltigem Medium gezüchtet und anschließend in Glucose-haltiges Medium überführt. Nun wurde zu bestimmten Zeiten mit Hilfe von Tritiumuracil die gesamte neusynthetisierte RNA markiert und anschließend isoliert (Methoden 2.13.).

Die RNA wurde zur Analyse der RNAP I spezifischen Transkription, repräsentiert durch die 5,8S rRNA, und RNAP III spezifischen Transkription, repräsentiert durch die 5S rRNA und tRNAs, auf einem 6 %igen PA Gel analysiert (Abb.15).

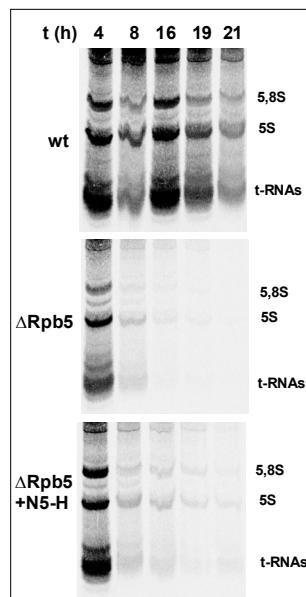


Abb. 15 Das Fusionsprotein aus N-terminaler Domäne von Rpb5 und RpoH hat einen positiven Effekt auf RNAP I und III spezifische Transkription *in vivo*. Es wurde die *in vivo* Synthese von kleinen RNAs nach der Reprimierung der *RPB5* Gensynthese (Δ Rpb5) und in Gegenwart des Fusionskonstrukt N-terminale Domäne Rpb5 und RpoH (Δ Rpb5+N5-H) untersucht. Die Rpb5 Untereinheit befindet sich unter der Kontrolle des induzierbaren Galactose Promotors, die Fusionsuntereinheit wird unter der Kontrolle des *RPS* Promotors und mit Hilfe eines 2μ Plasmids überexprimiert. Im Stamm *YFN2* wurden die Zellen in Galactose-haltigem Medium bis zu einer OD von 1 gezüchtet. Nach Überführung in Glucose-haltiges Medium wurde die gesamte RNA zu den angegebenen Zeitpunkten (4-21 h), mit Tritiumuracil für 20 Minuten bei 30 °C markiert. Die RNA wurde extrahiert, auf einem denaturierenden 6 %igen PA Gel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und analysiert. Der oberste Blot zeigt die wt Positivkontrolle, der mittlere die Δ Rpb5 Negativkontrolle und der unterste die RNA aus Zellen in denen zusätzlich das Fusionskonstrukt vorlag.

Im obersten Blot ist die wt Kontrolle dargestellt, der mittlere Blot zeigt das Ergebnis nach Abschalten der Rpb5 Untereinheit (Δ Rpb5) und der untere Blot die RNA aus Zellen in denen Rpb5 ausgeschalten wurde, aber das Fusionskonstrukt aus N-terminaler Domäne Rpb5 und RpoH vorlag (Abb. 15). Es konnte nachgewiesen werden, dass nach 4 h ohne Neusynthese von Rpb5 die RNA Produktion noch ungefähr wt Niveau hat. Beim 8 h Wert wird allerdings schon eine drastische Verringerung der Pol I und Pol III spezifischen Transkription deutlich. Nach 16 h und 19 h ist kaum noch spezifisches Transkript zu detektieren. RNAP I und III scheinen hierbei simultan an Aktivität zu verlieren. Im untersten Blot ist eine leicht stimulierte transkriptionelle Aktivität im Vergleich zur Δ Rpb5 Kontrolle zu erkennen. In diesen Zellen wurde die Fusionsuntereinheit überexprimiert. Die Fusionsuntereinheit hat einen deutlich positiven Effekt

auf RNAP I wie RNAP III spezifische Transkription, allerdings kann Rpb5 eindeutig nicht ersetzt werden. Eine Analyse der großen rRNAs (18S und 27S) führte zu ähnlichen Ergebnissen, wie die Analyse der kleinen rRNAs (Daten nicht gezeigt).

Das Wachstum der Zellen war bis ca. 8 h nach Abschalten Neusynthese der Rpb5 Untereinheit von der wt Kontrolle nicht zu unterscheiden, ab diesem Zeitpunkt fand in den Kulturen, in denen Rpb5 abgeschaltet wurde, keine Zunahme der optischen Dichte mehr statt. Der Wachstumsphänotyp korreliert damit mit dem Rückgang in der RNAP I und III spezifischen Transkription.

Nach der Analyse der RNAP I und III spezifischen Transkription in Puls Experimenten, wurde nun Transkripte der RNAP II untersucht. Die *in vitro* Daten (1.2), die einen Einbau des Fusionsproteins und Funktionalität in der Elongation gezeigt haben, ließen dabei deutlich positive Effekte erwarten.

Die RNAP II spezifische Transkription wurde mit Hilfe von Northern Blot Experimenten untersucht. Hierbei wurden zwei Sonden verwendet, die beide gegen kurzlebige mRNAs gerichtet sind (Wang *et al.*, 2002; Rubbi *et al.*, 1999). Es wurden DNA Sonden gegen die mRNA, die durch das *RPS6B* Gen und das *DED1* Gen kodiert werden, generiert (Methoden 2.21.). *Rps6B* ist eine Teil der kleinen 40S Untereinheit des Ribosoms und *Ded1* ist eine ATP-abhängige Helikase, die für die Translationsinitiation von mRNAs in der Hefe notwendig ist.

Für eine größtmögliche Vergleichbarkeit von RNAP I/III und RNAP II spezifischer Transkription, wurde derselbe Blot verwendet wie im Puls Experiment (Abb. 15).

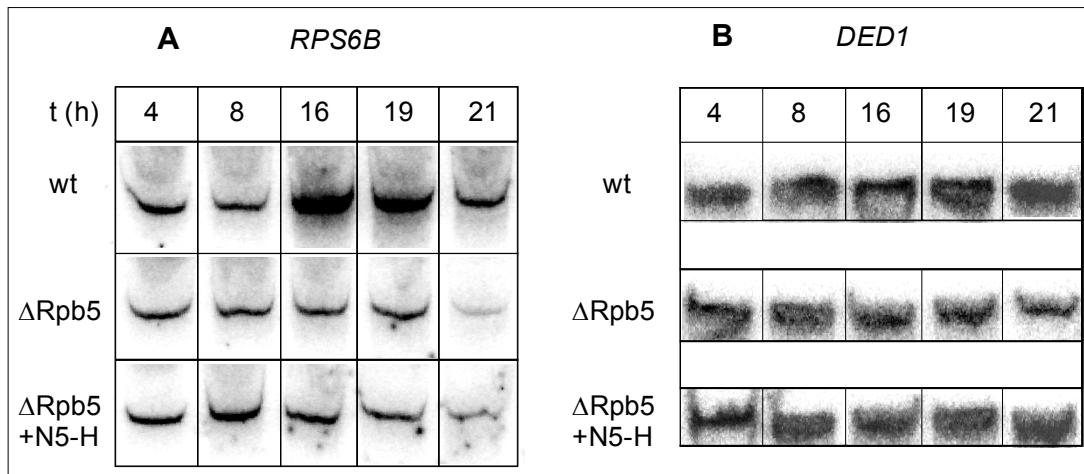


Abb. 16 RNAP II funktioniert unabhängig von neusynthetisierter Rpb5 Untereinheit. Für eine Northernanalyse der RNAP II spezifischen Transkription wurde zur besseren Vergleichbarkeit dasselbe Blot, wie im Markierungsexperiment (Abb. 15) eingesetzt. Es wurde die Expression von *RPS6B* (A) und *DED1* (B) untersucht. Das komplette *RPS6B* und ein Fragment von *DED1* dienten hierbei als Sonde.

Erstaunlicherweise konnte in den Zellen ohne neusynthetisierte Rpb5 Untereinheit eine starke RNAP II Aktivität nachgewiesen werden. 19 h nachdem Rpb5 abgeschaltet wurde war kein Rückgang für die *RPS6B* und *DED1* mRNA zu detektieren (Abb. 16 A und B ΔRpb5 4-19 h). Nach 21 h war lediglich eine leichte Reduzierung beider mRNAs zu beobachten (Abb. 16 A und B ΔRpb5 21 h).

Da die RNAP II nach Abschalten von Rpb5 kaum an Aktivität verloren hat konnte der Einfluss der Fusionsuntereinheit nicht genau bestimmt werden. Der 21 h Wert lässt allerdings auch hier einen

positiven Effekt der chimären Untereinheit auf die RNAP II spezifische Transkription vermuten. Es konnte mit zwei unabhängigen Sonden nachgewiesen werden, dass die RNAP II eine von der Neusynthese von Rpb5 unabhängige, hohe Aktivität besitzt, ganz im Gegensatz zu RNAP I und III (Abb. 15). Dies ist ein unerwartetes Ergebnis. Vergleichbare Untersuchungen der Rpb12 Untereinheit im Hefesystem (Rubbi *et al.*, 1999), führten zu einer simultanen Abnahme der transkriptionellen Aktivität von RNAP I, II, und III. Dies trat 6 Stunden nach dem Abschalten der Neusynthese von Rpb12 auf. Die hier gezeigten Ergebnisse im Puls Experiment für RNAP I und III stimmen damit überein. Für die RNAP II hingegen, obwohl dieselbe Sonde im Northern Blot Experiment verwendet wurde (*DEDI*), konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden. Die fehlende Neusynthese von Rpb5 und Rpb12 scheint grundsätzlich andere Auswirkungen auf die RNAP II zu haben.

2. Funktionieren eukaryotische RNAP Untereinheiten im archaeellen System?

2.1. Können eukaryotische RNAP Untereinheiten in eine archaeelle RNAP rekonstituiert werden?

Im ersten Teil der Arbeit wurden archaeelle RNAP Untereinheiten im eukaryotischen Hefesystem untersucht. Im Anschluss daran erfolgte eine Analyse von Untereinheiten der Hefe im archaeellen System von *Pyrococcus furiosus*.

Bei dieser Untersuchung wurde die archaeelle RNAP mit den eukaryotischen Untereinheiten Rpb5 und Rpb12 rekonstituiert (nach Naji *et al.*, 2007). Die chimäre RNAP wurden dann in *in vitro* Transkriptionstests auf ihre Funktionsfähigkeit untersucht.

In einem ersten Schritt wurden die beiden Untereinheiten heterolog in *Escherichia coli* exprimiert und anschließend gereinigt. Beide Proteine waren gut löslich und wurden aufgrund ihres basischen isoelektrischen Punktes über eine Kationenaustauschersäule gereinigt. Im Falle von Rpb5 erfolgte noch eine Aufreinigung über eine Gelfiltrationssäule, die darauf hindeutete, dass die Untereinheit als Monomer vorlag (Methoden 2.7. und 2.8.).

Da die Proteine in reiner Form sowie in ausreichend hoher Konzentration vorlagen, konnte eine Rekonstitution mit der eukaryotischen Untereinheit, und ohne das archaeelle Homolog durchgeführt werden.

Allgemein beinhaltet die Rekonstitution zu Beginn eine Zusammenführung aller Untereinheiten, dann eine gemeinsame Denaturierung in 6 M Urea und eine anschließende Renaturierung des Komplexes. Dann werden die Komplexe bei 70 °C hitzebehandelt. Der letzte Schritt besteht aus einer Gelfiltrationssäule, die die korrekt assemblierte RNAP von Aggregaten sowie nicht eingebauten Untereinheiten trennt (Details siehe Naji *et al.*, 2007). Die eukaryotischen Untereinheiten Rpb5 und Rpb12 wurden auf diese Weise mit archaeellen Untereinheiten rekonstituiert und konnten tatsächlich in stöchiometrischer Menge im Enzym nachgewiesen werden (Abb. 17 Spur 2 und 4).

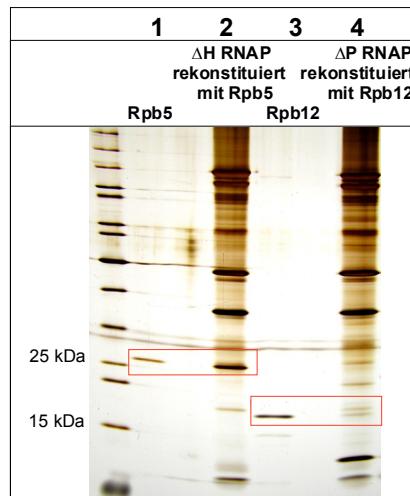


Abb. 17 Die eukaryotischen Untereinheiten Rpb5 und Rpb12 können in eine archaeelle RNAP rekonstituiert werden. In einem SDS-PAGE Gradientengel (10-22 % PA) wurden aufgetrennt: Spur 1 Rpb5 (150 ng), Spur 2 *Pyrococcus* RNAP ΔH rekonstituiert mit Rpb5 (5 μ g), Spur 3 Rpb12 (50 ng), Spur 4 *Pyrococcus* RNAP ΔP rekonstituiert mit Rpb12 (6 μ g).

In der RNAP rekonstituiert mit Rpb5 tritt eine entsprechende Bande auf (Abb. 17 Spur 1 und 2), die in der RNAP rekonstituiert mit Rpb12 nicht auftritt (Abb. 17 Spur 4). Das gleiche gilt für die RNAP rekonstituiert mit Rpb12, in der eine neue Bande in der Größe von Rpb12 auftritt (Abb. 17 Spur 3 und 4).

2.2. Funktioniert die archaeelle RNAP mit den Untereinheiten aus der Hefe?

Die archaeelle RNAP konnte mit den beiden Untereinheiten Rpb5 und Rpb12 rekonstituiert werden (2.1.). Nun stellte sich die Frage, ob dieses chimäre Enzym auch funktionsfähig ist. Die Enzyme wurden in *in vitro* Transkriptionsversuchen bei 70 °C untersucht (Methoden 2.1.). Zuerst ist das Ergebnis einer Transkription der RNAP mit Rpb5 dargestellt.

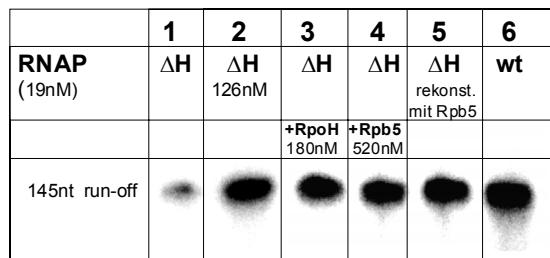


Abb. 18 Die archaeelle RNAP funktioniert mit der eukaryotischen Untereinheit Rpb5. Die Synthese eines 145 nt Run-off Transkriptes an einem *GDH* Promotor wurde auf einem 6 %igen PA Gel untersucht. Die Transkription erfolgte unter Standardbedingungen (Methoden 2.1.) bei 70 °C. Spur 1 zeigt ein rekonstituiertes Enzym ohne RpoH (ΔH), in Spur 2 wurde die 6,5 fache Menge des ΔH Enzyms eingesetzt. In Spur 3 wurde zum ΔH Enzym RpoH in den Transkriptionsansatz gegeben, in Spur 4 wurde Rpb5 dazugegeben. Die Menge an zugegebenem Protein ist angegeben. Spur 5 zeigt die Aktivität eines Enzyms, das mit Rpb5 anstatt RpoH rekonstituiert wurde und Spur 6 die wt Kontrolle.

Die chimäre RNAP zeigt in diesen Versuchen wt Aktivität (Abb. 18 Spur 5 und 6). Die RNAP, die ohne die Untereinheit rekonstituiert wurde (Abb. 18 Spur 1), hat nur eine schwache Restaktivität von ca. 15 %. Die Rpb5 Untereinheit aus der mesophilen Hefe scheint durch die hohen Temperaturen nicht stärker abgebaut zu werden, als die RpoH Untereinheit.

Interessanterweise konnte die Untereinheit auch direkt zu einer rekonstituierten ΔH RNAP gegeben werden, und die Aktivität wieder auf wt Niveau bringen. Dies war mit RpoH und Rpb5 möglich (Abb. 18 Spur 3 und 4). Eine um das 6,5 fache höhere Menge an ΔH Enzym ist nötig, um wt Aktivität zu erreichen (Abb. 18 Spur 2). Dies korreliert mit der 15 %igen Restaktivität der einfachen Menge an ΔH Enzym. Die eukaryotische Untereinheit Rpb5 kann demnach RpoH in der archaeellen RNAP funktionell ersetzen.

Im Gegensatz zur RNAP mit Rpb5 wurde die RNAP mit der Rpb12 Untereinheit nicht in der Run-off, sondern in der Single Round Transkription getestet.

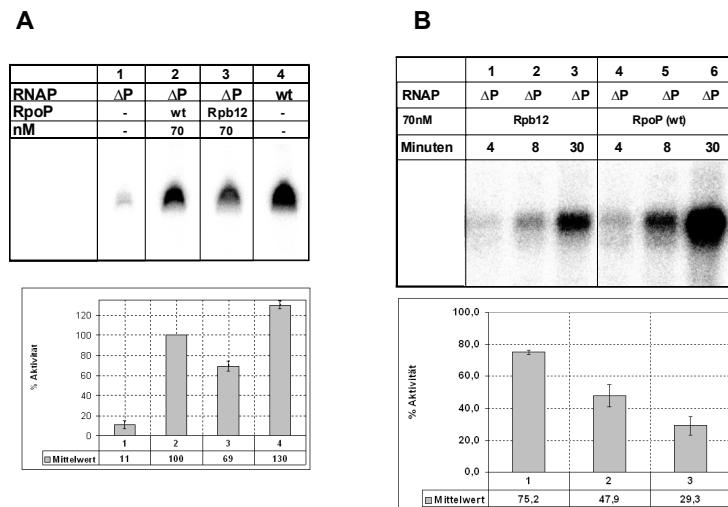


Abb. 19 Rpb12 kann RpoP in der archaeellen RNAP funktional ersetzen. *A* Single Round Transkription. RNAP Komplexe wurden bei +20 gestellt, anschließend isoliert, und die Wiederaufnahme der Transkription wurde untersucht. Die Abb. zeigt ein Run-off Produkt, dass nach Zugabe eines kompletten Satzes unmarkierter NTPs zu den gestellten Komplexen gebildet wurde. In Spur 1 ist die Aktivität des ΔP Enzyms dargestellt, in Spur 2 wurde RpoP zum ΔP Enzym in den Transkriptionsansatz gegeben. Spur 3 zeigt die Aktivität nach Zugabe von Rpb12 zu ΔP und Spur 4 die wt Kontrolle. Die Quantifizierung wurde mit der Aida Image Analyzer Software 3.28 durchgeführt. *B* Zeitreihe. Quantifizierung der transkriptionellen Aktivität des ΔP Enzyms nach Zugabe von Rpb12 (Spur 1-3) im Vergleich zu wt RpoP (Spur 4-6) in der Run-off Transkription. Die Menge an Transkript wurde nach Inkubation der Transkriptionsreaktion für 4, 8 und 30 Minuten gemessen. Die Aktivität nach Zugabe von wt RpoP wurde 100 % gesetzt. Das Diagramm zeigt den Mittelwert der Transkriptionsaktivität von ΔP mit Rpb12 relativ zu wt RpoP.

Die ΔP RNAP zeigte eine noch geringere Aktivität als die ΔH RNAP von 11 % im Vergleich zum wt Enzym (Abb. 19 A Spur 1 und 4). Genau wie die ΔH RNAP so kann auch bei der ΔP RNAP durch direkte Zugabe der fehlenden Untereinheit wt Aktivität erreicht werden (Abb. 19 A Spur 2). Es zeigte sich allerdings in Transkriptionsversuchen, bei denen es über einen längeren Zeitraum zu Reinitiation und wiederholter Elongation kommt, (Abb. 28 Spur 4 und 9) eine höhere Thermosensitivität von Rpb12 im Vergleich zu RpoP. Aus diesem Grund wurden Single Round Transkriptionen durchgeführt (Methoden 2.1.; Abb. 19 A). Rpb12 ist in der Lage nach Zugabe zum ΔP Enzym in Single Round Transkriptionen ca. dreiviertel der wt Aktivität wiederherzustellen (Abb. 19 A Spur 3). Abbildung 19 B zeigt eine Zeitreihe (4, 8, 30 min) mit einer Run-off Transkription, die zu den angegebene Zeitpunkten gestoppt und die RNA analysiert wurde. Zu derselben Menge ΔP RNAP wurde zum einen Rpb12 und zum anderen RpoP

zugegeben. Die Aktivität der RNAP mit RpoP wurde 100 % gesetzt und die Aktivität der RNAP mit Rpb12 wurde dazu in Beziehung gesetzt. Die RNAP mit Rpb12 hatte nach 4 Minuten noch 75 % der Aktivität der RNAP mit wt RpoP, nach 8 Minuten noch ca. 50 % und nach 30 Minuten nur noch 30 % (Abb. 19 B Spur 1+6; 2+5; 3+6; 3+6). Dies legt die Vermutung nahe, dass Rpb12, im Vergleich zu RpoP, schneller abgebaut wird und so der RNAP nicht mehr zur Verfügung steht. Die Aktivität nach 4 Minuten ist mit ca. dreiviertel der wt Aktivität vergleichbar mit der Aktivität in der Single Round Transkription. Rpb12 kann damit RpoP funktionell in der archaeellen RNAP ersetzen, zeigt allerdings eine erhöhte Thermosensitivität als RpoP. Beide getesteten eukaryotischen Untereinheiten sind demnach in der Lage die Funktion der entsprechenden archaeellen Untereinheiten *in vitro* zu erfüllen.

3. Welche Funktionen können den RNAP Untereinheiten RpoH und RpoP zugeordnet werden?

3.1. Analyse des ΔH Enzyms.

Für das ΔH Enzym konnten ausgeprägte Defekt in Run-off Transkriptionen nachgewiesen werden (Abb. 18 Spur 1). Die 6,5 fache Menge des Enzyms ist nötig, um eine mit dem wt Enzym vergleichbare Menge Transkript zu produzieren (Abb. 18 Spur 2). Vergleicht man gleiche Mengen an Enzym so hat das ΔH Enzym lediglich 15 % der wt Aktivität. Mit dem Ziel der Untereinheit RpoH eine Funktion zuordnen zu können wurde dieser schwere transkriptionelle Defekt des ΔH Enzyms näher untersucht. Es wurden zu diesem Zweck die aufeinanderfolgenden Schritte des Transkriptionszyklus detailliert untersucht.

Der erste Schritt ist die Transkriptionsfaktor vermittelte Rekrutierung der RNAP an die Promotor DNA. Dies wurde mit Hilfe eines Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) untersucht. Das ΔH Enzym kann hierbei über TBP und TFB an die Promotor DNA binden und einen stabilen Komplex ausbilden (Abb. 20 Spur 4). Die Aktivität ist im Vergleich zum wt Enzym (Abb. 20 Spur 2) allerdings reduziert (ca. 75 %).

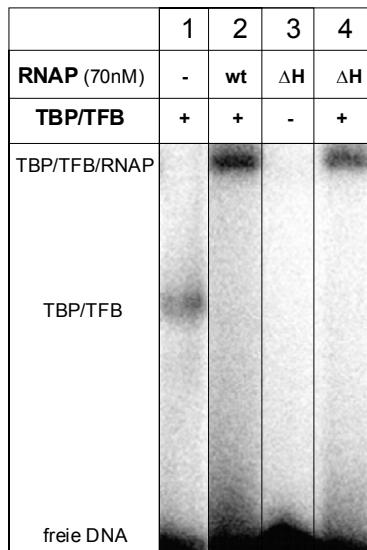


Abb. 20 Die ΔH RNAP bildet stabile Präinitiationskomplexe. Ein EMSA mit einer Bindesequenz aus dem *Pyrococcus GDH* Promotor (Goede *et al.*, 2006) wurde in Gegenwart von TBP, TFB und rekonstituierter RNAP, wie in der Abbildung angegeben, durchgeführt. Spur 1 zeigt den TBP/TFB Shift, Spur 2 den Komplex aus TBP/TFB und rekonstituierter RNAP. Spur 3 zeigt das ΔH Enzym in Abwesenheit von Transkriptionsfaktoren. In Spur 4 ist der Komplex aus ΔH RNAP in Gegenwart von TBP/TFB und Promotor DNA gezeigt.

Die abgeschwächte Aktivität in der Rekrutierung an die Promotor DNA kann die auf 15 % des wt verringerte Aktivität in der Run-off Transkription nicht vollständig erklären. Der auf die Rekrutierung folgende Schritt ist die Bildung eines offenen Komplexes. Dies wurde anhand eines Kaliumpermanganat Footprints untersucht, bei dem die Thymin im offenen Komplex detektiert werden können. Die durch das ΔH Enzym gebildete Transkriptionsblase ist kaum detektierbar (Abb. 21 Spur 2). Bei genauer Analyse des Footprints sind schwache Signale an der Position -4/-6 zu erkennen, allerdings keine Signale bei +2/+3. Dies könnte auf einen verkleinerten offenen Komplex hindeuten. Nach Zugabe von RpoH (Spur 3) und auch Rpb5 (Spur 4) in die Footprintreaktion war das ΔH Enzym wieder in der Lage, einen mit dem wt Enzym (Spur 5) vergleichbaren offenen Komplex zu bilden.

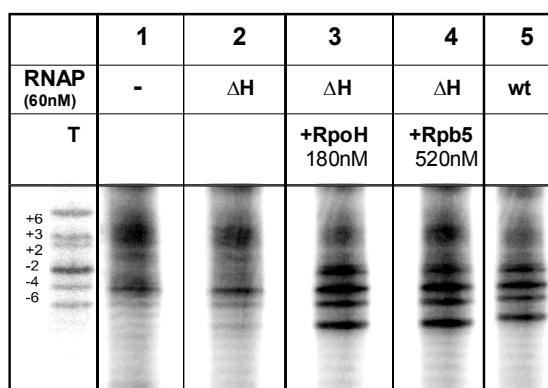


Abb. 21 Untereinheit RpoH ist für die Bildung eines offenen Komplexes erforderlich. Es wurde die DNA Öffnung durch die rekonstituierte ΔH RNAP mit Hilfe eines Kaliumpermanganat Footprints in An- und Abwesenheit von RpoH und Rpb5 untersucht. Die Zugabe der entsprechenden Proteine zum ΔH Enzym ist angegeben. Spur 1 zeigt die Negativkontrolle ohne RNAP, in Spur 4 wurde das rekonstituierte wt Enzym untersucht.

Ergebnisse

Diese beiden Ergebnisse weisen daraufhin, dass die RNAP ohne die Untereinheit RpoH zwar noch einigermaßen an den Promotor rekrutiert werden kann, aber nur wenige detektierbare offene Komplexe ausbildet.

Die höchste transkriptionelle Aktivität hatte das ΔH Enzym in einem abortiven Test, auf einer geschlossenen Matrize. Hier wird die Transkription durch ein Dinukleotid (GpU) gestartet und nach Zugabe von radioaktiv markiertem UTP kann ein Trinukleotid synthetisiert werden (Methoden 2.1.). In diesem Versuch zeigt die ΔH RNAP mit 37 % (Abb. 22 Spur 1 und 2) der wt Aktivität (Spur 5) eine doppelt so hohe Aktivität wie in den Run-off Transkriptionen.

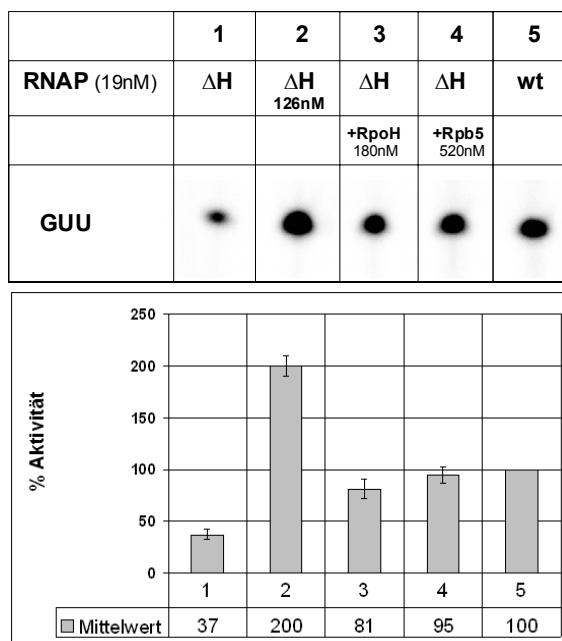


Abb. 22 Aktivität des ΔH Enzyms in der abortiven Transkription. Es wurde die Synthese eines 3 nt Transkriptes in An- und Abwesenheit von wt RpoH und Rpb5 analysiert. Die Reaktion wurde durch ein Dinukleotid (GpU) gestartet und auf einem 28 %igen PA Gel analysiert. Spur 1 und 2 zeigen die Aktivität des ΔH Enzyms wobei in Spur 1 die einfache Menge und in Spur 2 die 6,5 fache Menge an Enzym eingesetzt wurde. Spur 3 zeigt die Aktivität des ΔH Enzyms nach Zugabe von RpoH und Spur 4 nach Zugabe von Rpb5. Spur 5 zeigt die Aktivität des wt Enzyms. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der transkriptionellen Aktivitäten. Die Quantifizierung wurde wie in Abb. 19 beschrieben durchgeführt.

Die Zugabe der Untereinheiten RpoH (Spur 3) und Rpb5 (Spur 4) zur ΔH RNAP führen wiederum zur wt Aktivität von ΔH . Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis wäre, dass für die Synthese einer kurzen abortiven RNA auch ein unvollständig geformter offener Komplex ausreicht. Es ist wahrscheinlich dass das Dinukleotid zusätzlich stabilisierend auf die Bildung des offenen Komplexes wirkt.

Im Folgenden wurde die Elongationsfähigkeit des ΔH Enzyms genauer charakterisiert. In sogenannten Chase-Experimenten, in denen bei +20 gestellte ΔH RNAP Komplexe, durch Zugabe eines kompletten Satzes unmarkierter NTPs, ein Run-off herstellen, haben gezeigt, dass zwar wie erwartet weniger RNAP Komplexe durch das ΔH Enzym gebildet werden, diese aber genauso effektiv bis zum Run-off verlängert werden wie beim wt Enzym (Abb. 23 Spur 1 und 3). Sobald das ΔH Enzym den kritischen Schritt der Initiation überwunden hat und sich ein stabilisierendes DNA/RNA Hybrid gebildet hat, kann sie genauso effektiv elongieren wie das wt Enzym. Die

Ergebnisse

Zugabe von RpoH zu einer gestellten ΔH RNAP zeigte demzufolge auch keinen Einfluss (Abb. 23 Spur 4).

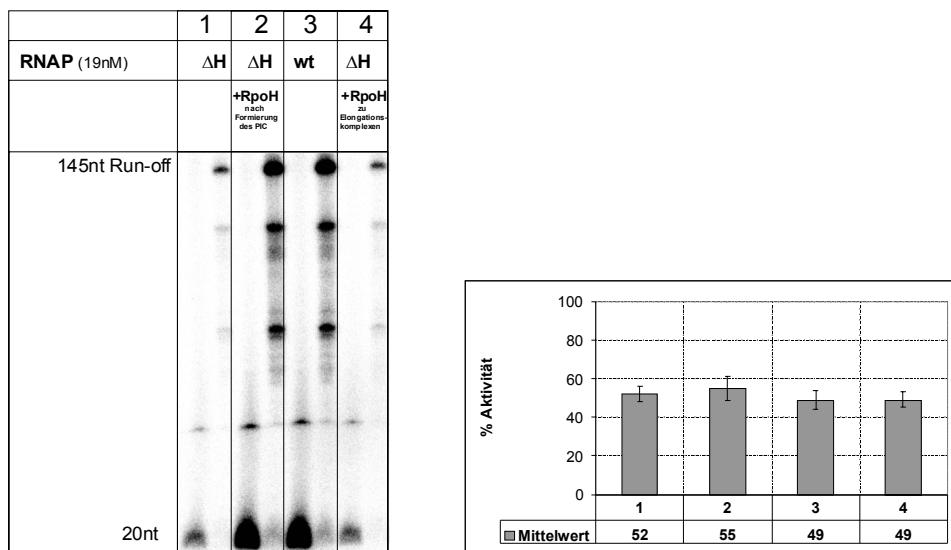


Abb. 23 Pausierte ΔH RNAP Komplexe können die RNA effektiv bis zum Run-off elongieren. Es wurden RNAP Komplexe bei Position +20 gestellt und gewaschen. Danach wurde die Reaktion auf zwei Aliquots aufgeteilt. Ein Teil des Ansatzes wurde daraufhin gestoppt (jeweils die vordere Spur). Im zweiten Ansatz wurde durch die Zugabe eines kompletten Satzes unmarkierter NTPs für eine Minute bei 70 °C die RNA bis zum Run-off verlängert (die jeweils zweite Spur). In Spur 1 wurde die Aktivität des ΔH Enzyms untersucht, in Spur 2 wurde vor der Bildung des Präinitiationskomplexes RpoH zur ΔH RNAP zugegeben. Spur 3 zeigt die Kontrollreaktion mit der rekonstituierten wt RNAP. In Spur 4 wurde RpoH zum isolierten Elongationskomplex der ΔH RNAP zugegeben. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte einer Quantifizierung, die wie in Abb. 19 beschrieben, durchgeführt wurde. Hierzu wurde die Transkriptmenge in bei +20 gestellten RNAP Komplexen zum gebildeten Run-off Transkript ins Verhältnis gesetzt.

Ein weiterer Elongationstest brachte ein auf den ersten Blick widersprüchliches Ergebnis. Bei der verwendeten künstlichen Elongationsmatrize muss die RNAP an einen kodierenden Strang, an den eine 13 nt RNA hybridisiert wurde, binden. Anschließend wird der komplementäre nichtkodierende Strang dazugegeben, so dass sich teilweise ein Doppelstrang ausbildet (Schema Abb. 13 B). Nach der Bindung muss die RNA verlängert und dabei der Doppelstrang aufgetrennt werden. Das ΔH Enzym zeigt auf dieser Matrize eine Aktivität von 26 % der wt RNAP (Abb. 24 Spur 1 und 4). Die Aktivität ist damit im Vergleich zur Run-off Transkription um 11 % erhöht (Abb. 18 Spur 1 und 6). Die Zugabe von RpoH zum ΔH Enzym führt auf dieser Matrize nicht zur vollständigen Wiederherstellung der wt Aktivität (Spur 3). Das Resultat im Chase-Experiment (Abb. 23 Spur 1) hätte auf dieser Elongationsmatrize wt Aktivität für das ΔH Enzym erwarten lassen. Für das ΔH Enzym konnte allerdings nur moderate Aktivität nachgewiesen werden. Dies könnte damit zusammenhängen, dass das Enzym sich in diesem Test erst korrekt an dem vorgegebenen DNA/RNA Hybrid positionieren muss. Ist dies wie bei +20 gestellten RNAP Komplexen eingetreten, kann die ΔH RNAP auch effektiv elongieren. Die Untereinheit RpoH könnte darüber hinaus eine Rolle bei der Bindung an die Matrize spielen oder das ΔH Enzym nimmt eine Konformation ein, die eine Bindung an die Matrize erschwert.

Ergebnisse

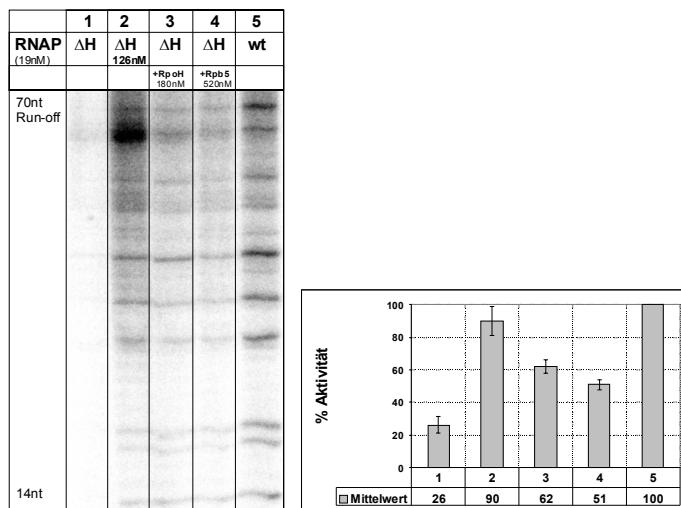


Abb. 24 Aktivität der ΔH RNAP auf einer Elongationsmatrize. Die verwendete Elongationsmatrize besteht aus einem Teilhybrid einer 13 nt RNA mit dem kodierenden Strang, zu der die RNAP gegeben wird. Die Matrize wurde anschließend durch Zugabe des komplementären nichtkodierenden Stranges vervollständigt (Schema Abb. 13 B; Kireeva *et al.*, 2000). Spur 1 und 2 zeigen die Aktivität des ΔH Enzyms wobei in Spur 1 die einfache Menge und in Spur 2 die 6,5 fache Menge an Enzym eingesetzt wurde. Spur 3 zeigt die Aktivität des ΔH Enzyms nach Zugabe von RpoH und Spur 4 nach Zugabe von Rpb5. Spur 5 zeigt die Aktivität des rekonstituierten wt Enzyms auf dieser Matrize.

Da für das ΔH Enzym eine stark verringerte Aktivität in der Bildung eines offenen Komplexes festgestellt wurde (Abb. 21 Spur 2), wurde das Enzym an einer künstlich vorgeformten Transkriptionsblase getestet (Schema Abb. 13 A). Es wurde hierbei ein abortiver Test durchgeführt, bei dem nach Zugabe eines Dinukleotids (GpC) eine 4 nt RNA synthetisiert wird (GCGG). Ein abortiver Test auf dieser Matrize ist vorteilhaft, da sekundäre Effekte, bedingt durch das fehlende Schließen des DNA Doppelstranges, vermieden werden. Der Versuch zeigt, dass die ΔH RNAP auch an einem vorgeformten offenen Komplex lediglich 15 % der wt Aktivität hat (Abb. 25 Spur 1 und 2). Nach Zugabe von RpoH (Spur 3) und Rpb5 (Spur 4) kann das ΔH Enzym wieder mit der gleichen Aktivität transkribieren wie das wt Enzym (Spur 5).

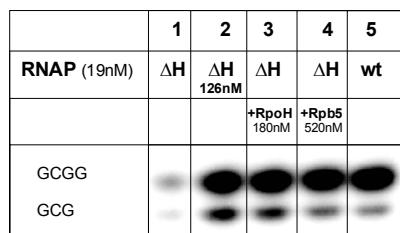


Abb. 25 Die ΔH RNAP hat eine geringe Aktivität an einer vorgeformten Transkriptionsblase. Es wurde die Fähigkeit des ΔH Enzyms zur Synthese eines 4 nt Transkriptes in Gegenwart von TBP und TFB an einer vorgeformten Transkriptionsblase untersucht. Die Reaktion wurde durch ein Dinukleotid (GpC) gestartet und auf einem 24 %igen PA Gel analysiert. Spur 1 zeigt die Aktivität des ΔH Enzyms. In Spur 2 wurde 6,5 fache Menge des ΔH Enzyms eingesetzt. Spur 3 zeigt die Aktivität des ΔH Enzyms nach Zugabe von RpoH und Spur 4 nach Zugabe von Rpb5. In Spur 4 wurde das rekonstituierte wt Enzym auf dieser Matrize untersucht.

In diesem abortiven Test an dem künstlich vorgeformten offenen Komplex (Abb. 25 Spur 1) konnte für das ΔH Enzym eine geringere Aktivität als in einem abortiven Test an einer

geschlossenen Matrize nachgewiesen werden (Abb. 22 Spur 1). Eine mögliche Folgerung aus diesem Versuch ist, dass das Enzym nicht nur einen Defekt in der Bildung eines offenen Komplexes hat, sondern darüber hinaus weitere Funktionen der RNAP gestört sind. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die ΔH RNAP an dieser Matrize Probleme bei der Bildung des DNA/RNA Hybrides und der korrekten Positionierung hat.

Die detaillierte Untersuchung der ΔH RNAP zeigte eine Vielzahl unterschiedlicher transkriptioneller Defekte auf. In ihrer Summe weisen diese Defekte darauf hin, dass ein essentieller Vorgang betroffen ist, der bereits in einem frühen Schritt des Transkriptionszyklus entscheidend ist. Das ΔH Enzym wird schlechter an die Promotor DNA rekrutiert und ist kaum in der Lage, einen vollständigen, stabilen offenen Komplex zu bilden was vermuten lässt, dass die Struktur des aktiven Zentrums und die korrekte Positionierung des DNA/RNA Hybrids betroffen ist. Diese Vermutung wird durch Erkenntnisse im eukaryotischen System, bei der zu RpoH homologen RNAP Untereinheit Rpb5 (Zaros *et al.*, 2007), unterstützt, demzufolge Rpb5 für eine korrekte Positionierung der Transkriptionsblase im aktiven Zentrum verantwortlich ist. Dies würde eine Erklärung für die beschriebenen Defekte der ΔH RNAP besonders in der Initiation liefern.

3.2. Analyse des ΔP Enzyms.

In 2.2. wurde bereits ein starker Defekt des ΔP Enzyms in Single Round Transkriptionen deutlich (Abb. 19 A Spur 1). Rpb12 ist in der Lage RpoP in der archaeellen RNAP zu ersetzen, zeigt allerdings eine erhöhte Thermosensitivität (Abb. 19 B). Es sollte daher untersucht werden, welcher Schritt im Transkriptionszyklus im ΔP Enzym gestört ist. Das Enzym wurde deshalb in EMSAs, Kaliumpermanganat Footprints, Run-off und abortiven Transkriptionsversuchen untersucht. Darüberhinaus wurden Elongationsmatritzen sowie eine vorgeformte Transkriptionsblase als Matrize verwendet. Mit dem Ziel einer Funktionszuordnung zur RpoP Untereinheit wurden außerdem mutierte Varianten sowie eine verkürzte Version der Untereinheit genauer charakterisiert.

Der erste Schritt im Transkriptionszyklus, die Rekrutierung an den Promotor, wurde mit Hilfe eines EMSA untersucht. Das ΔP Enzym ist hierbei in der Lage stabile Komplexe mit den an die Promotor DNA gebundenen Transkriptionsfaktoren TBP und TFB zu bilden (Abb. 26 Spur 3). Diese Aktivität unterscheidet sich nicht von der des wt Enzyms (Abb. 26 Spur 2) und kann durch Zugabe von RpoP auch nicht gesteigert werden (Abb. 26 Spur 4).

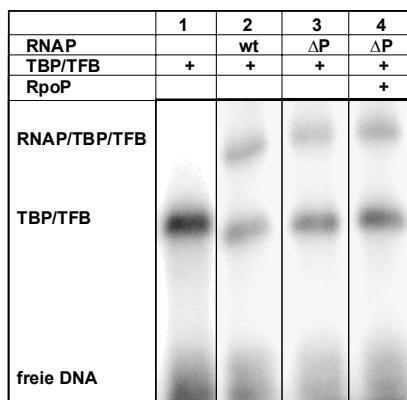


Abb. 26 Die ΔP RNAP bildet stabile Präinitiationskomplexe. Ein EMSA mit einer Bindesequenz aus dem *Pyrococcus GDH* Promotor (Goede *et al.*, 2006) wurde in Gegenwart von TBP, TFB und rekonstituierter RNAP, wie in der Abbildung angegeben, durchgeführt. Spur 1 zeigt den TBP/TFB Shift, Spur 2 den Komplex aus TBP/TFB und rekonstituierter RNAP. In Spur 3 ist der Shift gezeigt den das ΔP Enzym mit TBP/TFB produziert und in Spur 5 wurde noch 70 nM RpoP in die Bindereaktion zugesetzt.

Der nächste Schritt nach der Rekrutierung ist die Bildung eines offenen Komplexes. Dies wurde anhand eines Kaliumpermanganat Footprints untersucht, bei dem die Thymin im offenen Komplex detektiert werden können. Für das ΔP Enzym konnte keine offene Transkriptionsblase nachgewiesen werden (Abb. 27 Spur 2). Die Ergebnisse der beiden Tests weisen darauf hin, dass in Abwesenheit von RpoP die RNAP an den Promotor binden kann, sie aber Probleme in der Bildung eines offenen Komplexes hat.

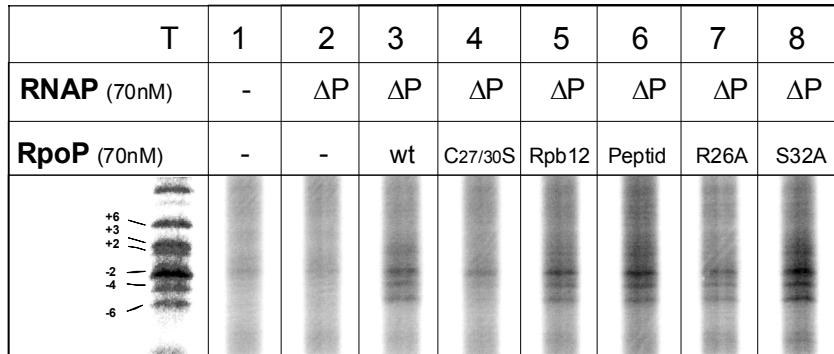


Abb. 27 Untereinheit RpoP ist für die Bildung eines offenen Komplexes erforderlich. Es wurde die DNA Öffnung durch die rekonstituierte ΔP RNAP mit Hilfe eines Kaliumpermanganat Footprints in An- und Abwesenheit von wt RpoP, mutierten Varianten, Rpb12 und dem C-terminalen Peptid untersucht. Die Zugabe der entsprechenden Proteine zum ΔP Enzym ist angegeben. Spur 1 zeigt die Negativkontrolle ohne RNAP.

Durch die Analyse von Run-off Transkriptionen konnte nachgewiesen werden, dass das ΔP Enzym noch in der Lage ist, kleinere Mengen an komplettem Transkript zu synthetisieren (Abb. 28 Spur 1 und 2). In Abb. 19 wurde bereits deutlich, dass die Aktivität des Enzyms durch die Zugabe von RpoP in die Transkriptionsreaktion wieder voll hergestellt werden kann (Abb. 19 A Spur 3; Abb. 28 Spur 3). Dieses Ergebnis kann so interpretiert werden, dass die RpoP Untereinheit während der Transkription korrekt in das assemblierte Enzym eingebaut werden kann und die Aktivität auf diese Weise wiederhergestellt.

Ergebnisse

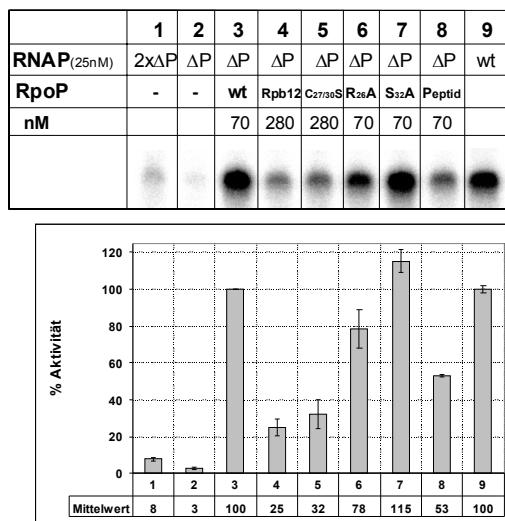


Abb. 28 Analyse der mutierten Varianten von RpoP und von Rpb12 in der Run-off Transkription. Es wurde die Synthese eines 113 nt Run-off Transkriptes vom *GDH* Promotor auf einem 6 %igen PA Gel analysiert. In Spur 1-9 wurde das ΔP Enzym nach Zugabe der jeweils angegebenen Menge von Rpb12 sowie den RpoP Varianten untersucht. Spur 10 zeigt eine Kontrolle mit rekonstituiertem wt Enzym. Im darunterliegenden Diagramm sind die Mittelwerte der transkriptionellen Aktivität dargestellt. Die Quantifizierung wurde wie in Abb. 19 beschrieben durchgeführt.

In einem abortiven Transkriptionsversuch, bei dem nur eine Phosphodiesterbindung ausgebildet werden muss und so aus einem Di- ein Trinukleotid entsteht, zeigt das ΔP Enzym eine leicht erhöhte Aktivität von 17 % des wt Enzyms (Abb. 29 Spur 1 und 2) im Vergleich zu 3 % in der Run-off Transkription (Abb. 28 Spur 2).

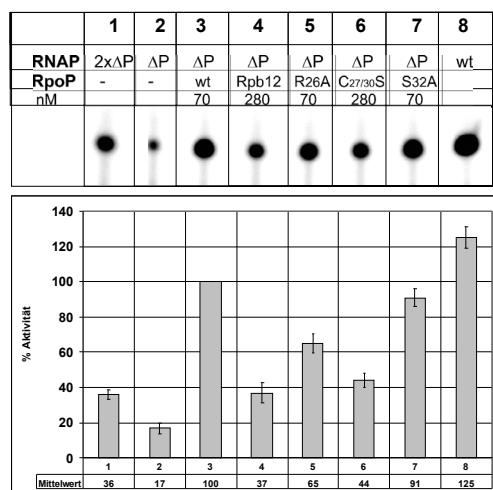


Abb. 29 Analyse der mutierten Varianten von RpoP und von Rpb12 in der abortiven Transkription. Es wurde die Synthese eines 3 nt Transkriptes in An- und Abwesenheit von wt RpoP, Rpb12 und RpoP Varianten analysiert. Spur 1 und 2 zeigen die Aktivität des ΔP Enzyms wobei in Spur 1 die doppelte Menge Enzym eingesetzt wurde. In Spur 3-7 wurden wie angegeben RpoP, Rpb12 und RpoP Varianten in die Reaktion gegeben. Spur 8 zeigt die Aktivität des wt Enzyms. Die RNA wurde auf einem 28 %igen PA Gel analysiert. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der transkriptionellen Aktivitäten. Die Quantifizierung wurde wie in Abb. 19 beschrieben durchgeführt.

Auf einer Elongationsmatrix (Schema Abb. 13 B) bei der ein 13 nt RNA Primer, zum Teil fusioniert an den kodierenden Strang, verlängert wird und so mit der RNAP einen

Elongationskomplex darstellt, konnte für das ΔP Enzym 50 % der wt Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 30 Spur 1 und 2). Dies deutet darauf hin, dass das ΔP Enzym den Elongationsschritt im Transkriptionszyklus effektiv durchführen kann.

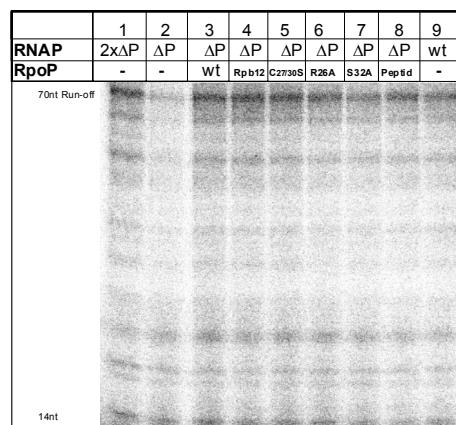


Abb. 30 Transkription der mutierten Varianten von RpoP und von Rpb12 auf einer Elongationsmatrize. Die verwendete Elongationsmatrize besteht aus einem Teilihybrid einer 13 nt RNA mit dem kodierenden Strang, zu der die RNAP gegeben wird. Die Matrize wurde anschließend durch Zugabe des komplementären nichtkodierenden Stranges vervollständigt (Kireeva *et al.*, 2000; Schema Abb. 13 B). In Spur 1-8 ist die Aktivität des ΔP Enzyms mit und ohne Zugabe von 70 nM wt RpoP, Rpb12 und RpoP Varianten zur Transkriptionsreaktion dargestellt. Spur 9 zeigt die Aktivität des rekonstituierten wt Enzyms auf dieser Matrize.

In Abb. 19 wurde bereits angedeutet, dass Rpb12 die Untereinheit RpoP funktionell ersetzen kann. Das rekonstituierte Enzym mit Rpb12 zeigte darüber hinaus ein mit dem wt Enzym vergleichbares Elutionsschema in der Gelfiltrationschromatographie (Abb. A1), dem letzten Schritt der Rekonstitutionsprozedur. Dies deutet auf eine korrekte Assemblierung der eukaryotischen Untereinheit mit dem archaeellen Enzym hin. Die Aktivität des rekonstituierten Enzyms war im Vergleich zum ΔP Enzym deutlich erhöht (Daten nicht gezeigt) und Rpb12 konnte in der archaeellen RNAP nachgewiesen werden (Abb. 17 Spur 4).

Im Run-off Transkriptionen (Abb. 28 Spur 4) war es durch die Zugabe von Rpb12 möglich, die Aktivität des ΔP Enzyms um 22 % zu steigern. Die angesprochene Thermosensitivität von Rpb12 spielt hier allerdings eine ausschlaggebende Rolle, da diese Versuche für 30 Minuten bei 70 °C durchgeführt werden. Die Zeitreihe (Abb. 19 B) verdeutlicht eine erhöhte Thermosensitivität von Rpb12. Aus diesem Grund wurden wie beschrieben Single Round Transkription durchgeführt. Nach 4 Minuten wurde durch Zugabe von Rpb12 die Aktivität des ΔP Enzyms auf 75 % (Abb. 19 B Spur 1 und 4) der wt Aktivität gesteigert. In der Single Round Transkription wurde eine vergleichbare Aktivität von 69 % erreicht (Abb. 19 A Spur 3).

Diese Daten zeigen, dass Rpb12 mit Untereinheiten des archaeellen Enzyms interagieren kann und RpoP funktionell ersetzen kann.

Diese Aussage wird auch durch Kaliumpermanganat Footprintingversuche untermauert (Abb. 27 Spur 5). Diese Versuche werden für 5 Minuten bei 70 °C durchgeführt. Das ΔP Enzym zeigte hier kaum Aktivität. Die Zugabe von RpoP (Spur 3) und Rpb12 (Spur 5) führte aber zur Bildung eines offenen Komplexes, der dem des wt Enzyms entspricht. Es ist wahrscheinlich, dass die wt Aktivität nach Zugabe von Rpb12 durch die kurze Inkubationszeit möglich wurde. Die

Bildung eines offenen Komplexes weist damit zusätzlich darauf hin, dass Rpb12 im Prinzip die Rolle von RpoP übernehmen kann. Die Analyse wird allerdings durch die unterschiedliche Stabilität der Untereinheiten aus der Hefe und aus *Pyrococcus* erschwert.

Mit dem Ziel, den unterschiedlichen Strukturen der RpoP Untereinheit eine Funktion zuzuordnen wurden einige Positionen mutiert, sowie eine 17 Aminosäuren (As) lange C-terminale Domäne des Proteins synthetisiert und das Peptid in Transkriptionsreaktionen analysiert.

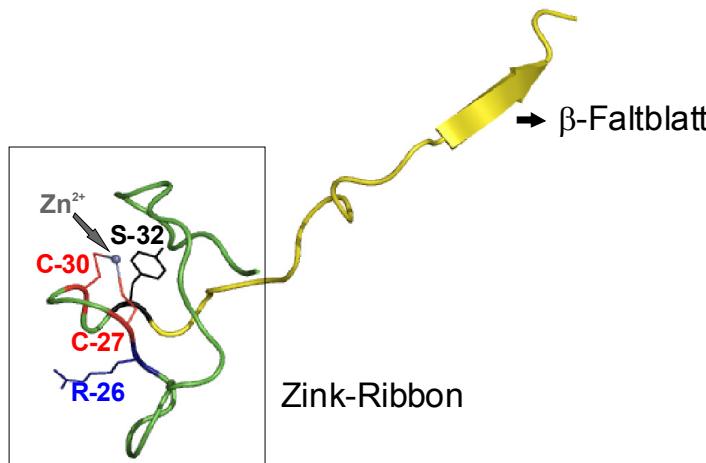


Abb. 31 Sekundärstruktur der RNAP Untereinheit RpoP. Ein Modell der Untereinheit RpoP von *Sulfolobus solfataricus* (Hirata et al., 2008) dargestellt mit Hilfe von PyMOL. Es wurden in der *Sulfolobus* Struktur die in dieser Studie wichtigen Elemente der *Pyrococcus* Untereinheit hervorgehoben. Die mutierten As wurden mit Seitenketten dargestellt und farbig hervorgehoben. Das 17 As umfassende synthetisierte Peptid wurde in gelber Farbe dargestellt, die N-terminale Domäne in grün. Die Cysteine 27 und 30 die durch Serin ersetzt wurden sind rot dargestellt, Arginin 26 ersetzt durch Alanin in blau und Serin 32 (Tryptophan bei *Sulfolobus*) ersetzt durch Alanin in schwarz.

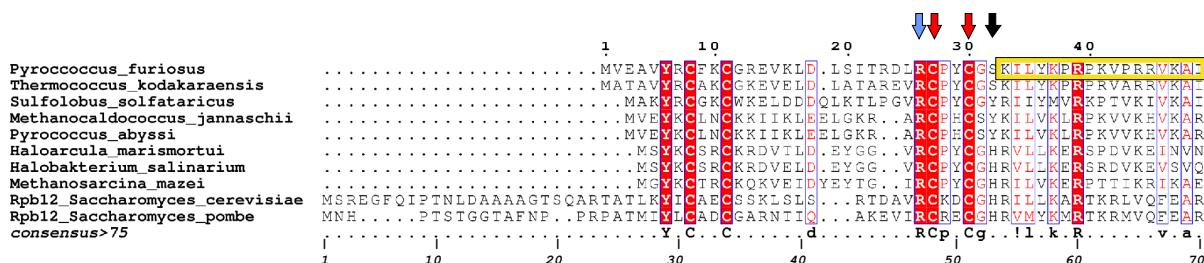


Abb. 32 Konservierte Elemente der Untereinheit RpoP und Rpb12. Alignment von acht verschiedenen archaealen RpoP Proteinsequenzen und zwei Rpb12 Sequenzen aus der Hefe. Das Alignment wurde mit ClustalW Version 2.0 (Larkin et al., 2007) berechnet und mit Hilfe des ESPript Programms (Gouet et al., 1999) dargestellt. Die angegebene Konsensussequenz wurde über eine Risler Matrix mit einem globalen Ähnlichkeitswert von 0,75 % berechnet (Großbuchstaben geben eine genaue Übereinstimmung an, Kleinbuchstaben Übereinstimmung auf Konsensusebene). Die Sequenz des C-terminalen Peptids ist mit einem gelben Kasten markiert und die in die Untereinheit eingeführten Punktmutationen sind durch Pfeile hervorgehoben. Die Nummerierung in der ersten Reihe bezieht sich auf die Aminosäuresequenz von RpoP aus *P. furiosus* (1-49). Die kursive Nummerierung in der letzten Reihe ist bezogen auf die Aminosäuresequenz von Rpb12 aus *S. cerevisiae* (1-70).

Der N-terminale Teil der RpoP Untereinheit besteht aus einem hochkonservierten Zink-Ribbon (Abb. 31). Die beiden Cysteine in Position 27 und 30 wurden daher durch Serine ersetzt, um auf diese Weise das Zink-Ribbon aufzubrechen. Zusätzlich wurde ein konserviertes Arginin an Position 26 und ein nichtkonserviertes Serin an Position 32 jeweils durch Alanin ersetzt. Die mutierten Untereinheiten wurden in *E. coli* heterolog exprimiert. Der Rohextrakt wurde hierbei

wie bei wt RpoP in einem Hitzeschritt (10 Minuten bei 70 °C Methoden 2.8.) behandelt. Alle Varianten waren nach dieser Hitzbehandlung stabil. Darüber hinaus zeigten alle Proteine ein ähnliches Elutionsprofil bei der Kationenaustauschchromatographie wie der wt (Abb. A1). Dies lässt den Schluss zu, dass alle Varianten in löslicher Form vorlagen.

Die Aktivität der S32A Mutante war in Run-off (Abb. 28 Spur 7) und abortiven Transkriptionen (Abb. 29 Spur 7) sowie auf einer Elongationsmatrix (Abb. 30 Spur 7) mit dem wt vergleichbar. In Footprintversuchen war die Sensitivität des offenen Komplexes sogar leicht erhöht im Vergleich zum wt RpoP (Abb. 27 Spur 3 und 8). Dies weist darauf hin, dass diese Aminosäure keinen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität von RpoP hat. Die Analyse der R26A Mutante zeigte wt Aktivität im Kaliumpermanganat-Footprint (Abb. 27 Spur 7) und Transkriptionen an Elongationsmatrizen (Abb. 30 Spur 6). Die Aktivität in Run-off (Abb. 28 Spur 6) und abortiver Transkription (Abb. 29 Spur 5) war im Vergleich zum wt leicht reduziert.

Im Gegensatz dazu konnte für die C27/30S Mutante ein schwerer Defekt in der Bildung des offenen Komplexes, genauso wie in der Run-off und abortiven Transkription nachgewiesen werden (Abb. 27 Spur 4; Abb. 28 Spur 5; Abb. 29 Spur 6). Um sicherzustellen, dass die verringerte Aktivität der Mutante nicht durch eine verringerte Hitzestabilität bedingt ist, wurde die Mutante wie Rpb12 in einer Zeitreihe in der Run-off Transkription sowie in der Single Round Transkription untersucht (Abb. 33 und 34).

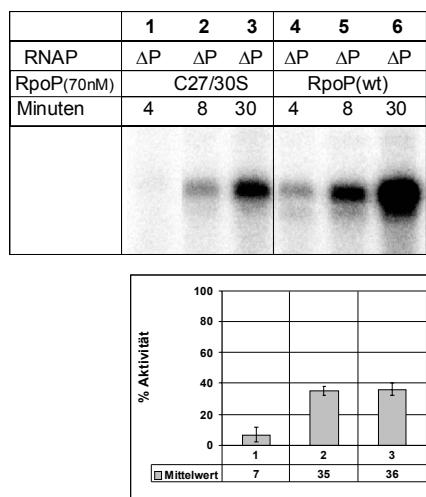


Abb. 33 Die C27/30S Mutante von RpoP besitzt in der Transkriptionsreaktion eine ähnliche Stabilität wie wt RpoP. Quantifizierung der transkriptionellen Aktivität der ΔP RNAP mit der C27/30S Variante im Vergleich zu wt RpoP in Run-off Versuchen. Es wurde die Transkriptmenge nach 4, 8 und 30 Minuten Inkubationszeit bei 70 °C gemessen, wobei die Aktivität, die durch Zugabe von RpoP entstanden ist, 100 % gesetzt wurde. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der transkriptionellen Aktivität nach Zugabe der C27/30S Mutante (Spur 1-3) relativ zu wt RpoP (Spur 4-6).

Die Aktivität in der Run-off Transkription betrug nach 8 und 30 Minuten ca. 35 % der Aktivität von Reaktionen mit wt RpoP (Abb. 33 Spur 2+3, 5+6). Dies lässt vermuten, dass die Mutante eine ähnliche Thermostabilität wie wt RpoP aufweist. Eingesetzt in der Single Round Transkription zeigt die Mutante lediglich 14 % der Aktivität, die durch Zugabe der wt Untereinheit entsteht (Abb. 34 Spur 3).

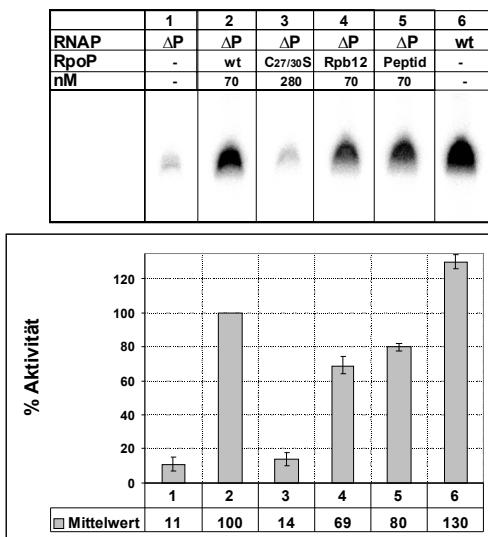


Abb. 34 Analyse der mutierten Varianten von RpoP und von Rpb12 in der Single Round Transkription. Es wurden RNAP Komplexe bei +20 gestellt und die Wiederaufnahme der Transkription untersucht. Die Abbildung zeigt das Run-off Produkt, dass nach Zugabe eines kompletten Satzes NTPs, synthetisiert wurde (Die RNA der bei +20 gestellten Komplexe ist in Abb. 37 gezeigt). In Spur 1-5 wurde die Aktivität des ΔP Enzyms nach Zugabe der fehlenden Untereinheit bestimmt. Spur 6 zeigt als Kontrolle die Aktivität des wt Enzyms. Die RNA wurde wie in Abb. 19 beschrieben analysiert und quantifiziert.

Es ist wahrscheinlich, dass die Zink-Ribbon Variante starke funktionelle Defekte aufweist, diese aber nicht durch eine geringere Stabilität des Proteins begründet sind.

Zur Analyse der Sekundärstrukturelemente dieser Untereinheit wurden CD Spektren der Untereinheit RpoP, aller Varianten und des C-terminalen Peptids aufgenommen (Abb. 34 A). In der einzigen bisher verfügbaren Struktur, in der RpoP im Komplex mit der RNAP vorliegt (Hirata *et al.*, 2008), sind lediglich zwei Strukturelemente, das Zink-Ribbon im N-terminalen Bereich und ein β-Faltblatt im C-terminalen Bereich, zu erkennen (Abb. 31). Aufgrund der angesprochenen Funktionsdefekte der Zink-Ribbon Mutante (Abb. 27, 29, 34) war es deshalb von besonderem Interesse, ob in dieser Variante Veränderungen in der Sekundärstruktur im Vergleich zum wt auftreten und, ob das C-terminalen Peptid überhaupt in der Lage ist, eine Struktur auszubilden. Zu diesem Zweck wurden die Proteine in 10 mM Kaliumphosphatpuffer umgepuffert, um mit der Messung interferierende Substanzen aus der Lösung zu entfernen. Das Spektrum von wt RpoP lässt eine definierte Struktur erkennen, die nach langsamem Erhitzen des Proteins auf 100 °C deutlich zurückgeht (Abb. 34 B). Vergleicht man dieses Spektrum mit Standardspektren für α-helicale Strukturen sowie β-Faltblätter (Abb. 8 Seite 30), deutet das wt Spektrum von RpoP auf das Vorhandensein von β-Faltblättern hin. Dies wäre aus der Kristallstruktur (Abb. 31) auch zu erwarten gewesen. Aus dem Vergleich des RpoP Spektrums vor und nach Erhitzen auf 100 °C kann gefolgert werden, dass bei RT eine definierte Struktur vorliegt, die gleichmäßig zurückgeht. Es ist daher wahrscheinlich, dass nur eine definierte Struktur vorliegt und z. B. keine Mischung aus α-helicalen Bereichen und β-Faltblättern vorhanden ist, da die unterschiedlichen Strukturen sich nicht simultan in der Auffaltung verhalten würden. Die R26A Variante zeigt ein nahezu identisches Spektrum wie wt RpoP (Abb. 34 A). Das Spektrum der S32A Variante zeigt im Gegensatz zum wt und zur R26A Variante geringfügige Abweichungen im Vergleich zu wt Spektrum, was auf kleine strukturelle Veränderungen hindeutet. Die Ergebnisse der CD Spektroskopie bestätigen damit die Aktivität dieser Varianten in Transkriptionsversuchen und

Kaliumpermanganat Footprints in denen wt Aktivität für die S32A Variante (Abb. 27 Spur 8; Abb. 28 Spur 7) und eine leicht reduzierte Aktivität der R26A Mutante (Abb. 27 Spur 7; Abb. 28 Spur 6) nachgewiesen wurde. Das Peptid zeigt die Charakteristika eines ungefalteten Peptids (Abb. 34 A) und bildet seine Struktur damit sehr wahrscheinlich erst in der Interaktion mit der RNAP aus, da es in Transkriptionstests das ΔP Enzym auf 80 % des wt aktivieren kann (Abb. 34 Spur 5).

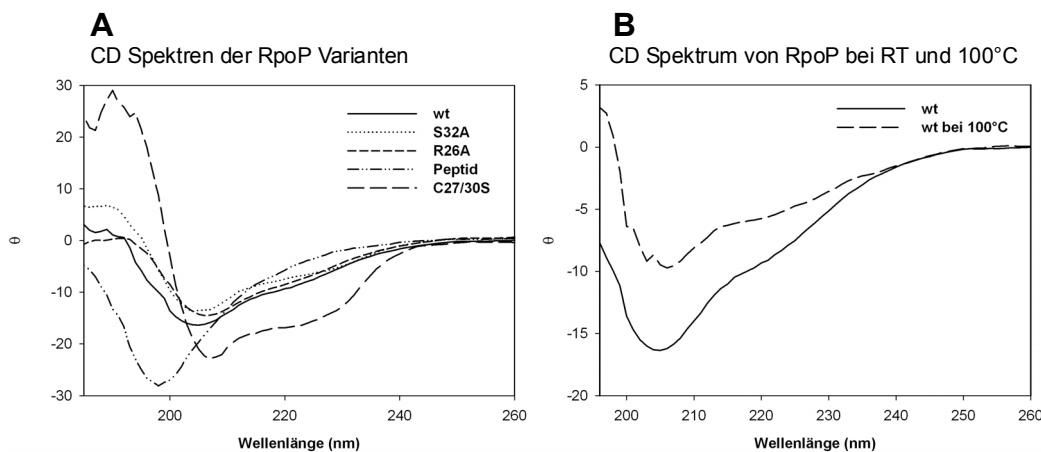


Abb. 35 Die Zink-Ribbon Variante von RpoP besitzt eine veränderte Sekundärstruktur. A. Die CD Spektren von wt RpoP, der drei Varianten (S32A, R26A, C27/30S) und des C-terminalen Peptids wurden in 10 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5) bei 23 °C im Fern-UV Bereich von 180-260 nm (siehe Legende in der Abb.) aufgenommen. B. CD Spektrum von wt RpoP (Messung wie unter A beschrieben) vor und nach einer Auffaltungsmessung von 23-100 °C (1°C pro Minute). Die Y-Achse gibt die molare Elliptizität an ($\text{Grad} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$) und die X-Achse die Wellenlänge in nm.

Am interessantesten sind die Ergebnisse zur Zink-Ribbon Variante. Das Spektrum dieser Variante weist deutliche Abweichungen vom wt Profil auf. Zwei Minima, sowie ein frühen Durchtritt der Nulllinie, deuten dabei auf eine α -helicale Struktur hin (Abb. 8). Man kann daraus folgern, dass durch die Mutationen C27/30S eine drastische Veränderung der Struktur der Untereinheit stattgefunden hat. Es ist wahrscheinlich, dass das Zink-Ribbon in der Tat aufgebrochen wurde. Dadurch bildete das Protein in der Folge spontan eine α -helicale Struktur aus. Diese Struktur behindert sehr wahrscheinlich die Interaktion mit der RNAP und erklärt, die stark reduzierte Aktivität in den Transkriptionsversuchen.

Die Daten aus der CD Spektroskopie deuten daraufhin, dass die Zink-Ribbon Mutante in ihrer Struktur gestört ist und eine veränderte Faltung der Untereinheit die Interaktion mit dem Enzym beeinträchtigt (Abb. 35 A). Dies lässt sich auch aus der Analyse der Single Round Transkription schließen. Hier entsteht durch die Zugabe des C-terminalen Peptids, dem das Zink-Ribbon komplett fehlt, eine 5,5 fach höhere Aktivität, als durch die Zugabe der Zink-Ribbon Mutante (Abb. 34 Spur 3 und 5). Mit dem Ziel, die Interaktion der mutierten Untereinheit mit der RNAP genauer zu untersuchen, wurde die archaeelle RNAP mit der C27/30S Mutante rekonstituiert und als letzten Schritt über Gelfiltrationschromatographie aufgereinigt. Die RNAP mit der Zink-Ribbon Variante zeigte ein vergleichbares Elutionsschema wie die wt RNAP (Abb. A1). Aktive RNAP Fraktionen wurden daraufhin in einer SDS-PAGE aufgetrennt und ein anschließender Westernblot mit Antikörpern gegen die RpoP Untereinheit lies ein deutliches Signal (Abb. 36 A) erkennen.

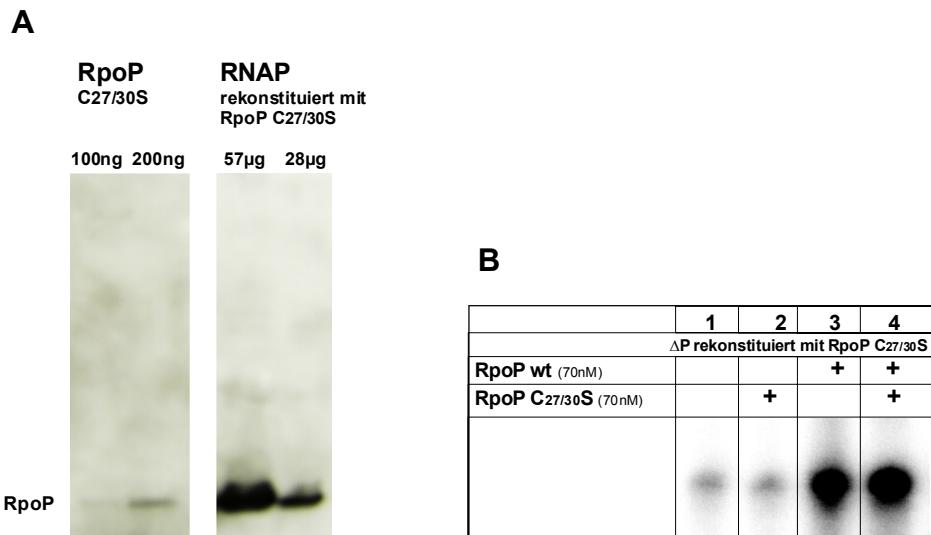


Abb. 36 Die Zink-Ribbon Mutante von RpoP wird in der rekonstituierten RNAP schnell durch wt RpoP ersetzt. *A* Die Zink-Ribbon Mutante eluiert in der Superdex-Fraktion der rekonstituierten RNAP. Ein Westernblot mit polyklonalen Antikörpern gegen RpoP wurde mit der C27/30S Mutante (linke Spur) und mit rekonstituierter RNAP (assembliert mit der C27/30S Variante; rechte Spur) durchgeführt. Es wurden die angegebenen Mengen Protein eingesetzt. Für die Detektion der gebundenen Antikörper wurde ein Chemilumineszenzsubstrat (Lumi-light, Roche) verwendet. *B* Die RNAP interagiert bevorzugt mit wt RpoP. Eine Run-off Transkription mit der ΔP RNAP, die mit der RpoP Mutante C27/30S rekonstituiert wurde, ist gezeigt. Spur 1 zeigt die Aktivität des rekonstituierten Enzyms. In Spur 2 wurde noch zusätzlich die C27/30S Mutante zugegeben. Spur 3 zeigt eine drastische Aktivierung des Enzyms durch Zugabe von wt RpoP in die Reaktion. In Spur 4 wurde die mutierte Variante und wt RpoP im Überschuss in die Transkriptionsreaktion gegeben.

Hieraus kann man schließen, dass die mutierte Untereinheit in die rekonstituierte RNAP eingebaut wurde. Das resultierende Enzym besaß im Vergleich zum ΔP Enzym eine um 35 % erhöhte Aktivität (Daten nicht gezeigt). Diese Aktivität kann durch zusätzliche C27/30S Untereinheit nicht weiter gesteigert werden (Abb. 36 B Spur 2). Hingegen konnte durch Zugabe der wt RpoP Untereinheit zum Enzym mit assemblierter C27/30S Mutante eine deutliche Steigerung der Aktivität erreicht werden (Abb. 36 B Spur 3). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die wt Untereinheit die wahrscheinlich locker assoziierte Zink-Ribbon Mutante in der rekonstituierten RNAP schnell ersetzen kann. Gibt man wt und mutierte Untereinheit zur rekonstituierten RNAP, so liegt die Steigerung der Aktivität in derselben Größenordnung, als wäre lediglich wt RpoP zugegeben worden (Abb. 36 B Spur 4). Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass wt RpoP bevorzugt in die RNAP eingebaut wird und dass das Enzym anschließend eine Konformation einnimmt, die einen Austausch gegen die mutierte Variante ausschließt.

Das weite konservierte Strukturelement neben dem Zink-Ribbon ist die basische C-terminale Domäne. Im Folgenden wurde der Einfluss dieser Domäne auf die archaeelle RNAP untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein 17 As langes Peptid (Abb. 31 und 32 gelb eingefärbt) verwendet. Die Analyse der transkriptionellen Aktivität zeigte, dass das ΔP Enzym mit dem Peptid in der Run-off Transkription nur eingeschränkt aktiv war (Abb. 28 Spur 8). In der Single Round Transkription hingegen konnte das Peptid 80 % der wt Aktivität wiederherstellen (Abb. 34 Spur 5). Dies legte die Vermutung nahe, dass das Peptid genau wie Rpb12 hitzempfindlicher als RpoP ist. Um dies zu bestätigen wurde auch das Peptid in einer Zeitreihe in der Run-off Transkription untersucht (Abb. 37).

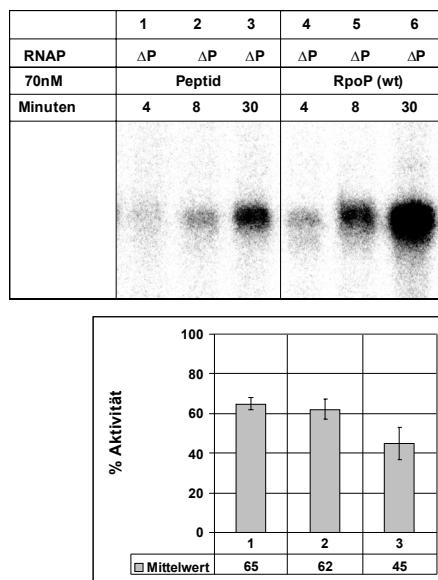


Abb. 37 Das C-terminale Peptid besitzt eine verringerte Stabilität in der Transkriptionsreaktion. Quantifizierung der transkriptionellen Aktivität der ΔP RNAP mit dem 17 As langen C-terminalen Peptid im Vergleich zu wt RpoP in Run-off Versuchen. Es wurde die Transkriptmenge nach 4, 8 und 30 Minuten Inkubationszeit bei 70 °C gemessen, wobei die Aktivität, die durch Zugabe von RpoP entstanden ist, 100 % gesetzt wurde. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der transkriptionellen Aktivität nach Zugabe des Peptids (Spur 1-3) relativ zu wt RpoP (Spur 4-6).

Die Zugabe des Peptids führt nach 8 Minuten zu 60 % und nach 30 Minuten zu lediglich 45 % der Aktivität von Reaktion in die wt RpoP zugegeben wurde (Abb. 37 Spur 2+3, 5+6). Das Peptid scheint daher bei 70 °C schneller als RpoP abgebaut zu werden. Dies ist wahrscheinlich einer der Gründe für eine reduzierte Aktivität in der Run-off Transkription.

Hingegen konnte das ΔP Enzym nach Zugabe des Peptids einen vollständig offenen Komplex bilden und besaß wt Aktivität auf einer Elongationsmatrize (Abb. 27 Spur 6; Abb. 30 Spur 8). Hier war auch die Zink-Ribbon Variante aktiv, jedoch war sie nicht in der Lage, die Bildung eines offenen Komplexes zu unterstützen (Abb. 27 Spur 4; Abb. 30 Spur 5).

Chase-Experimente, in denen bei +20 gestellte ΔP RNAP Komplexe durch Zugabe eines kompletten Satzes unmarkierter NTPs ein Run-off herstellen, haben gezeigt, dass durch die Zugabe der C27/30S Variante und des Peptids alle Komplexe bis zum Run-off transkribieren konnten (Abb. 38 Spur 3 und 5).

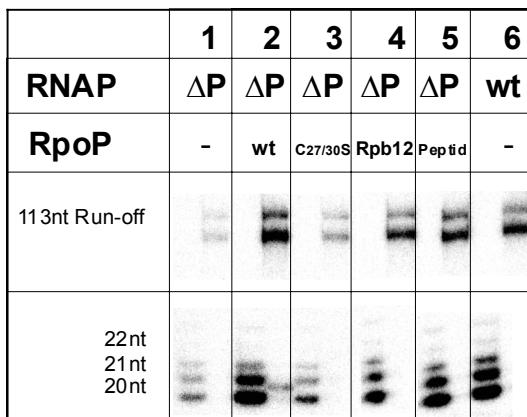


Abb. 38 Wiederaufnahme der Transkription von pausierten RNAP Komplexen mit mutierten RpoP Varianten in der Single Round Transkription. Es wurden bei Position +20 RNAP Komplexe gestellt und gewaschen. Danach wurde die Reaktion auf zwei Aliquots aufgeteilt. Ein Teil des Ansatzes wurde daraufhin auf einem 20 %igen Sequenziergel analysiert (jeweils die vordere Spur). Im zweiten Ansatz wurde, wie bereits in Abb. 23 beschrieben, durch die Zugabe eines kompletten Satzes unmarkierter NTPs für drei Minuten bei 70 °C die RNA bis zum Run-off verlängert (die jeweils zweite Spur). In Spur 1-5 wurde die Aktivität des ΔP Enzyms nach Zugabe von 70 nM der verschiedenen RpoP Varianten, wt RpoP und Rpb12 analysiert. Spur 6 zeigt die Kontrollreaktion mit der rekonstituierten wt RNAP.

Aus diesen Ergebnissen kann man folgern, dass das konservierte N-terminale Zink-Ribbon nicht für die Elongation benötigt wird, aber eventuell eine Aufgabe im Übergang von Initiation zu Elongation hat. Das 17 As Peptid scheint im archaeellen *in vitro* System ausreichend zu sein, um alle basalen Aufgaben in der RNAP zu erfüllen.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen deutlich, dass die C terminale Domäne von RpoP eine wichtige Aufgabe in der Bildung des offenen Komplexes hat (Abb. 27 Spur 6). Mit dem Ziel dieses Ergebnis weiter zu untermauern, wurde die Aktivität des ΔP Enzyms an einer vorgeformten Transkriptionsblase untersucht, bei der die Bildung eines offenen Komplexes umgangen wird (Abb. 39; Schema Abb. 13 A). Es wurde ein abortiver Test an dieser Matrize durchgeführt, um sekundäre Effekte, die z. B. durch das fehlende Schließen der Matrize entstehen, auszuschließen. Die Reaktion wurde durch ein Dinukleotid (GpC) gestartet und es wurde für 7 Minuten bei 70 °C ein Tetranukleotid synthetisiert.

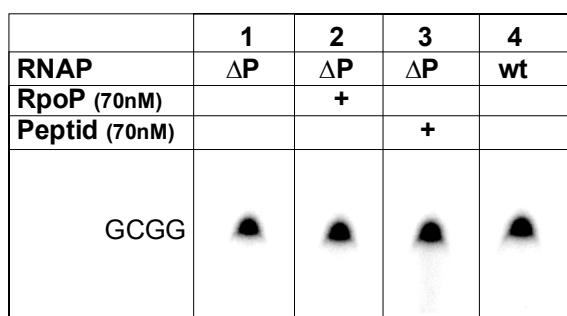


Abb. 39 Die ΔP RNAP kann an einer vorgeformten Transkriptionsblase effektiv transkribieren. Es wurde die Fähigkeit des ΔP Enzyms zur Synthese eines 4 nt Transkriptes in Gegenwart von TBP und TFB an einer vorgeformten Transkriptionsblase untersucht (Schema Abb. 13 A). Die Reaktion wurde durch ein Dinukleotid (GpC) gestartet und auf einem 24 %igen PA Gel analysiert. Spur 1 zeigt die Aktivität des ΔP Enzyms. In Spur 2 wurde wt RpoP zusätzlich in die Reaktion gegeben und in Spur 3 das C-terminale Peptid. In Spur 4 wurde das rekonstituierte wt Enzym auf dieser Matrize untersucht.

Ergebnisse

Die Analyse des wt Enzyms, von ΔP alleine sowie von ΔP nach Zugabe von wt RpoP oder C-terminalem Peptid lies eine sehr ähnliche Aktivität erkennen (Abb. 39 Spur 1-4). Die nahezu 100 %ige Aktivität von ΔP in diesem Ansatz ist ein weiterer Hinweis darauf, dass der C-terminale Teil von RpoP eine Rolle bei der Bildung des offenen Komplexes spielt. Zusätzlich kann man folgern, dass die basale Aktivität des Enzyms ohne RpoP nicht beeinträchtigt ist, was wiederum darauf schließen lässt, dass die Architektur und Synthesefähigkeit des gesamten Enzyms in Abwesenheit von RpoP erhalten bleibt.

Das archaeelle *in vitro* System mit der rekonstituierten RNAP ermöglichte über die detaillierte Analyse des ΔP Enzyms erstmals eine spezifische Funktionszuordnung zur Untereinheit RpoP.

Diskussion

Die archaeelle Untereinheit RpoP kann die Hauptfunktionen von Rpb12 *in vivo* erfüllen.

Alle hier behandelten eukaryotischen Untereinheiten sind gemeinsame Untereinheiten der RNAP I, II, III. Die getesteten archaeellen Untereinheiten RpoH, RpoK und RpoL waren nicht in der Lage, die letalen Phänotypen der Deletion des wt Allels *in vivo* zu kompensieren. Selbst in Fusion mit der entsprechenden eukaryotischen N-terminalen Domäne, die den archaeellen Untereinheiten fehlen, konnten RpoH und RpoK die essentiellen Funktionen der wt Untereinheit nicht ausführen. Die Gründe hierfür können vielfältig sein. Eine Möglichkeit wäre ein schneller Abbau der fremden Untereinheit in der Zelle. Der Nachweis der RpoH Untereinheit im Heferohextrakt (Abb. 14 Spur 7) lässt dies allerdings als wenig wahrscheinlich erscheinen. Auch eine möglicherweise gestörte Synthese der archaeellen Untereinheit aufgrund der unterschiedlichen Codon Usage kann wenigstens für die RpoH Untereinheit ausgeschlossen werden. Das Fusionsprotein aus der N-terminalen Domäne von Rpb5 und RpoH konnte in der RNAP nachgewiesen werden. Folglich wäre die einfachste Erklärung, dass die getesteten archaeellen Untereinheiten wichtige Funktionen in der eukaryotischen RNAP z. B. in Zusammenhang mit der Genregulation nicht mehr ausführen können (Tab. 1).

In einem Fall konnte die essentielle Funktion einer eukaryotischen Untereinheit durch eine archaeelle Untereinheit ausgeführt werden. Dies war mit der kleinsten Untereinheit des Enzyms möglich. RpoP alleine und in Fusion mit der N-terminalen Domäne von Rpb12 war unter der Kontrolle eines starken Promoters in der Lage alle essentiellen Funktionen von Rpb12 *in vivo* durchzuführen (Abb. 9). Rpb12 ist zwischen dem Hefe und dem humanen Enzym austauschbar (Shpakovski *et al.*, 1995) und die Interaktionsoberflächen dieser Untereinheit mit Rpb2 und Rpb3 sind demnach hochkonserviert. Bei einer moderaten Wachstumstemperatur und unter der Kontrolle eines starken Promoters kann die archaeelle Untereinheit RpoP (C1) den letalen Phänotyp der Deletion von *RPB12* aufheben (Abb. 10 A). Die archaeelle Untereinheit RpoP ist also in der Lage, die Hauptfunktionen von Rpb12 *in vivo* zu ersetzen. Folglich sind die wichtigsten strukturellen Voraussetzungen für eine korrekte Insertion der Untereinheit in die RNAP in der archaeellen und eukaryotischen Untereinheit konserviert. Bei erhöhter Wachstumstemperatur war ein verlangsamtes Wachstum der Zellen mit archaeeller Untereinheit zu beobachten (Abb. 10 B). Durch eine Fusion von RpoP mit der N-terminalen Domäne von Rpb12 (C3) wurde dieser Wachstumsdefekt bei höheren Temperaturen aufgehoben (Abb. 10 D). Das Ergebnis, dass es ohne die N-terminale Domäne von Rpb12 zu einem verlangsamten Wachstums bei höheren Temperaturen kommt, wird durch Mutationsanalysen von Rpb12 in der Hefe gestützt (Rubbi *et al.*, 1999). Deletionen von 5 und 10 Aminosäuren am N-Terminus von Rpb12 zeigten dabei ebenfalls einen Wachstumsdefekt bei höheren Temperaturen. Die Temperatursensitivität, die man in Zellen mit archaeeller Untereinheit beobachten kann ist folglich nicht durch einen Synthesedefekt der fremden Untereinheit begründet, sondern durch die Abwesenheit der N-terminalen Domäne von Rpb12.

RpoP kann die Funktion von Rpb12 in der Hefe übernehmen. RpoH hingegen kann Rpb5 auch in Fusion mit der N-terminalen Domäne von Rpb5 nicht ersetzen. Daraufhin wurde detailliert

untersucht warum RpoH die essentiellen Funktionen der eukaryotischen Untereinheit Rpb5 *in vivo* in der Hefe nicht ausführen kann.

RpoH, fusioniert mit der N-terminalen Domäne von Rpb5, funktioniert in der RNAP II *in vitro*.

Der letale Phänotyp der Deletion von *RPB5* konnte durch die Expression von RpoH oder der chimären Untereinheit aus N-terminaler Domäne von Rpb5 und RpoH nicht kompensiert werden (Tab. 1). IP Experimente haben allerdings Hinweise darauf gegeben, dass die Fusionsuntereinheit aus N-terminaler Domäne von Rpb5 und RpoH in die RNAP I und II eingebaut wird (RNAP III wurde nicht getestet; Daten nicht gezeigt). Dies konnte in einem weiteren Ansatz bestätigt werden, in dem die Fusionsuntereinheit in spezifisch aufgereinigter RNAP II nachgewiesen werden konnte (Abb. 12 Spur 3 und 4). Ein vergleichbarer Versuch mit RpoH alleine zeigte keinen Einbau in die RNAP II (Abb. 14 Spur 3-6). Die N-terminalen Domäne von Rpb5 könnte daher wichtig für die Assemblierung dieser Untereinheit mit der Polymerase sein. Dies wäre eine bislang unbekannte Aufgabe dieser Domäne. Bisher wurden für den eukaryonten-spezifischen N-Terminus Interaktionen mit der Promotor DNA gezeigt (Kim *et al.*, 1997) und Kontakte zu Transkriptionsfaktoren nachgewiesen (Le *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 1997; Hayashi *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2001).

Funktionstests einer RNAP II mit eingebauter chimärer Untereinheit aus Rpb5 und RpoH zeigten wt Aktivität in Faktor-unabhängiger Transkription (Abb. 13 A und B). Die archaeelle Untereinheit RpoH, fusioniert mit der N-terminalen Domäne von Rpb5, wird in das eukaryotische Enzym eingebaut und eine RNAP II mit dieser Untereinheit ist *in vitro* fähig, den Elongationsschritt im Transkriptionszyklus durchzuführen. Transkription mit der Δ H RNAP an der gleichen Elongationsmatrize zeigte 26 % der wt Aktivität (Abb. 24 Spur 1 und 2). RpoH ist demnach wichtig für die effektive Transkription auf einer solchen Matrize. Aus der großen Ähnlichkeit des archaeellen Transkriptionssystems mit dem RNAP II System kann daher gefolgert werden, dass auch die C-terminalen Domäne von Rpb5 Einfluss auf die Elongationsfähigkeit hat. Da RpoH, ausgetauscht gegen die C-terminalen Domäne von Rpb5, in der RNAP II wt Aktivität herstellen kann, kann man folgern, dass RpoH diese Domäne in der Elongation funktionell ersetzen kann.

Die C-terminalen Domäne, der zu RpoH homologe Bereich, hat vor allem strukturelle Aufgaben über den Kontakt mit Rpb1 (Abb. 5). Hierbei soll die Domäne unter anderem für die korrekte Positionierung katalytischer Domänen im aktiven Zentrum verantwortlich sein (Zaros *et al.*, 2007). Die Ergebnisse zeigen, dass die C-terminalen Domäne von Rpb5 durch RpoH *in vitro* ersetzt werden kann. Folglich sind die Kontaktstellen der C-terminalen Domäne von Rpb5 mit Rpb1 in der archaeellen Untereinheit konserviert. Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die strukturellen Funktionen die für die C-terminalen Domäne von Rpb5 vermutet werden auf RpoH übertragbar sind. Diese strukturellen Aufgaben scheinen unabhängig von der Assemblierung des Enzyms zu sein, da die Assemblierung im archaeellen System auch ohne RpoH vollständig abläuft und eine Δ H RNAP durch nachträgliche Zugabe von RpoH auf wt Aktivität gesteigert werden kann (Abb. 18 Spur 3).

In vitro funktioniert die RNAP II mit der archaeellen Untereinheit RpoH in der Elongation. Die Komplementierungsversuche hingegen waren negativ. Worauf der letale Phänotyp beruht konnte

in Northern Blot und in Puls Experimenten gezeigt werden (Abb. 15-16). Nach Abschalten der wt Untereinheit zeigte sich lediglich ein leicht positiver Effekt der chimären Untereinheit auf die RNAP I und III spezifische Transkription (Abb. 15). Dieser positive Effekt muss durch einen wenigsten teilweise funktionalen Einbau der Hybriduntereinheit aus Rpb5 und RpoH in die RNAP I und III begründet sein. Das Signal für RNAP I und III spezifische Transkription geht dabei simultan zurück, was auf eine vergleichbare Abhängigkeit von neusynthetisiertem Rpb5 und einer ähnlichen Halbwertszeit der Enzyme schließen lässt. Der drastische Rückgang der Transkriptionsaktivität nach 8 Stunden ohne Neusynthese von Rpb5 ist dabei übereinstimmend mit vergleichbaren Ergebnissen für die RNAP Untereinheit Rpb12 (Rubbi *et al.*, 1999).

Die Untersuchung der RNAP II spezifischen Transkription lieferte das interessante Ergebnis, dass selbst nach 19 Stunden ohne Neusynthese von Rpb5 kein signifikanter Rückgang der Aktivität zu erkennen war. Der Umstand, dass die RNAP II ohne Neusynthese der Untereinheit deutlich länger aktiv ist als die RNAP I und III, könnte in einer höheren Halbwertszeit des Enzyms begründet sein. Andererseits konnte für die Untereinheit Rpb12 nachgewiesen werden, dass es zu einem simultanen Rückgang der transkriptionellen Aktivität aller drei RNAP nach Abschalten der Neusynthese kommt (Rubbi *et al.*, 1999). Dies lässt eine längere Halbwertszeit der RNAP II als wenig wahrscheinlich erscheinen. Durch Untersuchungen im Hefe System konnte nachgewiesen werden, dass ca. doppelt so viele RNAP II wie RNAP I Enzyme in der Zelle vorkommen und die Menge an RNAP III sogar noch etwas niedriger liegt, als die der RNAP I (Bier *et al.*, 2004; Borggrefe *et al.*, 2001). Folglich könnte die lang anhaltende Aktivität der RNAP II durch die größere Anzahl an RNAP II Molekülen in der Zelle begründet sein. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die RNAP II auch ohne Rpb5 an einigen Promotoren aktiv ist und Rpb5 nur für die Interaktion mit einigen Transkriptionsfaktoren wichtig ist. Dies widerspräche allerdings einer strukturellen Aufgabe der C-terminalen Domäne (Zaros *et al.*, 2007).

Zeitgleich mit dem Rückgang der RNAP I und III spezifischen Transkription stoppt auch das Wachstum der Hefekultur. Diese Ergebnisse legen deshalb die Vermutung nahe, dass RNAP I und III mit eingebauter chimärer Untereinheit nicht richtig funktionieren und insbesondere dadurch die Komplementierung *in vivo* scheitert.

Die eukaryotischen Untereinheiten Rpb5 und Rpb12 funktionieren im archaeellen *in vitro* System.

Es konnte gezeigt werden, dass Rpb5 und Rpb12 aus *S. cerevisiae* in ein archaeelles Enzym rekonstituiert werden können (Abb. 17). Die Interaktionsflächen mit den archaeellen Teilen des Enzyms sind folglich in den komplexeren eukaryotischen Untereinheiten konserviert. Beide eukaryotischen Untereinheiten besitzen zusätzliche N-terminale Domänen, die allerdings für eine Assemblierung mit den archaeellen Untereinheiten nicht hinderlich zu sein scheinen. Dies betrifft vor allem Rpb5, da zwei Drittel des Proteins (ca. 18 kDa, Abb. 4 A und C) kein archaeelles Gegenstück besitzt. Darüber hinaus überstehen die eukaryotischen Untereinheiten zumindest teilweise die Rekonstitutionsprozedur, die einen Hitzeschritt sowie eine Denaturierung mit Harnstoff beinhaltet (Naji *et al.*, 2007). Dies lässt vermuten, dass die Untereinheiten aus der mesophilen Hefe im archaeellen Enzymkomplex stabilisiert werden.

Die chimären Enzyme zeigten in *in vitro* Transkriptionstests bei 70 °C eine deutlich höhere Aktivität als die archaeellen Δ Enzyme (Abb. 18 und 19). Die RNAP mit Rpb5 zeigte dabei wt Aktivität (Abb. 18 Spur 5), was darauf schließen lässt, dass die Untereinheit im Enzym eine vergleichbare Stabilität wie RpoH aufweist und diese funktionell ersetzen kann. Die eukaryotische Untereinheit kann auch direkt in einen Transkriptionsansatz zu einem archaeellen Δ H Enzym gegeben werden und die Aktivität des Enzyms auf wt Niveau bringen. Dies ist auch mit der archaeellen Untereinheit möglich und lässt auf einen effektiven Einbau der Untereinheiten in das Enzym schließen. Dass dieser Vorgang möglich ist, spricht außerdem dafür, dass die Assemblierung der Untereinheiten zu einem funktionalen Enzym ein sehr dynamischer Prozess ist. Darüber hinaus scheint das archaeelle Enzym auch ohne die Untereinheit RpoH vollständig assembliert zu werden, die Aktivität des Δ H Enzyms ist jedoch in allen Tests herabgesetzt.

Die archaeelle Δ P RNAP kann durch Zugabe von Rpb12 ebenfalls stark stimuliert werden (Abb. 19 Spur 3), allerdings wurde bei der Analyse deutlich, dass Rpb12 aus der mesophilen Hefe weniger hitzestabil ist als RpoP aus dem hyperthermophilen Archaeon. Trotz der Thermosensitivität konnte nachgewiesen werden, dass Rpb12 in der Lage ist, alle Hauptfunktionen des archaeellen Enzyms zu unterstützen (siehe Diskussion: Analyse des Δ P Enzyms).

Die getesteten eukaryotischen Untereinheiten können damit die homologen archaeellen Untereinheiten funktionell ersetzen. Eine vergleichbare Interaktion eines eukaryotischen Proteins mit der archaeellen RNAP konnte bereits für das TBP des Menschen und Hefe gezeigt werden, die beide das archaeelle TBP ersetzen können (Wettach *et al.*, 1995).

In Untersuchungen im bakteriellen Rekonstitutionssystem konnte nachgewiesen werden, dass ein Austausch von RNAP Untereinheiten innerhalb der Bacteria zwar möglich ist, aber beispielsweise die hybride Rekonstitution der Untereinheiten α , β und β' von *Micrococcus luteus* und *Escherichia coli* zu deutlich vermindert aktiven Enzymen führt (Lill *et al.* 1975). Die Zugabe von artfremden σ -Faktoren wurde mit den rekonstituierten Kern RNAP von *Aquifex aeolicus*, *Thermus aquaticus* und *E. coli* analysiert. Hierbei zeigte sich beispielweise, dass die *E. coli* Kern RNAP auch mit einem *A. aeolicus* σ -Faktor effektiv transkribieren kann allerdings nur schlecht mit einem σ -Faktor aus *T. aquaticus*. Die Kern RNAP von *A. aeolicus* hingegen zeigte keine Aktivität mit einem *E. coli* oder *T. aquaticus* σ -Faktor (Kuznedelov und Severinov 2009). Innerhalb der Domäne der Bacteria ist demnach ein Austausch von RNAP Untereinheiten nur teilweise möglich. Folglich ist der Nachweis, dass eukaryotische Untereinheiten, über die Domänengrenze hinweg, im archaeellen System funktionieren, ein Beleg für die große Übereinstimmung von eukaryotischem und archaeellem Transkriptionssystem.

Eine RNAP ohne die Untereinheit RpoH zeigte starke Defekte in allen Schritten des Transkriptionszyklus.

Die Analyse des archaeellen Δ H Enzyms zeigt eine deutlich reduzierte Aktivität in unspezifischen Transkriptionstests im Vergleich zum wt Enzym (Werner und Weinzierl 2002). Dies deutet auf eine essentielle Aufgabe dieser Untereinheit im Enzymkomplex hin, die unabhängig von der Assemblierung des Enzyms ist, da die Untereinheit auch nachträglich in ein Δ H Enzym integriert werden kann (Abb. 18 Spur 3). Der Umstand, dass das kodierende Gen mit den Genen der

katalytischen Untereinheiten RpoB-A'-A'' in sehr vielen sequenzierten archaeellen Genomen ein Operon bildet liefert einen weiteren Hinweis auf eine essentielle Funktion von RpoH. Es wird postuliert, dass die Untereinheit strukturelle Aufgaben in der Stabilisierung der großen katalytischen Untereinheiten wahrt (Hirata *et al.*, 2008). Interaktionstudien, sowie Erkenntnisse aus der *Sulfolobus* Struktur, belegen eine Interaktion von RpoH mit A'' (Goede *et al.*, 2006; Hirata *et al.*, 2008). Es ist demnach wahrscheinlich, dass die postulierten strukturellen Aufgaben in Zusammenhang mit dieser katalytischen Untereinheit stehen.

Durch eine schrittweise Untersuchung des ΔH Enzyms konnte nachgewiesen werden, dass das Enzym bereits weniger stabile Präinitiationskomplexe mit den Transkriptionsfaktoren und der Promotor DNA bildet (Abb. 20 Spur 4) und keinen detektierbaren offenen Komplex mehr ausbilden kann (Abb. 21 Spur 2). Damit ist bereits der Initiationsschritt im Transkriptionszyklus gestört. Im Vergleich zur Run-off Transkription war in einer abortiven Transkription an einer geschlossenen Matrize, eine Verdoppelung der transkriptionellen Aktivität zu beobachten (Abb. 18 Spur 1 und 2; Abb. 22 Spur 1 und 2). Dieses ist auf den ersten Blick ein widersprüchliches Ergebnis, da für die Run-off genauso wie für die abortive Transkription die Bildung eines offenen Komplexes nötig ist. Der Unterschied liegt dabei wahrscheinlich in der Verwendung eines Dinukleotids in der abortiven Transkription, welches stabilisierend auch auf unvollständig ausgebildete offene Komplexe wirkt. Die stabilisierende Wirkung von einzelnen Nukleotiden auf einen offenen Komplex konnte nachgewiesen werden (Bartlett *et al.*, 2000) und es ist wahrscheinlich, dass ein Dinukleotid eine noch stärkere Stabilisierung zur Folge hat.

Betrachtet man lediglich den auf die Initiation folgenden Elongationsschritt so zeigt sich, dass das ΔH Enzym effektiv in der Lage ist, eine RNA zu verlängern. In einem künstlichen Elongationstest bei dem das ΔH Enzym in einem Konstrukt eine kurze RNA, welche an ein DNA-Hybrid fusioniert wurde, verlängern muss, zeigte das Enzym immerhin ca. 26 % der Aktivität des wt Enzyms (Abb. 24 Spur 1 und 2). Damit ist die Aktivität des ΔH Enzyms in diesem Elongationstest im Vergleich zur Aktivität bei Run-off Transkriptionen leicht erhöht (Abb. 18 Spur 1 und 2). Durch Untersuchungen von gestellten Elongationskomplexen konnte sogar nachgewiesen werden, dass das ΔH Enzym die RNA genauso effektiv elongieren kann wie das wt Enzym (Abb. 23 Spur 1 und 3). Eine Zugabe von RpoH zu bei +20 gestellter ΔH RNAP hatte demnach auch keinen positiven Effekt (Abb. 23 Spur 4). Das auf der künstliche assemblierten Elongationsmatrize eine verminderte Aktivität zu beobachten war, liegt möglicherweise daran, dass das ΔH Enzym schlechter an das künstlich vorgefertigte Konstrukt gebunden hat und/oder Schwierigkeiten bei der Positionierung des vorgeformten RNA/DNA Hybrids im aktiven Zentrum hatte. Gleichwohl scheint der für das ΔH Enzym problematische Schritte in der Initiation der Transkription zu liegen. Die Elongationsphase ist durch ein stabilisierendes DNA/RNA Hybrid und ein korrekt positioniertes katalytisches Zentrum charakterisiert. Hat das ΔH Enzym die Initiation überwunden und ist in die Elongation übergegangen kann die RNAP auch ohne die Untereinheit effektiv transkribieren. Vergleichbare Ergebnisse hat die Analyse von pausierten ΔP RNAP Komplexen ergeben. Im Falle des ΔP Enzyms ist ebenfalls die Initiation gestört, allerdings kann, ähnlich wie beim ΔH Enzym, im Anschluss die RNA in gestellten Komplexen effektiv verlängert werden.

Crosslinking Experimente an Elongationskomplexen weisen daraufhin, dass es beim Übergang von der Initiation zur Elongation zu einer Umlagerung der Untereinheit, von +20 relativ zum Transkriptionsstart, in die Nähe des aktiven Zentrums kommt (S. Grünberg unveröffentlichte Daten). Dies kann so interpretiert werden, dass die Untereinheit zusätzlich eine Funktion beim Übergang in die Elongationsphase haben könnte.

RpoH unterstützt die Ausbildung eines offenen Komplexes vermutlich über die Stabilisierung von Komponenten des aktiven Zentrums.

Das ΔH Enzym wurde aufgrund der Defekte in der Bildung eines offenen Komplexes zusätzlich auf Aktivität an einer vorgeformten Transkriptionsblase getestet. Untersuchungen an dem ΔP Enzym haben gezeigt, dass ein Defekt in der Bildung eines offenen Komplexes an einer vorgeformten Transkriptionsblase umgangen werden kann (Reich *et al.*, 2009). An diesem künstlichen Konstrukt zeigte das ΔH Enzym allerdings nur eine ähnlich geringe Aktivität im Vergleich zum wt wie in der Run-off Transkription (Abb. 25 Spur 1 und 2; Abb. 18 Spur 1 und 2). Die geringe Aktivität an dieser Matrize kann verschieden interpretiert werden. Eine Möglichkeit wäre, dass die Untereinheit auch Funktionen hat, die über die Bildung eines offenen Komplexes hinausgehen. Dies würde zu der angesprochenen Umlagerung von RpoH in Elongationskomplexen passen. Andererseits könnte das ΔH Enzym an dieser künstlichen Transkriptionsblase auch Probleme bei der Initiation und Positionierung des aktiven Zentrums haben.

Mutationsanalysen der zu RpoH homologen C-terminalen Domäne von Rpb5 haben gezeigt, dass die Domäne, über Interaktionen mit Rpb1, die Bridge Helix sowie den Switch 1 Loop im aktiven Zentrum stabilisiert und positioniert (Zaros *et al.*, 2007). RpoH kann die C-terminale Domäne von Rpb5 in der RNAP II funktionell ersetzen, genauso wie Rpb5 im archaeellen System gegen RpoH austauschbar ist (s. o.). Ferner sind die katalytischen Komponenten im aktiven Zentrum der eukaryotischen und archaeellen RNAP hochkonserviert (Hirata *et al.*, 2008, Kusser *et al.*, 2008). Es ist daher wahrscheinlich, dass RpoH und die C-terminale Domäne von Rpb5 ähnliche Funktionen im Enzymkomplex wahrnehmen. Die Probleme des ΔH Enzyms in der Bildung eines stabilen Präinitiationskomplexes, der Ausbildung einer Transkriptionsblase und der Transkription an einem künstlichen offenen Komplex könnten somit in der fehlenden Positionierung der konservierten katalytischen Domänen von RpoA'' und damit in einem instabilen aktiven Zentrum liegen.

Betrachtet man die Bildung des offenen Komplexes im nahverwandten RNAP II System so ist festzuhalten, dass dieses Enzym im Gegensatz zu allen anderen RNAP eine ATP-abhängige Helikase-Aktivität zum Aufschmelzen des DNA Stranges benötigt. Des Weiteren spielt der Transkriptionsfaktor TFIIB, sehr wahrscheinlich über eine Insertion des B-Fingers, eine Rolle in der Stabilisierung des offenen Komplexes (Hahn *et al.*, 2004). Dies ist übereinstimmend mit Analysen im archaeellen System, in denen TFB im offenen Komplex an den kodierenden Strang nahe der Transkriptionsstartstelle, gecrosslinkt wird (Bartlett *et al.*, 2004; Renfrow *et al.*, 2004). Mutationsanalysen von TFB deuten ferner daraufhin, dass ein neu identifiziertes Element für das Aufschmelzen der DNA und der B-Finger für eine korrekte Stabilisierung der DNA im aktiven Zentrum verantwortlich ist (M. Zeller unveröffentlichte Daten).

TFB und RpoH scheinen damit beide Aufgaben in der Bildung eines offenen Komplexes zu haben. Eine direkte Interaktion der beiden Proteine scheint allerdings unwahrscheinlich, da RpoH, entfernt von TFB, im Initiationskomplex zwischen +12 und +20 relativ zum Transkriptionsstart detektiert wird (Bartlett *et al.*, 2004). TFB spielt damit eine direkte Rolle in der Ausbildung eines offenen Komplexes. RpoH scheint den Komplex hingegen indirekt, über die beschriebene Positionierung von Domänen der katalytischen Untereinheit RpoA'', zu stabilisieren.

RpoP ist nicht entscheidend für die Assemblierung der RNAP aber wichtig für die Ausbildung eines offenen Komplexes.

Die Untereinheit RpoP bildet *in vitro* einen stabilen Komplex mit den Untereinheiten RpoD, RpoL und RpoN (Werner *et al.*, 2000, Werner und Weinzierl 2002). In Rekonstitutionsexperimenten konnte außerdem ein Komplex aus RpoB, RpoD, RpoL, RpoN und RpoP nachgewiesen werden (Goede *et al.*, 2006). Spezifische Interaktionen zeigten sich auch zwischen Rpb12 und Rpb3 im humanen System (Acker *et al.*, 1997) sowie zwischen den archaeellen Untereinheiten RpoD und RpoP (Goede *et al.*, 2006). Aufgrund dieser Daten wurde vermutet, das RpoP/Rpb12 als Plattform für die Rekrutierung der großen katalytischen Untereinheiten während der Assemblierung des Enzymkomplexes dienen könnte (Grohman *et al.*, 2009).

Die rekonstituierte archaeelle RNAP assembliert auch in Abwesenheit von RpoP (ΔP RNAP) ähnlich wie ein wt Enzym, zeigt allerdings starke Defekte in der unspezifischen Transkription (Werner und Weinzierl 2002). Die detaillierte Analyse des ΔP Enzyms zeigte, dass die RNAP nicht mehr in der Lage war, einen offenen Komplex zu bilden (Abb. 27 Spur 2). Wurde das Enzym allerdings in abortiver Transkription an einer vorgeformten Transkriptionsblase getestet, so zeigte sie wt Aktivität (Abb. 39 Spur 1). Diese Ergebnisse deuten auf eine entscheidende Rolle von RpoP in der Bildung des offenen Komplexes hin. RpoP hat dabei vermutlich, ähnlich wie RpoH, einen indirekten Einfluss auf die Bildung eines offenen Komplexes. Der Mechanismus über den RpoP die Bildung unterstützt ist aber höchstwahrscheinlich ein anderer als bei RpoH. Die Untereinheit RpoP liegt im RNAP Komplex zwischen der Untereinheit RpoD sowie der Wall und Protrusion Domäne von RpoB (Hirata *et al.*, 2008; Abb. 3 und 6). Die strukturellen Daten lassen dabei vermuten, dass RpoP als eine Art Keil wirkt, welcher die angesprochenen Domänen stabilisiert und fixiert. Hierbei ist die konservierte C-terminale Domäne von RpoP, die in den Enzymkomplex inseriert, wahrscheinlich von entscheidender Bedeutung. Die Abwesenheit von RpoP führt vermutlich zu einer erhöhten Flexibilität der Wall und Protrusion Domänen der Untereinheit RpoB, die sich wiederum im Initiationskomplex in der Nähe des TBP/TFB Komplexes befinden (Hahn 2004; Chen *et al.*, 2004/2007). Die postulierten Aufgaben von TFB in der Bildung des offenen Komplexes wurden bereits diskutiert. Eine veränderte Position oder erhöhte Flexibilität der Domänen von RpoB hätte demnach Auswirkungen auf TFB und würde so zu einer Störung in der korrekten Auf trennung der DNA Stränge führen. RpoP hätte damit einen indirekten Einfluss auf die korrekte Positionierung von TFB und könnte so die Bildung des offenen Komplexes beeinflussen.

Betrachtet man das ΔP Enzym in der Transkription auf einer Elongationsmatrix so zeigt es dort eine moderate Aktivität (Abb. 30 Spur 1 und 2). Dies deutet daraufhin, dass eine RNAP, die ohne

RpoP assembliert wurde, den Elongationsschritt im Transkriptionszyklus effektiv durchführen kann. Darüber hinaus kann durch Zugabe von RpoP das ΔP Enzym schnell auf wt Niveau aktiviert werden (Abb. 30 Spur 3). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass RpoP problemlos in das ΔP Enzym inserieren kann und damit die Bildung eines Komplexes aus Rpb2, Rpb3, Rpb10, Rpb11 und Rpb12 kein notwendiger Schritt in der Assemblierung der RNAP ist. Folglich ist Rpb12 auch nicht essentiell für die Rekrutierung der beiden großen katalytischen Untereinheiten.

Die C-terminale Domäne von RpoP ist für grundlegende Funktionen in der RNAP ausreichend.

Die beiden charakteristischen Strukturelemente der RNAP Untereinheit Rpb12 sind eine konservierte basische C-terminale Domäne sowie ein Zink-Ribbon Motiv im N-terminalen Bereich (Abb. 31 und 32). Die N-terminale Domäne befindet sich dabei zugänglich an der Oberfläche der Polymerase, während die C-terminale Domäne in den Enzymkomplex inseriert (Cramer *et al.*, 2001; Abb. 6). Ferner gibt es ein konserviertes Tryptophan an Position 29 und zwei konservierte Arginine an Position 47 und 60 (Abb. 32). Mutationsanalysen in der Hefe führten zu dem Ergebnis, dass von den vier Cysteinen im Zink-Ribbon lediglich das erste essentiell ist. Die Mutation der beiden Cysteine an Position 48 und 51 ließen keinen Phänotyp erkennen (Rubbi *et al.*, 1999). Die in dieser Arbeit erstellte Zink-Ribbon Mutante, in der die vergleichbaren Cysteine in RpoP mutiert wurden (C27/30S), führte zu einem deutlichen Defekt in Kaliumpermanganat Footprints (Abb. 27 Spur 4). Im Folgenden zeigten allerdings detaillierte Analysen, dass das Zink-Ribbon keinen Einfluss auf die Bildung des offenen Komplexes hat. Dies wird zum einen in Footprintreaktionen deutlich, in denen ein kurzer C-terminaler Teil von RpoP die Bildung eines offenen Komplexes unterstützen kann (Abb. 27 Spur 6). Die Aktivität ist dabei mit wt RpoP vergleichbar, obwohl das 17 Aminosäuren umfassende C-terminale Peptid lediglich das konservierte Lysin an Position 37 und das konservierte Arginin an Position 39 aufweist. Keine weiteren konservierten Teile der Untereinheit, darunter die 4 Cysteine, die das Zink-Ribbon Motiv bilden, sind vorhanden. In der Single Round Transkription, konnte das Peptid darüber hinaus rund 80 % der wt Aktivität herstellen, die Zink-Ribbon Mutante hingegen nur 14 % (Abb. 34 Spur 3, 5 und 6). Folglich wirkt sich eine vollständige Deletion des Zink-Ribbons deutlich weniger negativ auf die Aktivität der RNAP aus als die Mutation der beiden Cysteine. In einem weiteren Versuch konnte gezeigt werden, dass die Zink-Ribbon Mutante zwar stöchiometrisch in die archaeelle RNAP rekonstituiert wird, aber die RNAP durch Zugabe der wt Untereinheit entscheidend in ihrer Aktivität gesteigert werden kann (Abb. 36 B Spur 3 und 4). Es ist deshalb wahrscheinlich, dass die mutierte Form von RpoP nur lose mit RNAP assoziiert ist und so durch wt RpoP leicht verdrängt werden kann. Durch die lockere Interaktion der Zink-Ribbon Mutante mit der RNAP, kann die postulierte Stabilisierungsfunktion von RpoP nicht mehr ausgeführt werden und die beobachteten Defekte in der Bildung des offenen Komplexes sind die Folge.

Die Zink-Ribbon Mutante weiß also funktionelle Defekte auf, die nicht durch eine geringere Stabilität der Untereinheit begründet sind (Abb. 33). Das Laufverhalten in der SDS-PAGE ist im Vergleich zu wt RpoP und den anderen RpoP Varianten ebenfalls beeinflusst, da diese Variante während der Elektrophorese langsamer wandert (Daten nicht gezeigt). Über die Analyse von Sekundärstrukturelementen der RpoP Varianten konnte im Folgenden nachgewiesen werden, dass

es durch die Mutationen der beiden Cysteine zu einer Strukturänderung des Proteins gekommen ist (Abb. 35 A). Hierbei scheint es nach Aufbruch des Zink-Ribbons zur Ausbildung eines α -helicalen Bereiches gekommen zu sein, der in der wt Untereinheit nicht zu erkennen ist (Abb. 35, Vergleich Abb. 10). Diese Struktur hindert sehr wahrscheinlich die Interaktion der Untereinheit mit der RNAP und ist damit auch der Grund für die inkorrekte Assoziation mit dem Enzymkomplex.

Das archaeelle Enzym mit eingebauter Zink-Ribbon Mutante ist gleichwohl in der Lage geringe Menge an Run-off Transkript zu produzieren (Abb. 28 Spur 5). In Elongationstests scheint die Mutation darüber hinaus keinen negativen Einfluss auf die Aktivität zu haben (Abb. 30 Spur 5), was zusammenfassend darauf schließen lässt, dass der Hauptdefekt des ΔP Enzyms in der Bildung des offenen Komplexes liegt. Die Mutation der entsprechenden Cysteine (C48 und 51) in der Rpb12 Untereinheit der Hefe führte zu keinem Wachstumsphänotyp (Rubbi *et al.*, 1999). Dies weist darauf hin, dass die beschriebenen Defekte in der Zink-Ribbon Mutante *in vivo* ausgeglichen werden können.

Die Mutation des, in der N-terminalen Domäne von RpoP gelegenen, konservierten Arginins an Position 26 hatte kaum Auswirkungen auf die transkriptionelle Aktivität der RNAP *in vitro*. Die Analyse verschiedener Tests zeigte hauptsächlich wt Aktivität, was vermuten lässt, dass die Aminosäure keinen entscheidenden Einfluss auf die Funktion der RNAP hat.

In dem zweiten charakteristischen Element von RpoP, der basischen C-terminale Domäne, ist *in vivo* vor allem die Ladung essentiell. Modifikationen der Domäne über den Austausch von Aminosäuren mit veränderter Ladung hatten drastische Auswirkungen auf den Phänotyp und waren in der Regel letal (Rubbi *et al.*, 1999). Die hier durchgeführten Untersuchungen der konservierten C-terminalen Domäne verdeutlichen, dass sie alleine in der Lage ist, die basalen Funktionen der RNAP zu unterstützen. Durch Zugabe des Peptids zum ΔP Enzym konnte in Kaliumpermanganat Footprints die Aktivität vollständig wiederhergestellt werden (Abb. 27 Spur 6). In der Single Round Transkriptionen konnte sie nahezu auf wt Niveau gesteigert werden (Abb. 34 Spur 5). Das 17 Aminosäuren umfassende Peptid scheint dabei in Lösung ungefaltet vorzuliegen und erst in der Assoziation mit der RNAP eine Struktur auszubilden (Abb. 35 A). Der konservierte C-terminale Teile von RpoP ist somit prinzipiell ausreichend die Hauptfunktionen der RNAP im Transkriptionszyklus zu erfüllen.

Evolutionäre Schlussfolgerungen.

Viele Hinweise deuten daraufhin, dass die archaeelle RNAP eine vereinfachte Version und der evolutionäre Vorläufer der eukaryotischen RNAP ist. Die am stärksten konservierten Strukturen liegen dabei in der Spalte des Enzyms um das aktive Zentrum. Hierbei sind unter anderem die Bridge Helix, die Pore, die Klammer sowie die Dock Domäne vergleichbar angeordnet (Hirata *et al.*, 2008; Kusser *et al.*, 2008; Cramer *et al.*, 2001; Abb. 3). Diese Konservierung um das aktive Zentrum bezieht sich hauptsächlich auf die großen katalytischen Untereinheiten. Die kleineren Untereinheiten der eukaryotischen RNAP wie Rpb4, Rpb5, Rpb6 und Rpb12 zeigen ebenfalls große Ähnlichkeiten zu archaeellen Untereinheiten, besitzen allerdings zusätzliche N-terminale Domänen, die vermutlich Eukaryoten-spezifische Funktionen erfüllen.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die archaeelle Untereinheit RpoH *in vitro* die Elongation in der RNAP II unterstützen kann und die homologe eukaryotische Untereinheit Rpb5 alle Funktionen von RpoH in der rekonstituierten archaeellen RNAP übernehmen kann. Darüber hinaus kann die archaeelle Untereinheit RpoP die Hauptfunktionen von Rpb12 in der Hefe *in vivo* ersetzen und Rpb12 komplementiert RpoP in der rekonstituierten archaeellen RNAP. Dies zeigt deutlich eine nahe Verwandtschaft der eukaryotischen und archaeellen RNAP auf, die sich vermutlich aus einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt haben. Die geringeren Größe und Komplexität des archaeellen Enzyms spricht dabei für eine größere Nähe zu einer Vorläuferpolymerase. Das eukaryotische Enzym ist durch die höheren Anforderungen z. B. in der Genregulation, als das weiterentwickelte Enzym anzusehen. Dennoch sind die komplexeren eukaryotischen Untereinheiten immer noch in der Lage, in dem basalen archaeellen Enzym ihre Funktion wahrzunehmen. Es ist daher anzunehmen, dass ein evolutionärer Druck auf der Erhaltung der Strukturen in dieser Art von RNAP liegt, die für die Wechselwirkung der Untereinheiten verantwortlich sind.

Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war, zu untersuchen, ob ein direkter Austausch von RNAP Untereinheiten zwischen den Domänen der Eukarya und der Archaea möglich ist. Insbesondere sollte die Funktion der kleinen Untereinheiten RpoP/Rpb12 und RpoH/Rpb5 im Enzymkomplex aufgeklärt werden. Es wurden dazu die Vorzüge von zwei bisher getrennt betrachteten Modellorganismen und Systemen gebündelt. In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konnte das etablierte Methodenspektrum und ein ausgereiftes genetisches System genutzt werden. Das archaeelle System bietet die Möglichkeit die RNAP aus elf Untereinheiten zu rekonstituieren. Auf diese Weise sollten zwei sich ergänzende Ansätze zur Klärung von Struktur-Funktionsbeziehungen eingesetzt werden.

Im Hefesystem wurde untersucht, ob archaeelle Untereinheiten die eukaryotischen RNAP *in vivo* komplementieren können oder welche Funktion sie dort noch unterstützen können. Mit Hilfe der rekonstituierbaren archaeellen RNAP konnten eukaryotische Untereinheiten auf ihre Aktivität im archaeellen System getestet werden. Mit dem Ziel einer Funktionszuordnung wurden archaeelle RNAP, die ohne die Untereinheiten RpoH oder RpoP rekonstituiert worden waren untersucht, und zusätzlich mutierte Varianten der Untereinheit RpoP getestet.

Die Versuche lieferten Einblicke in die bisher kaum verstandene Funktion von RpoP/Rpb12 und RpoH/Rpb5. Die Abwesenheit von RpoH in einer rekonstituierten archaeellen RNAP führte zu starken Defekten bei allen Schritten des Transkriptionszyklus. RpoH ist zur C-terminalen Domäne von Rpb5 homolog und die N-terminale Domäne von Rpb5 fehlt bei den Archaea. RpoH scheint, ähnlich wie die C-terminale Domäne von Rpb5, Einfluss auf die Stabilität des aktiven Zentrums zu nehmen.

Die zweite detailliert untersuchte Untereinheit ist RpoP. Die bisher angenommene Rekrutierungsfunktion beim Aufbau der RNAP aus den Untereinheiten erscheint im Lichte dieser Daten als unwahrscheinlich. Hingegen ist RpoP für die Ausbildung des offenen Komplexes notwendig. Das N-terminale Zink-Ribbon hat Einfluss auf die Gesamtstruktur der Untereinheit, die in direktem Zusammenhang mit einer korrekten Interaktion im Enzymkomplex steht. Die konservierte C-terminale Domäne allein ist ausreichend alle wesentlichen Funktionen der RNAP zu unterstützen.

Die eukaryotischen Untereinheiten Rpb12 und Rpb5 konnten anstelle ihrer archaeellen Homologe RpoP und RpoH in eine archaeelle RNAP rekonstituiert werden. Aktivitätstests haben gezeigt, dass die eukaryotischen Untereinheiten aus der mesophilen Hefe im hyperthermophilen *in vitro* Transkriptionssystem alle wesentlichen Funktionen wahrnehmen können. Die archaeelle Untereinheit RpoH, in Fusion mit der N-terminalen Domäne von Rpb5, wird bei Überexpression in der Hefezelle in die RNAP II eingebaut und führt zu einem *in vitro* aktiven Enzym. Die archaeelle Untereinheit RpoP, unter der Kontrolle eines starken Hefepromotors, kann sogar alle essentiellen Funktion von Rpb12 *in vivo* ersetzen. Es ist demnach ein direkter Austausch von Untereinheiten zwischen den eukaryotischen und der archaeellen RNAP möglich.

Der Nachweis macht deutlich, dass die RNAP der archaeellen und eukaryotischen Domäne nicht nur große Ähnlichkeiten aufweisen, sondern dass Untereinheiten funktionell austauschbar sind. Die Grundstrukturen, die unter anderem wichtig für die Protein-Protein Wechselwirkungen der

Zusammenfassung

Untereinheiten sind, blieben trotz einer Zunahme an Komplexität im eukaryotischen System erhalten und deuten auf eine evolutionäre Konservierung hin.

Das hybride Hefe/*Pyrococcus* System erbrachte damit biochemische Belege für die evolutionär nahe Verwandtschaft der archaeellen und eukaryotischen Transkriptionssysteme.

Summary

The aim of this work was to investigate if a direct substitution of RNAP subunits between the eukaryal and archaeal domain was possible. Furthermore the essential functions of the small subunits RpoH/Rpb5 and RpoP/Rpb12 in the enzyme were analysed. In order to do this the benefits of two different model organisms and systems were pooled. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae* a well established range of methods and a sophisticated genetic system could be used. The combination with the basic archaeal system, which allows the reconstitution of the RNAP from 11 subunits, made it possible to benefit from two complementing approaches in order to investigate structure-function relationships.

In the yeast system it was analysed if archaeal subunits could complement the eukaryotic RNAP *in vivo* or which functions they could still support. Using the reconstituted archaeal RNAP eukaryotic RNAP subunits were tested for their activity in the archaeal system. In order to achieve a functional characterization of the subunits, RNAP lacking RpoH or RpoP and mutated variants of RpoP were analysed.

The joined attempts elucidated the enigmatic functions of RpoP/Rpb12 and RpoH/Rpb5. The absence of RpoH in a reconstituted RNAP led to severe defects in all steps of the transcription cycle. RpoH is homologous to the C-terminal domain of Rpb5 and the N-terminal domain of Rpb5 is absent in Archaea. RpoH, like the C-terminal domain of Rpb5, seems to influence the stability of the active centre.

The second subunit investigated in detail was RpoP. The data presented here strongly contradicts the assumed function in the recruitment of the catalytic subunits. However RpoP is crucial for the open complex formation. The N-terminal zinc-ribbon is important for the overall structure of the subunit, which is directly related to a correct interaction in the enzyme complex. The conserved C-terminal domain alone can support all basic functions in the RNAP.

The eukaryotic subunits Rpb12 and Rpb5 were incorporated into an archaeal RNAP, instead of their archaeal homologues RpoP and RpoH. Activity tests showed that the eukaryotic subunits from the mesophilic yeast can support all major functions in the hyperthermophilic archaeal *in vitro* transcription system. During overexpression in yeast cells archaeal RpoH, in fusion with the N-terminal domain of Rpb5, is incorporated into a transcriptionally active RNAP II. The archaeal subunit RpoP, under the control of a strong yeast promotor, can even complement all essential functions of Rpb12 *in vivo*. According to this a direct substitution of subunits between the eukaryotic and archaeal RNAP is possible.

The evidence presented here supports the idea that RNAP of Archaea and Eukarya are not only very similar but that subunits can be functionally exchanged. The basic structures, which are important for protein-protein interactions of the subunits, are in spite of the increase in complexity in the eukaryotic system, preserved and are indicative of an evolutionary conservation.

The described chimeric yeast/*Pyrococcus* system provides biochemical evidence for the evolutionary relationship of the archaeal and eukaryotic transcription system.

Literaturverzeichnis

- Abbondanzieri E., Greenleaf, W., Shaevitz, J., Landick, R. und Block, S. (2005) Direct observation of base-pair stepping by RNA polymerase. *Nature* **438**: 460-465.
- Acker, J., de Graaff, M., Cheynel, I., Khazak, V., Kedinger, C. und Vigneron, M. (1997) Interactions between the human RNA polymerase II subunits. *J Biol. Chem.* **272**: 16815-16821.
- Archambault, J., Schappert, K. und Friesen, J. (1990) A suppressor of an RNA polymerase II mutation of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a subunit common to RNA polymerases I, II, and III. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 6123-6131.
- Archambault, J. und Friesen, J. (1993) Genetics of eukaryotic RNA polymerases I, II, and III. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **57**: 703-724.
- Armache, K., Mitterweger, S., Meinhart, A. und Cramer, P. (2005) Structures of complete RNA polymerase II and its subcomplex, Rpb4/7. *J. Biol. Chem.* **280**: 7131-7134.
- Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (ständig aktualisiert)
- Bartlett, M., Thomm, M. und Geiduschek, P. (2000) The orientation of DNA in an archaeal transcription initiation complex. *Nature Struc. Biology* **7**: 782-785.
- Bartlett, M., Thomm, M. und Geiduschek, P. (2004) Topography of the euryarchaeal transcription initiation complex. *J. Biol. Chem.* **279**: 5894-5903.
- Bartlett, M. (2005) Determinants of transcription initiation by archaeal RNA polymerase. *Curr. Opinion in Microbiol.* **8**: 677-684.
- Bell, S. und Jackson, S. (1998) Transcription and translation in Archaea: a mosaic of eukaryal and bacterial features. *Trends in Microbiol.* **6**: 6.
- Bell, S. und Jackson, S. (2001) Mechanism and regulation of transcription in Archaea. *Curr. Opinion in Microbiol.* **4**: 208-213.
- Bentley, D. (2005) Rules of engagement: co-transcriptional recruitment of the pre-mRNA processing factors. *Curr. Op. in Cell Biology* **17**: 251-256.
- Bier, M., Fath, S. und Tschochner, H. (2004) The composition of the RNA polymerase I transcription machinery switches from initiation to elongation mode. *FEBS Letters*. **564**: 41-46.
- Boreggere, T., Davis, R., Bareket-Samish, A. und Kornberg, R. (2001) Quantification of the RNA polymerase II transcription machinery. *J. Biol. Chem.* **276**: 47150-47153.
- Boube, M., Joulia, L., Cribbs, D. und Bourbon, H. (2002) Evidence for a mediator of RNA polymerase II transcriptional regulation conserved from yeast to man. *Cell* **110**: 143-151.
- Brown, J. und Doolittle, F. (1997) Archaea and the Prokaryote-to-Eucaryote transition. *Micobiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 456-502.
- Bult, C., White, O., Olsen, G., Zhou, L., Fleischmann, R., Sutton, G., Blake, J., FitzGerald, L., Clayton, R., Gocayne, J., Kerlavage, A., Dougherty, B., Tomb, J., Adams, M., Reich, C., Overbeek, R., Kirkness, E., Weinstock, K., Merrick, J., Glodek, A., Scott, J., Geoghegan, N., Weidman, J., Fuhrmann, J., Nguyen, D., Utterback, T., Kelley, J., Peterson, J., Sadow, P., Hanna, M., Cotton, M., Roberts, K., Hurst, M., Kaine, B., Borodovsky, M., Klenk, H.,

- Fraser, C., Smith, H., Woese, C. und Venter, C. (1996) Complete genome sequence of the methanogenic Archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* **273**:105-1073.
- Butler, J. und Kadonaga, J. (2002) The RNA polymerase II core promotor: a key component in the regulation of the gene expression. *Genes Dev.* **16**: 2583-2592.
- Bushnell, D., Cramer, P. und Koernberg, R. (2001) Structural basis of transcription: α -Amanitin-RNA polymerase II cocrystal at 2,8 Å resolution. *PNAS* **99**: 1218-1222.
- Carles, C., Treich, I., Bouet, F., Riva, M., und Sentenac, A. (1991) Two additional common subunits, ABC10 α and ABC10 β , are shared by yeast RNA polymerases. *J. Biol. Chem.* **266**: 24092-24096.
- Chen, H.-T., und Hahn, S. (2004) Mapping the location of TFIIB within the RNA polymerase II transcription preinitiation complex: a model for the structure of the PIC. *Cell* **119**: 169-180.
- Chen, H.-T., Warfield, L., und Hahn, S. (2007) The positions of TFIIF and TFIIE in the RNA polymerase II transcription preinitiation complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**: 696-703.
- Chen, G. und Yang J. (1977) Two-point calibration of circular dichrometer with d-10 camphorsulfonic acid. *Analytical Letters* **10**: 1195-1207.
- Choe, S., Schultz, M. und Reeder, R. (1992) *In vitro* definition of the yeast RNA polymerase I promoter. *Nucleic Acids Res.* **20**: 279-289.
- Christianson, T., Sikorski, R., Dante, M., Sher, J. und Hiezer, P. (1992) Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* **110**: 119-122.
- Cramer, P., Bushnell, D.A., und Kornberg, R.D. (2001) Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 Ångstrom resolution. *Science* **292**: 1863-1876.
- Cramer, P. (2006) Recent structural studies of RNA polymerase II and III. *Biochem. Soc. Trans.* **34**:1058-1061.
- Cramer, P., Armanche, K-J., Baumli, S., Benkert, S., Brueckner, F., Buchen, C., Damsma, G., Dengl, S., Geiger, S., Jasiak, A., Jawhari, A., Jennebach, S., Kamenski, T., Kettenberger, H., Kuhn, C., Lehman, E., Leike, K., Sydow, J. und Vannini, A. (2008) Structure of eukaryotic RNA polymerases. *Annu. Rev. Biophys.* **37**: 337-352.
- Dumay, H., Acker, J., Arrebola, R., Sentenac A. und Marck, C. (1999) Multiple roles of the τ 131 subunit of yeast transcription factor IIIC (TFIIIC) in TFIIIB assembly. *Molecular and Cellular Biology* **22**: 298-308.
- Edwards, A., Kane, C., Young, R. und Kornberg, R. (1991) Two dissociable subunits of yeast RNA polymerase II stimulate the initiation of transcription at a promoter *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **266**: 71-75.
- Elkins, J., Podar, M., Graham, D., Makarova, K., Wolf, Y., Randau, L., Hedlund, B., Brochier-Armanet, C., Kunin, V., Anderson, I., Lapidus, A., Goltsman, E., Barry, K., Koonin, E., Hugenholtz, P., Kyprides, N., Wanner, G., Richardson, P., Keller, M. und Stetter, K. (2008) A korarchaeal genome reveals insights into the evolution of the Archaea. *PNAS* **105**: 8102-8107.
- Facciotti, M., Reiss, D., Pan, M., Kaur, A., Vuthoori, M., Bonneau, R., Shannon, P., Srivastava, A., Donohoe, S., Hood, L. und Baliga, N. (2006) General transcription factor specified global gene regulation in archaea. *PNAS* **104**: 4630-4635.
- Ferreira-Cerca S., Pöll G., Kühn H., Neueder A., Jakob S., Tschochner H. und Milkereit P. (2007) Analysis of the *in vivo* assembly pathway of eukaryotic 40S ribosomal proteins. *Molecular Cell* **28**: 446-457.

- Fiala, G. und Stetter, K. (1986) *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaebacteria growing optimally at 100°C. *Arch. Microbiol.* **145**: 56-61.
- Geiduschek, P. und Ouhammouch, M. (2005) Archaeal transcription and its regulators. *Mol. Micro.* **56**: 1397-1407.
- Gietz, D und Sugino A. (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**: 527-534.
- Gnatt, A., Cramer, P., Fu, J., Bushnell, D. und Kornberg, R. (2001) Structural basis of transcription: An RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science* **292**: 1876-1882.
- Goede, B., Naji, S., von Kampen, O., Ilg, K., und Thomm, M. (2006) Protein-protein interactions in the archaeal transcriptional machinery: binding studies of isolated RNA polymerase subunits and transcription factors. *J. Biol. Chem.* **281**: 30581-30592.
- Goffeau et al.,(1997) The yeast genome directory. *Nature* **387**: 5.
- Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D.I. und Metoz, F. (1999) ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**: 305-308.
- Grandemange, S., Schaller, S., Yamano, S., Du Manoir, S., Shpakovski, G., Mattei, M., Claude Kedinger, C. und Vigneron, M. (2001) A human RNA polymerase II subunit is encoded by a recently generated multigene family. *BMC Molecular Biology* **2**:14.
- Gribskov, M. und Burges, R. (1986) Sigma factors from *E. coli*, *B. subtilis*, phage SP01 and phage T1 are homologous proteins. *Nucleic Acids Res.* **14**: 6745-6763.
- Grohmann, D., Hirtreiter, A. und Werner, F. (2009) Molecular mechanisms of archaeal RNA polymerase. *Biochemical Society Transactions* **37**: 12-17.
- Grünberg, S., Bartlett, M.S., Naji, S., und Thomm, M. (2007) Transcription factor E is a part of transcription elongation complexes. *J. Biol. Chem.* **282**: 35482-35490.
- Hahn, S. (2004) Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 394-403.
- Hausner, W. und Thomm, M. (2001) Events during initiation of archaeal transcription: Open complex formation and DNA-protein interactions. *J. of Bacteriology* **183**: 3025-3031.
- Hausner, W. und Thomm, M. (1995) The translation product of the presumptive *Thermococcus celer* TATA-binding protein sequence is a transcription factor related in structure and function to *Methanococcus* Factor B. *J. Biol. Chem.* **270**: 17649-17651.
- Hausner, W., Wettach, J., Hethke, C. und Thomm, M. (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**: 30144-30148.
- Hayashi, K., Watanabe, T., Tanak, A., Furumoto, T., Sato-Tsuchiya, C., Kimura, M., Ishihama, A., Hanaoka, F. und Ohkuma, Y. (2005) Studies of *Schizosaccharomyces pombe* TFIIE indicate conformational and functional changes in RNA polymerase II at transcription initiation. *Genes to Cells* **10**: 207-224.
- Heil, A. und Zillig, W. (1970) Reconstitution of bacterial DNA-dependent RNA-polymerase from isolated subunits as a tool for elucidation of the role of the subunits in transcription. *FEBS letters* **11**: 165-168.

- Hethke, C., Geerling, A., Hausner, W., Vos, W. und Thomm, M. (1996) A cell-free transcription system for the hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Nucleic Acids Res.* **24**: 2369-2376.
- Hirata, A., Klein, B.J., und Murakami, K.S. (2008) The X-ray crystal structure of RNA polymerase from Archaea. *Nature* **451**: 851-854.
- Hohn, M., Brian P. Hedlund, B. und Huber, H. (2002) Detection of 16S rRNA sequences representing the novel phylum “Nanoarchaeota”: Indication for a wide distribution in high temperature biotopes. *Systematic and Applied Microbiology* **25**: 551-554
- Holstege F., Fiedler, U. und Timmers, H. (1997) Three transitions in the RNA polymerase II transcription complex during initiation. *EMBO J.* **16**: 7468-7480.
- Hu, P., Wu, S., Sun, Y., Yuan, C., Kobayashi, R., Myers, M. und Hernandez, N. (2002) Characterization of human RNA polymerase III identifies orthologues for *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III subunits. *Molecular and Cellular Biology* **22**: 8044-8055.
- Jasiak, A., Armache, K., Martens, B., Jansen, R. und Cramer, P. (2006) Structural biology of RNA polymerase III: Subcomplex C17/25 X-ray structure and 11 subunit enzyme model. *Mol. Cell* **23**: 71-81.
- Kassavetis, G., Braun, B., und Geiduschek, P. (1990) *S. cerevisiae* TFIIIB is the transcription initiation factor proper of RNA polymerase III, while TFIIIA and TFIIIC are assembly factors. *Cell* **60**: 235-45.
- Kassavetis G. und Geiduschek, P. (2006) Transcription factor TFIIIB and transcription by the RNA polymerase III. *Biochem. Soc. Trans.* **34**: 1082-1087.
- Keener, J., Josaitis, C., Dodd, J. und Nomura, M. (1998) Reconstitution of yeast RNA polymerase I transcription *in vitro* from purified components. *J. Biol. Chem.* **273**: 33795-33802.
- Kelman, Z. und White, M. (2005) Archaeal DNA replication and repair. *Curr. Opinion in Microbiol.* **8**: 669-676.
- Kettenberger, H., Eisenführ, A., Brueckner, F., Theis, M., Famulok, M. und Cramer, P. (2006) Structure of an RNA polymerase II-RNA inhibitor complex elucidates transcription regulation by noncoding RNAs. *Nature Structural and Molecular Biology* **13**: 44 – 48.
- Kim, T., Lagrange, T., Wang, Y., Griffith, J., Reinberg, D. und Ebright, R. (1997) Trajectory of DNA in the RNA polymerase II transcription preinitiation complex. *PNAS* **94**: 12268-12273
- Kireeva, M.L., Komissarova, N., Waugh, D.S., und Kashlev, M. (2000) The 8-nucleotide-long RNA:DNA hybrid is a primary stability determination of the RNA polymerase II elongation complex. *J. Biol. Chem.* **275**: 6530-6536.
- Koga, Y. und Morii, H. (2007) Biosynthesis of ether-type polar lipids in Archaea and evolutionary considerations. *Microbiol. and Mol. Biology Reviews* **71**: 97-120.
- Koonin, E., Makarova, K. und Elkins, J. (2007) Orthologs of the small RPB8 subunit of the eukaryotic RNA polymerases are conserved in hyperthermophilic Crenarchaeota and “Korarchaeota”. *Biology Direct* **2**: 38.
- Kornberg, R. und Lorch, Y. (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* **98**: 285-294.
- Kuhn, C., Geiger, S., Baumli, S., Gartmann, M., Gerber, J., Jennebach, S., Mielke, T., Tschochner, H., Beckmann, R. und Cramer, P. (2007) Functional architecture of RNA polymerase I. *Cell* **131**: 1260-1272.

- Kusser, A.G., Bertero, M.G., Naji, S., Becker, T., Thomm, M., Beckmann, R., und Cramer, P. (2008) Structure of an archaeal RNA polymerase. *J Mol Biol* **376**: 303-307.
- Kuznedelov, K. und Severinov, K. (2009) Recombinant bacterial RNA polymerase: Preparation and applications. *Methods* **47**: 44-52.
- Kwapisz, M., Beckouet, F. und Thuriaux, P. (2008) Early evolution of eukaryotic DNA-dependent RNA polymerases. *Trends in Genetics* **24**: 211-215.
- Kyrpides, N. und Ouzounis, C. (1999) Transcription in Archaea. *PNAS* **96**: 8545-8555.
- Lalo, D., Carles, C., Sentanac, A. und Thuriaux, P. (1993) Interactions between three common subunits of yeast RNA polymerases I and III. *PNAS* **90**: 5524-5528.
- Lange, U. und Hausner, W. (2004) Transcriptional fidelity and proofreading in Archaea and implications for the mechanism of TFS-induced RNA cleavage. *Mol. Micro.* **52**: 1133-1143.
- Langer, D., Hain, J., Thuriaux, P. und Zillig, W. (1995) Transcription in Archaea: Similarity to that in Eucarya. *PNAS* **92**: 5768-57772.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A. und Lopez, R. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947-2948.
- Le, T., Zhang, S., Hayashi, N., Yasukawa, M., Delgermaa, L. und Murakami, S. (2005) Mutational analysis of human RNA polymerase II subunit (Rpb5): The residues critical for interactions with TFIIF subunit RAP30 and Hepatitis B virus X protein. *J. of Biochemistry* **138**: 215-224.
- Lill, U., Behrendt, E. und Hartmann, G. (1975) Hybridization in vitro of subunits of the DNA-dependent RNA polymerase from Escherichia coli and Micrococcus luteus. *Eur. J. Biochem.* **52**: 411-420.
- Lin, Y., Nomura, T., Cheong, J., Dorjsuren, D., Iida, K. und Murakami, S. (1997) Hepatitis B virus X protein is a transcriptional modulator that communicates with transcription factor IIB and the RNA polymerase II subunit 5. *J. Biol. Chem.* **272**: 7132-7139.
- Lorenzen, K., Vannini, A., Cramer, P. und Heck, A. (2007) Structural biology of RNA polymerase III: Mass spectrometry elucidates subcomplex architecture. *Structure* **15**: 1237-1245.
- Lu, Q., Han, J., Zhou, L., Coker, J., DasSarma, P., DasSarma, S. und Xiang, H. (2008) Dissection of the regulatory mechanism of a heat-shock responsive promotor in Halobacteria: a new paradigm for general transcription factor directed archaeal gene regulation. *Nucleic Acids Res.* **36**: 3031-3042.
- Meka, H., Daoust, G., Arnvig, K., Werner, F., Brick, P. und Onesti, S. (2003) Structural and functional homology between the RNAPI subunits A14/A43 and the archaeal RNAP subunits E/F. *Nucleic Acids Research*. **31**: 4391-4400.
- Meyers, L. und Kornberg, R. (2000) Mediator of transcriptional regulation. *Annual Review of Biochemistry* **69**: 729-749.
- Minakhin, I., Bhagat, S., Brunning, A., Campbell, E., Darst, S., Ebright, R. und Severinov, K. (2001) Bacterial RNA polymerase subunit ω and eukaryotic RNA polymerase subunit Rpb6 are sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly. *PNAS* **98**: 892-897.

- Miyao, T., Honda, A., Qu, Z. und Ishihama, A. (1998) Mapping of Rpb3 and Rpb5 contact sites on two large subunits, Rpb1 and rpb2, of the RNA polymerase II from fission yeast. *Mol. Gen. Genet.* **259**: 123-129.
- Miyao, T. und Woychik, N. (1998) RNA polymerase subunit Rpb5 plays a role in transcriptional activation. *PNAS* **95**: 15281-15286.
- Moss, T., Langlois, F., Gagnon-Kugler, T. und Stefanovsky, V. (2007) A housekeeper with the power of attorney: the rRNA genes in ribosome biogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**: 29-49.
- Murakami, K., Masuda, S. und Darst, Seth. (2002) Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 Å resolution. *Science* **296**: 1280-1284.
- Naji, S., Bertero, M.G., Spitalny, P., Cramer, P., und Thomm, M. (2008) Structure-function analysis of the RNA polymerase cleft loops elucidates initial transcription, DNA unwinding, and RNA displacement. *Nucleic Acids Res* **36**: 676-687.
- Naji, S., Grünberg, S., und Thomm, M. (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**: 11047-11057.
- Navarro, F. und Thuriaux, P. (2000) In vivo misreading by tRNA overdose. *RNA* **6**: 103-110.
- Nesser, N., Peterson, D. und Hawley, D. (2006) RNA polymerase II subunit Rpb9 is important for transcriptional fidelity *in vivo*. *PNAS* **103**: 3268-3273.
- Nogi, Y., Yano, R. und Nomura, M. (1991) Synthesis of large rRNAs by RNA polymerase II in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in RNA polymerase I. *PNAS* **88**: 3962-3966.
- Nottebaum, S., Tan, L., Trzaska, D., Carney, H.C., und Weinzierl, R.O.J. (2008) The RNA polymerase factory: a robotic *in vitro* assembly platform for high-throughput production of recombinant protein complexes. *Nucleic Acids Res* **36**: 245-252.
- Ouhammouch, M., Dewhurst, R., Hausner, W., Thomm, M. und Geiduschek, P. (2003) Activation of archaeal transcription by recruitment of the TATA-binding protein. *PNAS* **100**: 5097-5102
- Ouhammouch, M., Werner, F., Weinzierl, R. und Geiduschek, P. (2004) A fully recombinant system for activator-dependent archaeal transcription. *J. Biol. Chem.* **279**: 51719-51721.
- Orphanides, G., Lagrange, T. und Reinberg, D. (1996) The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.* **10**: 2657-2683.
- Palncade, B., und Bensaude, O. (2003) Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation. *FEBS* **270**: 3859-3870.
- Poole, F., Gewre, B., Hopkins, G., Schut, G., Weinberg, M., Jenney, F. und Adams, M. (2005) Defining genes in the genome of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: implications for all microbial genomes. *J. of Bacteriology* **187**: 7325-7332.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nielson, E., Wilm, M. und Seraphin, B. (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: A general procedure of protein complex purification. *Methods* **24**: 218-229.
- Reed, J. und Reed, T. (1997) A set of constructed type spectra for the practical estimation of peptide secondary structure from circular dichroism. *Analytical Biochem.* **254**: 36-40.
- Reich, C., Zeller, M., Milkereit, P., Hausner, W., Cramer, P., Tschochner, H., Thomm, M. (2009) The archaeal RNA polymerase subunit P and the eukaryotic polymerase subunit Rpb12 are interchangeable *in vivo* and *in vitro*. *Molecular Microbiology* **71**: 989-1002.

- Rigaut, G., Shechenko, A., Rutz, B., Wilm, M. und Seraphin, B. (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature Biotech.* **17:** 1030-1032.
- Rubbi, L., Labarre-Mariotte, S., Chédin, S., und Thuriaux, P. (1999) Functional characterization of ABC10 α , an essential polypeptide shared by all three forms of eukaryotic DNA-dependent RNA polymerases. *J. Biol. Chem.* **274:** 31485-31492.
- Sambrock und Russel (2001) Molecular Cloning.
- Savitzky, A. und Golay, M. (1964) Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Analytical Chemistry* **36:** 1627-1639.
- Schramm, L. und Hernandez, N. (2002) Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev.* **16:** 2593-2620.
- Seitz T. (1998) A mechanism for all polymerases. *Nature* **391:** 231-232.
- Shpakovski, G.V., Acker, J., Wintzerith, M., Lacroix, J.F., Thuriaux, P., und Vigneron, M. (1995) Four subunits that are shared by the three classes of RNA polymerase are functionally interchangeable between *Homo sapiens* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **15:** 4702-4710.
- Shpakovski, G., Gadale, O., Labarre-Mariotte, S., Lebedenko, E., Miklos, I., Sakurai, H., Proshkin, S., Mullem, V., Ishihama, A. und Thuriaux, P. (1999) Functional conservation of RNA polymerase II in fission and budding yeasts. *Journal of Molecular Biology* **295:** 1119-1127.
- Siaut, M., Zaros, C., Levivier, E., Ferri, M., Court, M., Werner, M., Callebaut, I., Thuriaux, P., Sentenac, A. und Christine Conesa C. (2003) An Rpb4/Rpb7-like complex in yeast RNA polymerase III contains the orthologue of mammalian CGRP-RCP. *Molecular and Cellular Biology* **23:** .195-205.
- Siebers, B. und Schönheit, P. (2005) Unusual pathways and enzymes of central carbohydrate metabolism in Archaea. *Current Opin. in Microbiol.* **8:** 695-705.
- Sikorski R. und Hieter P (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122:** 19-27.
- Smale, S. und Kadonaga, J. (2003) The RNA polymerase II core promotor. *Annu. Rev. Biochem.* **72:** 449-479.
- Spitalny P. und Thomm, M. (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:** 30497-30505.
- Spitalny, P. und Thomm, M. (2008) A polymerase III-like reinitiation mechanism is operating in regulation of histone expression in archaea. *Mol Microbiol* **67:** 958-970.
- Steffan, J., Keys, D., Dodd, J. und Nomura M. (1996) The role of TBP in rRNA transcription by RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae*: TBP is required for upstream activation factor-dependent recruitment of core factor. *Genes Dev.* **10:** 2551-2563.
- Tan, L., Wiesler, S., Trzaska, D., Carney, H. und Weinzierl, R. (2008) Bridge helix and trigger loop perturbations generate superactive RNA polymerases. *Journal of Biology* **7:40**.
- Taylor, R., Walker, D. und McInnes, R. (1993) E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Res.* **21:** 1677-1678.

- Thiru, A., Hodach, M., Eloranta, J., Kostourou, V., Weinzierl, R. und Matthews, S. (1999) RNA polymerase subunit H features a β-Ribbon motif within a novel fold that is present in Archaea and Eukaryotes. *J. Mol. Biol.* **287**: 753-760.
- Thomm M., (2007) Transcription: Mechanisms and regulation. *Archaea: Molecular and Cellular Biology* 139-157.
- Thomm, M., Reich, C., Grünberg, S. und Naji, S. (2009) Mutational studies of archaeal RNA Polymerase and analysis of hybrid RNA Polymerases. *Biochem. Soc. T.* **37**: 18-22.
- Todone, F., Weinzierl, R., Brick, P. und Onesti, S. (2000) Crystal structure of RPB5, a universal eukaryotic RNA polymerase subunit and transcription factor interaction target. *PNAS* **97**: 6306-6310.
- Treich, L., Carles, C., Sentenac, A., und Riva, M. (1992) Determination of lysine residues affinity labeled in the active site of yeast RNA polymerase II(B) by mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* **20**: 4721-4725.
- Trinh, V., Lagelier, M., Archambault, J. und Coulombe, B. (2006) Structural perspective on mutations affecting the function of multisubunit RNA polymerase. *Microbiol. and Molec. Biology Reviews*. **70**: 12-36
- Vassylyev, D., Vassylyeva, M., Perederina, A., Tahirov, T. und Artsimovitch I. (2007) Structural basis for transcription elongation by bacterial RNA polymerase. *Nature* **448**:157-162.
- Voth, W., Jiang, W. und Stillman, D. (2003) New “marker swap” plasmids for converting selectable markers on budding yeast gene disruptions and plasmids *Yeast* **20**: 985 – 993.
- Wang, Y., Liu, C., Storey, J., Tibshirani, R., Herschlag, D. und Brown, P. (2002) Precision and functional specificity in mRNA decay. *PNAS* **99**: 5860-5865.
- Warner J. (1999) The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *TIBS* **24**: 437-440.
- Wei, W., Dorjsuren, D., Lin, Y., Qin, W., Nomura, T., Hayashi, N. und Murakami, S. (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**: 12266-12273.
- Werner, F., und Weinzierl, R.O.J. (2002) A recombinant RNA polymerase II-like enzyme capable of promoter-specific transcription. *Mol Cell* **10**: 635-646.
- Werner, F., Eloranta, J.J., und Weinzierl, R.O.J. (2000) Archaeal RNA polymerase subunits F and P are *bona fide* homologs of eukaryotic RPB4 and RPB12. *Nucleic Acids Res* **28**: 4299-4305.
- Westover, K., Bushnell, D. und Kornberg, R. (2004) Structural Basis of Transcription Nucleotide Selection by Rotation in the RNA Polymerase II Active Center. *Cell* **119**:481-489.
- Wettach, J., Gohl, H.P., Tschochner, H., und Thomm, M. (1995) Functional interaction of yeast and human TATA-binding proteins with an archaeal RNA polymerase and promoter. *Proc. National Acad. Sci. USA* **92**: 472-476.
- Widlund, P.O., und Davis, T.N. (2005) A high-efficiency method to replace essential genes with mutant alleles in yeast. *Yeast* **22**: 769-774.
- Woese, C., Kandler, O. und Wheelis, M. (1990) Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *PNAS* **87**: 4576-4579.
- Woychik, N. und Hampsey, M. (2002) The RNA Polymerase II Machinery: Structure Illuminates Function. *Cell* **108**: 453-463.

Literaturverzeichnis

- Yudkovsky N., Ranisch, J. und Hahn, S. (2000) A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature* **408**: 225-229.
- Zaros, C., Briund, J., Boulard, Y., Labarre-Mariotte, S., Garcia-Lopez, C., Thuriaux, P. und Navarro, F. (2007) Functional organization of the Rpb5 subunit shared by the three yeast RNA polymerases. *Nucleic Acids Research* **35**: 634-647.
- Zhang, G., Campbell, E., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K. und Darst, S. (1999) Crystal structure of *Thermus aquaticus* Core RNA Polymerase at 3,3 Å Resolution. *Cell* **98**: 811-824

Anhang

1. Abkürzungen

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
Å	Ångström (10^{-10} m)
APS	Ammoinumperoxiddisulfat
As	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BRE	Factor B Recognition Element
BSA	Bovines Serumalbumin
Bq	Becquerel
C	Cytosin
CTD	C-terminale Domäne (von Rpb1)
CTP	Cytosin-Triphosphat
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ddNTP	Di-Desoxynukleotidtriphophat
dNTP	Desoxynukleotidtriphophat
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylenedinitrilotetraessigsäure
EK	Endkonzentration
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
<i>et al.</i>	Et alii
FOA	Fluorourotat
G	Guanosin
Gdh	Glutamat Dehydrogenase
GTP	Guanosin-Triphoshat
H	Stunde
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
K	kilo
LB	Luria-Broth
M	mol l ⁻¹
Min	Minute
mRNA	Messenger RNA
MW	Molecular Weight
NaAc	Natrium-Aacetat
NiNTA	Nickel-Nitrilotriacetic Acid
Nt	Nucleotid
NTP	Nucleotid-Triphoshat
OD	Optische Dichte
Oligo	Oligonukleotid
ORF	Open reading frame
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase- Kettenreaktion
<i>Pfu, P. furiosus</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pI	Isoelektrischer Punkt

PIC	Präinitiationskomplex
PNK	Polynukleotidkinase
PMSF	Phenylmethyl-Sulphonyl Flouorid
Pol I-III	eukaryotische RNA-Polymerase I-III
Poly[d(I-C)]	Poly-desoxy-Cytosin-desoxy-Inosin
PVDF	Polyvenylenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	DNA- abhängige RNA-Polymerase
rRNA	ribosomale RNA
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
Rpa	RNAP I Untereinheit
Rpb	RNAP II Untereinheit
Rpc	RNAP III Untereinheit
s	Sekunden
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Saccharomyces pombe</i>
SDS	Natriumdedocysulfat
T	Thymidin
TAP	Tandem Affinity Purification
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TBP	TATA-Box-Bindeprotein
TE	10mM tris, 0,1 mM EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TFB	Transkriptionsfaktor B
TFIIB,E,F,H,D	Transkriptionsfaktor der RNAP II B,E,F,H,D
TFE	Transkriptionsfaktor E
TFS	Transkriptionsfaktor S
tRNA	Transfer-RNA
TPP	Thymidin-triphosphat
U	Units
UTP	Uridin-Triphosphat
UV	ultraviolet
v/v	Prozentsatz Volumen zu Volumen
w/v	Prozentsatz Gewicht zu Volumen
wt	Wildtyp
YPD	Medium aus Hefeextrakt, Pepton und Glukose
YPG	Medium aus Hefeextrakt, Pepton und Galactose
z. B.	zum Beispiel

2. Buchstabencode der Aminosäuren:

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

3. Anlage 1

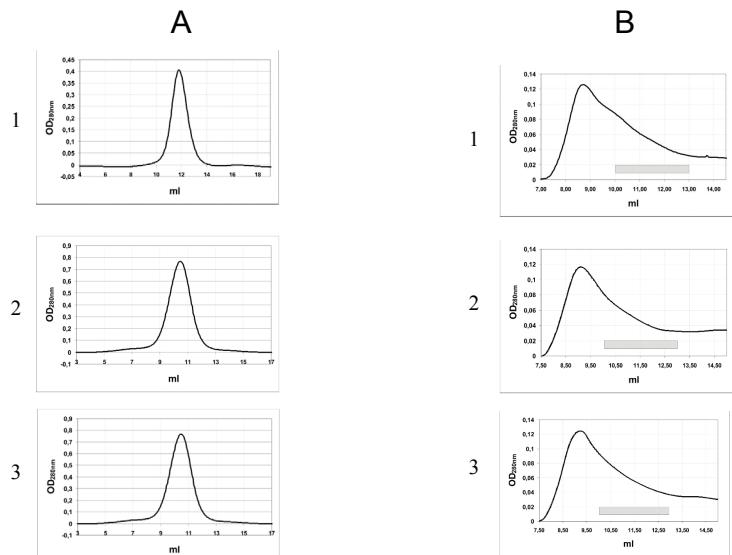


Abb. A1 Elutionsprofile der RpoP Varianten und Elutionsprofile der im Abschnitt über RpoP verwendeten RNAP. *A.* Es sind die Elutionsprofile der drei mutierten Formen von RpoP von einer SP XL 1 ml Kationenaustauschersäule gezeigt. Die Proteine wurden mit Hilfe eines linearen Gradienten von 10 mM bis 1 M NaCl eluiert (Methoden 2.8.). Profil 1 zeigt die C27/30S Mutante, Profil 2 die R26A Mutante und Profil 3 die S32A Mutante von RpoP. *B.* Es sind Elutionsprofile der rekonstituierten RNAP mit der C27/30S Variante von RpoP (Profil 2), der ΔP RNAP (Profil 1) und des wt Enzyms (Profil 3) gezeigt. Die Abbildung zeigt die Elution von einer Gelfiltrationssäule (Superdex 200). Die transkriptionell aktiven Fraktionen eluieren zwischen 10-13 ml und sind mit einem grauen Balken gekennzeichnet.

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:

Thomm, M., Reich, C., Grünberg, S. und Naji, S. (2009) Mutational studies of archaeal RNA polymerase and analysis of hybrid RNA polymerases. *Biochemical Society Transactions* **37**: 18-22.

Reich, C., Zeller, M., Milkereit, P., Hausner, W., Cramer, P., Tschochner, H., Thomm, M. (2009) The archaeal RNA polymerase subunit P and the eukaryotic polymerase subunit Rpb12 are interchangeable *in vivo* and *in vitro*. *Molecular Microbiology* **71**: 989-1002.

Regensburg, im Februar 2009

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Thomm für die Betreuung der Arbeit und seiner Unterstützung bei der Lösung vieler Probleme. Durch sein Interesse und seine ständige Gesprächsbereitschaft war es mir möglich dieses interessante Thema zu bearbeiten.

Diese interdisziplinäre Arbeit wäre nicht ohne die zusätzliche Unterstützung von Herrn Prof. Dr. Tschochner und Dr. Philipp Milkereit möglich gewesen. Ihre Hilfsbereitschaft und Interesse haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Sterner danke ich ebenfalls für die gute Zusammenarbeit, die vielen guten Ratschläge sowie die Möglichkeit die CD-Spektroskopie durchführen zu können. Tobias Seitz und Claus Tiefenbach danke ich für die praktische Hilfe und die Auswertung der Ergebnisse.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Winfried Hausner, der mir mit vielen Diskussionen und Anregungen immer eine große Hilfe war. An diese freundschaftliche Zusammenarbeit werde ich gerne zurückdenken.

Frau Renate Richau danke ich herzlich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die ständige Hilfsbereitschaft bei der Lösung von Problemen des Laboralltages.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Archaeenzentrums, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben, bedanken. Ich wurde als „Zuagroaster“ herzlich aufgenommen und auch wenn aus mir wohl nie richtiger Bayer wird, so habe ich doch vieles zu schätzen gelernt.

Abschließend möchte ich meinen Freunden und meiner Familie danken, die mich während meiner Promotion immer unterstützt haben. Meiner Tochter Mia Sophie hatte viel Verständnis, wenn ich länger arbeiten musste, aber vor allen anderen bin ich meiner Frau Miriam für ihre Liebe und Beistand dankbar. Ohne sie wäre diese Arbeit sicherlich nicht möglich gewesen.