

**Charakterisierung des archaeellen Elongationsfaktors TFS
und Studien zur Elongation der Transkription in
*Methanococcus***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Udo Lange

Kiel 2003

Referent : PD Dr. Winfried Hausner
Korreferent : Prof. Dr. Micheal Thomm
Tag der mündlichen Prüfung : 11.06.2003
Zum Druck genehmigt : Kiel, 11.06.2003

Der Dekan

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| INHALTSVERZEICHNIS | 1 |
| I EINLEITUNG | 4 |
| II MATERIAL UND METHODEN | 18 |
| 1 Bakterienstämme..... | 18 |
| 2 Bezugsquellen von Chemikalien und Enzymen | 18 |
| 2.1 Enzyme und andere Proteine | 18 |
| 2.2 Chemikalien | 19 |
| 3 Oligonukleotide | 20 |
| 4 Gelelektrophoresen | 21 |
| 4.1 Agarosegele..... | 21 |
| 4.2 Sequenzgelelektrophoresen | 21 |
| 4.3 RNA-Gelelektrophoresen..... | 22 |
| 4.4 Präparative PA/Harnstoffgelelektrophoresen | 23 |
| 4.5 SDS-Polyacrylamidgele | 23 |
| 4.5.1 Silberfärbung | 24 |
| 5 Plasmide | 24 |
| 5.1 Konstruktion der Plasmide pIC 31/30PRO-C46C und pIC 31/30PRO-C46CCC | 25 |
| 5.1.1 Phenolisierung | 26 |
| 5.1.2 Ethanol-fällung | 26 |
| 5.1.3 Agarosegeleelution | 27 |
| 5.2 Ligation und Transformation..... | 28 |
| 5.3 Präparation von Plasmid-DNA | 28 |
| 5.4 DNA-Sequenzierung..... | 29 |
| 5.5 Herstellung der immobilisierten DNA-Matrizen | 29 |
| 6 <i>In vitro</i> -Transkriptionen | 30 |
| 6.1 Immobilisierte <i>in vitro</i> -Transkriptionen..... | 31 |
| 6.2 Herstellung von RNA-Dinukleotid-Standards | 32 |
| 6.3 RNase-Schutzexperimente | 33 |
| 6.4 Exonuklease III-Footprinting | 34 |
| 6.4.1 Exo III-Footprinting unterschiedlicher <i>Methanococcus</i> Elongationskomplexe | 34 |
| 6.5 Kaliumpermanganat-Footprints reifer Elongationskomplexe auf linearisierter Plasmid-DNA | 35 |
| 7 UV-Crosslinking..... | 36 |
| 7.1 UV-Crosslinking mit Azido-GTP und reifen Elongationskomplexen | 37 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| III | ERGEBNISSE | 38 |
| 1 | Charakterisierung des archaeellen Elongationsfaktors TFS | 38 |
| 1. 1 | TFS verstärkt die Nukleaseaktivität in isolierten Elongationskomplexen | 38 |
| 1. 2 | TFS-induzierte Hydrolyse-Produkte sind Dinukleotide | 40 |
| 1. 2. 1 | Verifizierung der durch TFS induzierten Hydrolyseprodukte und Analyse der 10 B RNA | 41 |
| 1. 3 | TFS kann arretierte Komplexe befreien | 43 |
| 2 | Charakterisierung früher und reifer Elongationskomplexe | 44 |
| 2. 1 | Eigenschaften früher und reifer Elongationskomplexe | 45 |
| 2. 1. 1 | Die Aktivität der intrinsischen Nuklease der RNAP früher und reifer Komplexe ist unterschiedlich | 45 |
| 2. 1. 2 | TFS-induzierte Hydrolyse bei reifen Komplexen erfolgt in Dinukleotidschritten..... | 46 |
| 2. 1. 3 | Frühe Elongationskomplexe werden leichter freigesetzt als reife Elongationskomplexe | 48 |
| 2. 2 | Kartierung von frühen und reifen Elongationskomplexen..... | 49 |
| 2. 2. 1 | Schematische Darstellung immobilisierter Exonuklease III-Footprints | 49 |
| 2. 3 | Exo III-Footprints reifer Elongationskomplexe ohne TFS-induzierte Hydrolyse | 50 |
| 2. 4 | Exo III-Footprints reifer Elongationskomplexe mit TFS-induzierter Hydrolyse | 52 |
| 2. 5 | Kaliumpermanganat-Footprint eines reifen Elongationskomplexes..... | 54 |
| 2. 6 | RNase-Schutzexperimente am frühen und am reifen Elongationskomplex | 55 |
| 2. 6. 1 | Frühe und reife Elongationskomplexe schützen unterschiedlich große RNA-Bereiche vor RNase T1-Spaltung..... | 56 |
| 2. 6. 2 | Frühe und reife Elongationskomplexe schützen unterschiedlich große RNA-Bereiche vor RNase A-Spaltung | 57 |
| 2. 7 | Schematische Gegenüberstellung der Kartierung früher und reifer Elongationskomplexe | 59 |
| 3 | Der Motor für TFS-induzierte Hydrolyse ist das Pausieren von Elongationskomplexen | 61 |
| 3. 1 | TFS induziert einen Hydrolyse-Resynthese-Mechanismus in der pausierten RNAP..... | 61 |
| 3. 2 | TFS-induzierte Hydrolyse erfolgt auch in der abortiven Transkription ... | 63 |
| 4 | TFS ist der erste archaeelle Proofreadingfaktor..... | 65 |
| 4. 1 | <i>Mc. thermolithotrophicus</i> -RNAP baut falsche Nukleotide in die RNA- Kette ein | 65 |
| 4. 2 | TFS reaktiviert durch Falscheinbau arretierte Komplexe und entfernt dabei das falsche Nukleotid | 68 |
| 4. 3 | Durch Falscheinbau arretierte Komplexe verlieren nicht den Kontakt | |

| | | |
|---------------------------------------|--|------------|
| | zum 3'-Ende der RNA im katalytischen Zentrum der RNAP | 69 |
| 4. 4 | Der Falscheinbau von UMP anstelle von CMP erfolgt langsamer | 71 |
| 4. 5 | TFS ist in der Lage, Falscheinbau zu unterbinden..... | 72 |
| 5 | Kann eine archaeelle RNAP DNA-Bausteine als Substrat verwenden? | 74 |
| 5. 1 | Der Hydrolyse-Resynthese-Mechanismus hat ein verändertes Hydrolysemuster in Anwesenheit von dCTP..... | 74 |
| 5. 2 | Verifizierung von in die RNA eingebautem dCMP | 76 |
| 5. 3 | Analysen der Auswirkungen von dCMP-Einbau auf die Elongation..... | 77 |
| 5. 3. 1 | dCMP-Falscheinbau führt nicht zum Arrest | 77 |
| 5. 3. 2 | Der dCMP-Einbau der RNAP von <i>Methanococcus</i> ist limitiert auf zwei dCMP in Folge..... | 78 |
| 5. 4 | Die Verlängerungsrate nach dC-Falscheinbau ist verlangsamt..... | 80 |
| 5. 4. 1 | TFS ist in der Lage, das Überlesen von dCMP-Falscheinbau zu verringern | 81 |
| 5. 4. 2 | TFS erhöht das Ausmaß an „run off“-Transkripten in Anwesenheit von dCTP und CTP | 82 |
| 6 | Der Weg der RNA durch die RNAP – Interaktionen zwischen RNAP und RNA | 84 |
| 6. 1 | Im katalytischen Zentrum der RNAP von <i>Mc. jannaschii</i> bindet die A'- Untereinheit an das 3'-Ende der RNA..... | 84 |
| 6. 2 | Innerhalb des RNA-DNA-Hybrids verändern sich sowohl die Kontakte zwischen RNA und RNAP-Untereinheiten als auch die Stärke der Interaktionen..... | 86 |
| IV DISKUSSION | | 88 |
| V ZUSAMMENFASSUNG..... | | 108 |
| VI SUMMARY..... | | 110 |
| VII LITERATURVERZEICHNIS | | 112 |
| VIII ANHANG..... | | 128 |
| 1 | Abkürzungen | 128 |
| 2 | Danksagung | 130 |
| 3 | Lebenslauf..... | 131 |
| 4 | Erklärung..... | 132 |

I Einleitung

1. Die Domäne der Archaea und die untersuchten Gattungen *Methanococcus jannaschii* und *Mc. thermolithotrophicus*

Der heutige Stammbaum des Lebens gliedert sich mit seinen drei Ästen in die Domänen der Archaea, Bacteria und Eukarya (Woese & Fox, 1977; Woese et al., 1990; Forterre et al., 2002). Die Archaea haben, ebenso wie die Bacteria, relativ kleine, zirkuläre Genome (~0,5 bis ~5,7 mBp) mit Genen, die häufig co-transkribiert werden. Des Weiteren fehlt beiden eine Kernmembran, weshalb sie zusammen in die Gruppe der Prokaryoten eingeteilt werden. Die Archaea unterscheiden sich grundlegend von den anderen Domänen, insbesondere durch den Aufbau der Zytoplasmamembran, welche Di- und Tetraetherlipide anstelle von Glycerinestern enthält (Gambacorta et al., 1993) und einer Zellwand ohne Muraminsäure (Kandler & König, 1998). Zusätzlich kennzeichnen weitere einzigartige Merkmale die Domäne der Archaea (Graham et al., 2000).

Ausgehend von einem ersten gemeinsamen Vorfahren an der Wurzel des Stammbaumes, der aufgrund von 16S-rRNA-Analysen postuliert wurde, wird angenommen, daß sich die Bacteria zuerst von den beiden anderen Domänen getrennt haben (Woese et al., 2000). Mittlerweile scheint sicher, daß ein thermophiler oder hyperthermophiler Organismus der erste gemeinsame Vorfahre war (Giulio, 2003).

Erste Hinweise auf eine nahe Verwandtschaft zwischen Eukarya und Archaea zeigte die Feststellung, daß die DNA-abhängigen RNA-Polymerasen eine ähnliche Zusammensetzung der Untereinheiten haben (Zillig et al., 1979). Im Gegensatz zu dem zu Beginn angenommenen fast ausschließlichen Vorkommen der Archaea in extremen Regionen (Barnes et al., 1996), ist heutzutage eine ubiquitäre Verbreitung teilweise sogar in relativ großen Mengen akzeptiert (Karner et al., 2001). Sie besiedeln Lebensräume mit Temperaturen von über 100 °C, aber auch gemäßigte Zonen (Pace, 1997) oder arktisches Oberflächenwasser (DeLong et al., 1994).

Trotz der Ähnlichkeit mit den Bacteria haben die Archaea auf der Ebene der Proteine, der Replikation, Transkription und Translation eine höhere Verwandtschaft mit den Eukarya (Olsen & Woese, 1997; Thomm, 2000; Böhlke et al., 2002). Hingegen zeigt die Mehrheit der am Stoffwechsel beteiligten Gene und die Komponenten, die an der Regulation der Transkription beteiligt sind, größere Übereinstimmungen mit den Bacteria (Bell & Jackson, 1998; Kyrpidis & Ouzounis, 1999; Dahlke & Thomm 2001; Vierke & Thomm, 2003). Die Archaea stellen sozusagen ein Mosaik aus einer Kombination bakterieller, eukaryotischer und einzigartiger Eigenschaften dar. Es wird spekuliert, wie dieses Mosaik entstanden

ist. Man nimmt an, daß viele bakterielle Eigenschaften durch horizontalen Gentransfer (Garcia-Vallve et al., 2000; Woese, 2000, 2002) erlangt wurden.

Die Domäne der Archaea gliedert sich in die Reiche der Cren-, Eury- und Korarchaeota. Die Korarchaeota stellen hierbei den bisher am wenigsten untersuchten Zweig der Archaea dar. Aufgrund von 16S-rRNA-Analysen werden die Korarchaeota den Cren- und Euryarchaeota innerhalb der Domäne der Archaea gegenübergestellt (Barns et al., 1994; Barns et al., 1996). Auch der Organismus mit dem kleinsten bekannten Genom, mit einem ungefähren Durchmesser von nur 400 nm, gehört zu den Archaea. *Nanoarchaeum equitans* ist in einer eigenen Gruppe, den Nanoarchaeota, von den anderen abgetrennt (Huber et al., 2002; Hohn et al., 2002).

Die im Verlaufe der Arbeiten untersuchten Gattungen *Methanococcus thermolithotrophicus* und *Methanococcus jannaschii* gehören zu den Methanogenen in die Ordnung *Methanococcales* und in die Gruppe der Euryarchaeota (Brown & Doolittle, 1997). *Mc. thermolithotrophicus* und *Mc. jannaschii* sind strikt anaerobe, autotrophe und thermophile bzw. hyperthermophile Organismen, die Methanogenese betreiben (Huber et al., 1982; Jones et al., 1983). *Mc. jannaschii* ist der erste archaeele Organismus, dessen über 2 mBp großes Genom vollständig sequenziert wurde (Bult et al., 1996). Mittlerweile sind 13 weitere archaeele Genome komplett sequenziert (Institute for genomic research (TIGR) und <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Dazu gehört unter anderem auch das Genom des Methanogenen *Methanosarcina acetivorans*, welches mit ~5,7 mBp das bisher bei weitem größte bekannte archaeele Genom besitzt (Galagan et al., 2002). Die Vielzahl der mittlerweile sequenzierten archaeele Genome vereinfacht vergleichende Analysen mit den anderen Domänen. So konnten die Hauptkomponenten, die am Prozeß archaeele Transkription und Translation beteiligt sind, mit Hilfe einer Kombination biochemischer Analysen und Genom-Sequenzierungen identifiziert werden.

2. Transkription und Transkriptionssysteme

Die Transkription von Genen ist einer der fundamentalen Prozesse, der allen Lebewesen eigen ist, und ist ein primärer Mechanismus zur biologischen Regulation. Die Umschreibung der Gen-Information in das RNA-Molekül erfolgt in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten. Jeder dieser Schritte ist Bestandteil regulatorischer Mechanismen. Beginnend mit der Ausbildung von Initiationskomplexen (=Initiation), schließt sich eine Phase der RNA-Synthese (=Elongation) an, die aus (i) einem „Promoter-escape“, (ii) einer frühen und (iii) einer reifen Phase besteht. Beendet wird die RNA-Synthese beim Erreichen von Stoppsignalen (=Termination).

Ein bei den Archaea im letzten Jahrzehnt ausführlich untersuchter biochemischer Prozeß ist die Initiation der Transkription. Hier können mit Hilfe von *in vitro*-Transkriptionssystemem für z. B. *Sulfolobus shibatae* (Hüdepohl et al., 1990), *Methanococcus vannielii* (Frey et al., 1990), *Pyrococcus furiosus* (Hethke et al., 1996) und *Mc. thermolithotrophicus* (Gohl et al., 1992) Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen den Domänen auf Transkriptionsebene untersucht werden. Bei diesen Untersuchungen konnte biochemisch nachgewiesen werden, daß die archaeele Transkriptionsmaschinerie eukaryellen Typs ist. Sie entspricht einer vereinfachten Form des RNA-Polymerase II-Systems, bestehend aus einer RNA-Polymerase mit ~10-12 Untereinheiten, zwei basalen Transkriptionsfaktoren und Promotorelementen des RNA-Polymerase II-Typs.

3. Initiation der Transkription sowie Aufbau und Funktion der RNA-Polymerase

Da insbesondere die Ereignisse im Verlauf der Initiation der archaeelelen Transkription in unserem Labor genauestens analysiert wurden, erfolgt in diesem Abschnitt eine ausführliche Darstellung der Komponenten der Transkriptionsmaschinerie sowie des Verlaufs der Initiation der archaeelelen Transkription.

Das Kernstück der Transkriptionsmaschinerie ist die RNA-Polymerase (=RNAP), die aufgrund identischer Aufgaben in allen Transkriptionssystemen ähnlich aufgebaut ist (zusammengefaßt in Cramer, 2002). Kristallstrukturen bakterieller und eukaryeller RNAP und Elongationskomplexe belegen, daß insbesondere die aktiven Zentren inklusive einer multifunktionellen Klammer in ihren Strukturen konserviert sind (Zhang et al., 1999; Cramer et al., 2000, 2001; Korzheva et al., 2000; Campbel et al., 2001; Gnatt et al., 2001).

Die RNAP II hat ein Molekulargewicht von ~650 kDa und ist so aufgebaut, daß die beiden größten Untereinheiten RPB1 und RPB2, die die Hauptmasse des Enzyms ausmachen, eigene Bereiche mit einer positiv geladenen tiefen Furche zwischen den beiden Untereinheiten bilden. Jede der kleinen Untereinheiten ist als einzelne Kopie in der Peripherie um die RNAP angeordnet. Diese Struktur ist mit Elementen, die von der RPB1- und RPB2-Untereinheit gebildet werden und die Furche überqueren, quervernetzt. Der RPB1-RPB2-Komplex wird an einem Ende von einem Komplex aus RPB3-, 10-, 11-, und 12-Untereinheiten begrenzt. Im aktiven Zentrum des Enzyms befindet sich ein katalytisches Mg^{2+} -Ion, das mit der RPB1-Untereinheit über drei in allen RNAP konservierten Aspartat-Resten chelatiert ist. Die DNA liegt in B-Form in einem Bereich von ~20 Bp in der Kluft zwischen RPB1 und RPB2 vom Ende der RNAP bis zum aktiven Zentrum. Im Anschluß positionieren sogenannte „Kiefer“, gebildet aus der RPB5-Untereinheit und Regionen aus RPB1 und RPB9, auf der Gegenseite der RPB1-RPB2-Kluft die

DNA. Diese „Kiefer“ sind höchstwahrscheinlich mobile Elemente, die sich über die DNA legen können. Ein zweites mobiles Element in der RNAP II ist die sogenannte gleitende Klammer („sliding clamp“). Sie umschließt die Nukleinsäuren in der tiefen Furche (Fu et al., 1999). Dieses „Klammer“-Element besteht größtenteils aus den NH₂-terminalen Regionen von RPB1 und von RPB6 und einem Anteil der COOH-terminalen Region von RPB2. Die Klammer interagiert mit der DNA und dem DNA-RNA-Hybrid in einem Bereich von ~15 Nukleotiden ab dem aktiven Zentrum und spielt eine wichtige Rolle bei der Ausbildung stabiler und prozessiver Transkriptionskomplexe (Nudler, 1999; Gnatt, 2002). In der abortiven Phase der Transkription schließt sich die Klammer nach der Ausbildung von 3 Phosphodiester-Brücken innerhalb des Transkripts und unterstützt bzw. bewirkt das sogenannte „escape commitment“ (Abschnitt 4). Im Verlauf des RNA-DNA-Hybrids im aktiven Zentrum der RNAP wird eine sogenannte Mauer („wall“) von der RPB2-Untereinheit gebildet, an der die DNA und RNA vorbei müssen. Dieses führt zu einer Biegung der Nukleinsäuren um 90 °. Die große Stabilität von Elongationskomplexen ist bedingt durch RNA-Klammer-Interaktionen („sliding clamp“-Modell), und somit ist die hohe Affinität der RNAP im Verlauf der Transkription für DNA verbunden mit dem Vorhandensein eines RNA-Transkripts (Nudler E., 1999; Abschnitt 4).

Es werden 2 Poren mit einem Durchmesser von jeweils ~12 Angström (Å) gebildet. Ein Trichter, bzw. Pore 1, wird vom Boden der RPB1-RPB2-Kluft gebildet. Durch den Trichter gelangen die Substrate ins katalytische Zentrum. Bei einem Zurückgleiten der RNAP auf der DNA während der Elongation gelangt auch das 3'-Ende der RNA in den Trichter, läßt dem Elongationsfaktor TFIIS aber noch genug Platz, um ihn an das aktive Zentrum zu lassen (Trichterdurchmesser ~30 Å, TFIIS mit β -Faltblatt von ~20 Å; Abschnitt 5). Durch die Pore 2 gelangt die neusynthetisierte RNA aus dem Enzym. Die am höchsten konservierten Strukturelemente in allen RNAP sind immer nahe der RNA-DNA-Hybrid-Bindestelle, einer angrenzenden DNA-Bindestelle und Regionen des Trichters unter dem aktiven Zentrum, an die TFIIS (bei Bacteria GreA und B) bindet, lokalisiert.

Im Gegensatz zu den Eukarya mit 3 RNAP für unterschiedliche Gengruppen, besitzen die Archaea und Bacteria nur eine DNA-abhängige RNAP, von der alle Gengruppen transkribiert werden (Thomm, 2000). In ihrer Struktur ähnelt die archaeele RNAP mit ihren ~10-12 Untereinheiten, wie bereits geschildert, den komplexer aufgebauten eukaryellen RNAP, insbesondere der RNAP II (Langer et al., 1995; Darcy et al., 1999; Bell & Jackson, 2000; Todone et al., 2000; Werner et al., 2002). Es lassen sich innerhalb der Archaea aufgrund von immunologischen Untersuchungen und Sequenzvergleichen zwei Typen von RNAP unterscheiden (Schnabel et al., 1983; Leffers et al., 1989; Pühler et al., 1989). Im Gegensatz zu den Crenarchaeota ist bei den Methanogenen die schwerste Untereinheit B in

jeweils zwei Untereinheiten B' und B'' aufgespalten (Klenk et al., 1992; Langer et al., 1995; Werner et al., 2002). Die kleineren Untereinheiten tragen nach abnehmender Größe die Bezeichnungen D-P. Das Homolog der größten Untereinheit RPB1 der eukaryellen RNAP II ist bei allen Archaea in die Untereinheiten A' und A'' aufgespalten und wird bei den Bacteria durch die β' -Untereinheit dargestellt. Des weiteren sind die Untereinheiten B bzw. B' und B'' der archaeellen RNAP, der RPB2-Untereinheit der eukaryellen RNAP II und der β -Untereinheit der bakteriellen RNAP Homologe. Viele der kleineren Untereinheiten archaeeller RNAP sind homolog zu kleineren eukaryellen Untereinheiten, jedoch nicht zu bakteriellen RNAP. Das vergleichende Modell einer rekombinanten RNAP aus *Mc. jannaschii* (Werner et al., 2002) mit der RNAP II aus *Saccharomyces cerevisiae* zeigt die Ähnlichkeiten auch in der Anordnung der einzelnen Untereinheiten. DNA-Protein-Crosslinking-Analysen im *Pyrococcus furiosus* Initiationskomplex zeigen eindeutige Hinweise auf eine entsprechende Anordnung der größten Untereinheiten (Bartlett et al., 2000).

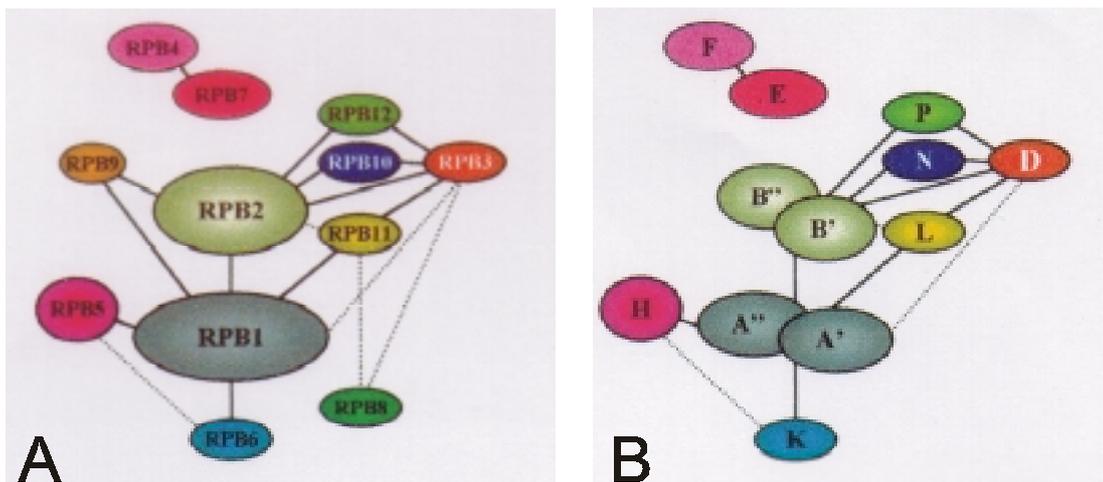


Abb. 1: Schematische Darstellung der Anordnung und Interaktionen der Untereinheiten archaeeller und eukaryeller RNAP. A, Darstellung der Protein-Protein-Interaktionen der RNAP II aus *S. cerevisiae* nach Cramer et al., 2000. B, Darstellung der Protein-Protein-Interaktionen der RNAP aus *Mc. jannaschii* nach Werner et al., 2002. Die Interaktionen zwischen den Untereinheiten und deren Stärke sind durch unterschiedlich starke Linien wiedergegeben. Homologe Untereinheiten sind in identischen Farben dargestellt. RPB8 und RPB9 sind die einzigen RNAP II-Untereinheiten, welche kein archaeelles Homolog besitzen. RPB8 interagiert mit RPB1 und 6 und ist bei der Ausbildung eines Pore 1-Moduls beteiligt (Briand et al., 2001). RPB9 ist *in vivo* nicht essentiell, spielt aber bei der TFIIS-vermittelten Hydrolyse eine Rolle.

Die RNAP binden, vermittelt durch Transkriptionsfaktoren, spezifisch an Promotoren, die den Genen meistens vorgeschaltet sind. Archaeelle Promotoren bestehen aus drei konservierten Sequenzelementen, die denen der RNAP II ähnlich sind (Thomm, 1996, 2000). Das wichtigste Promotorelement, die Box A oder TATA-Box, liegt stromaufwärts des Startpunktes der Transkription bei

Position -25, mit der Konsensussequenz 5'-TTTA^A/_TATA-3' (Thomm & Wich, 1988; Thomm et al., 1989; Reiter et al., 1988a). Sie legt den Startpunkt der Transkription fest (Hausner et al., 1991). Ein Initiatorelement oder Box B, mit der Konsensussequenz 5'-^A/_TTG^A/_C-3' befindet sich bei *Methanococcus* im Startbereich der Transkription (Thomm & Wich, 1988; Reiter et al., 1988; Thomm et al., 1989). Eine allgemeine Konsensussequenz des relativ schwach konservierten Initiatorelements wird mittlerweile mit 5'-TGGGG-3' von Position -1 bis +4, angegeben (Soppa, 1999b). Als Startmotiv für die Transkription bei *Methanococcus* konnte ein Pyrimidin/Purin-Dinukleotid ermittelt werden, wobei die Transkription meist mit Guanin beginnt (Hausner et al., 1991; Reiter et al., 1990). Das dritte Promotorelement archaeeller Gene ist das TFB-„Recognition Element“ oder BRE (Quereshi & Jackson, 1998; Soppa 1999b; Thomm, 2000). Es liegt direkt stromaufwärts der TATA-Box und besteht aus etwa 6 Nukleotiden. Anhand von Vergleichen bekannter archaeeller Gensequenzen konnte festgestellt werden, daß innerhalb des BRE jeweils zwei aufeinanderfolgende Adeninreste an Position -33 und -34 vorkommen (Soppa, 1999a). Eine BRE-Konsensussequenz für Methanogene wurde mit 5'-GCAAA-3' ermittelt.

Ebenso wie bei den Eukarya benötigt die archaeelle RNAP für die effiziente, spezifische Initiation der Transkription Transkriptionsfaktoren (Frey et al., 1990; Hüdepohl et al., 1990; Hausner & Thomm, 1993). Bei *Methanococcus* sind nacheinander die Transkriptionsfaktoren A (aTFA) und B (aTFB) identifiziert worden (Frey et al., 1990; Hausner & Thomm, 1993; Thomm et al., 1994). Beim aTFB handelt es sich um ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von etwa 28 kDa, welches in seiner nativen Form als Dimer vorliegt (Hausner et al., 1993). aTFA und aTFB sind zusammen mit der RNAP im zellfreien Transkriptionssystem in der Lage, die Transkription spezifisch zu initiieren (Hausner & Thomm, 1993; Thomm et al., 1994). Mit Hilfe von Gelshifts konnte die TATA-Box als Bindungsstelle von aTFB identifiziert werden (Gohl et al., 1995). Des weiteren zeigte sich, daß aTFB funktionell durch eukaryelles TBP ersetzt werden kann und daß Antikörper gegen eukaryelles TBP in der Lage sind, aTFB zu inaktivieren (Hausner & Thomm, 1995; Wettach et al., 1995). Die spezifische Bindung von aTFA und aTFB an einen *Pyrococcus* *gdh*-Promotor konnte durch Nukleaseschutzexperimente im zellfreien *Pyrococcus* *furiosus* Transkriptionssystem nachgewiesen werden (Hausner et al., 1996). Daher ist es sinnvoll, die zu den eukaryellen TFIIB und TBP homologen archaeellen Transkriptionsfaktoren aTFA und aTFB als archaeellen Transkriptionsfaktor B (TFB) und archaeelles TATA-Box bindendes Protein (aTBP) zu bezeichnen (Hausner et al., 1996). TFB bindet an promotorgebundenes aTBP und stabilisiert dadurch den Komplex aus aTBP und DNA (Gohl et al., 1995; Wettach et al., 1995). Bei *Sulfolobus shibatae* und *Mc. thermolithotrophicus* konnte die sequenzspezifische Bindung von TFB an das BRE gezeigt werden (Quereshi &

Jackson, 1998; Hausner & Thomm, 2001), welches dadurch die Polarität der Transkription bestimmt (Bell & Jackson, 1999a; Littlefield et al., 1999).

Die Ausbildung eines aktiven Initiationskomplexes erfolgt also in folgender Reihenfolge: Bindung des α TBP an die TATA-Box, Anlagerung (und Stabilisierung) des TFB an den α TBP-TATA-Box-Komplex und anschließende Anlagerung der RNAP (Gohl et al., 1995). In jüngster Vergangenheit konnte mit TFE ein weiterer Transkriptionsfaktor identifiziert werden, der bei der Initiation archaeller Transkription eine Rolle spielt (Bell & Jackson, 1998a). Dieser Faktor ist zur α -Untereinheit des eukaryellen TFIIE homolog und erhöht bei Archaea die Transkriptionseffizienz der RNAP an bestimmten Promotoren (Hanzelka et al., 2001).

Betrachtet man dieses Modell der Initiation der Transkription der Archaea und vergleicht es mit denen der Bacteria und Eukarya, so wird die Ähnlichkeit zur Transkription der eukaryellen RNAP II deutlich (Thomm, 1996, 2000; Bell & Jackson, 1998). Im Anschluß an die Bildung des geschlossenen Initiationskomplexes erfolgt in Abhängigkeit von der Topologie der DNA und der Temperatur die Ausbildung des offenen Initiationskomplexes. Hierbei ist im Gegensatz zu der RNAP II keine Hydrolyse der β - γ -Bindung von ATP notwendig (Hausner & Thomm, 2001). Der aktive offene Initiationskomplex beginnt in Anwesenheit von Ribonukleotiden, 22-27 Nukleotide stromabwärts der TATA-Box, innerhalb des Initiatorelements mit der RNA-Synthese (Hausner et al., 1991).

4. Elongation der Transkription

Im Gegensatz zu der sehr ausführlich untersuchten Initiation der Transkription, ist der Übergang von der Initiation zur Elongation und der Verlauf der Elongation bei Archaea bisher noch weitestgehend unbekannt und basiert auf Vergleichen mit der bakteriellen und eukaryellen Transkription (Bartlett et al., 2000; Bell & Jackson, 2000). Aufgrund dessen soll im folgenden Abschnitt die Elongation domänenübergreifend anhand der Darstellung der Besonderheiten der eukaryellen Elongation veranschaulicht werden.

Jüngste Untersuchungen des Überganges von Initiation zu Elongation (Spitalny & Thomm, 2003 Manuskript eingereicht) und unterschiedlicher Register der Elongation (Hausner et al., 2000; Lange & Hausner, Manuskript in Vorbereitung), unterstreichen insbesondere universelle Vorkommnisse im Verlauf der Elongation, zeigen aber auch einige Besonderheiten innerhalb der Archaea (s. IV Diskussion). Jeder Schritt des RNAP Transkriptionszyklus ist Gegenstand der Regulation. Im ersten Schritt muß ein RNAP-Präinitiationskomplex gebildet werden, welches nur unter Mithilfe der basalen Initiationsfaktoren erfolgen kann (Abschnitt 3). Schon dieser Vorgang unterliegt der Regulation. Bei *P. furiosus* konnte gezeigt werden,

daß häufig eine negative Autoregulation stattfindet (Brinkmann et al., 2000; Dahlke & Thomm, 2001; Vierke & Thomm, 2003). Es handelt sich bei diesen, wie auch bei allen weiteren archaeeellen Transkriptionsregulatoren, um solche des bakteriellen Typs (Kyrpidis & Ouzounis, 1999; Aravind & Koonin, 1999). Die RNA-Synthese beginnt in Anwesenheit von Nukleotiden mit einer abortiven Phase, während der viele kurze RNA (3 bis 16 B) synthetisiert werden und anschließend irreversibel von der RNAP freigesetzt werden (zusammengefaßt in Dvir, 2002). Erst nachdem drei Phosphordiesterbindungen geknüpft wurden (4 B RNA), ist die RNA relativ stabil an den Transkriptionskomplex gebunden (Rice et al., 1993; Holstege et al., 1997; Kugel & Goodrich, 1998, 2002). Dieser Übergang wird auch „escape commitment“ (Kugel & Goodrich, 1998, 2002) genannt. Physikalisch und funktionell bleibt ein solcher Komplex jedoch bis Position $\sim +10$ noch verhältnismäßig instabil (Coppola & Luse, 1984; Cai & Luse 1987; Holstege et al., 1997). Die Stärke des RNA-DNA-Hybrids ist eine wichtige Komponente beim Übergang von Initiation zur frühen Elongation und mit entscheidend für die Menge an abortiver RNA (Keene & Luse, 1999). Stabile ternäre Komplexe werden erst nach Register 11 gebildet, wenn die Transkription in die produktive Phase der Elongation gelangt (Holstege et al., 1997; Sijbrandi et al., 2002). Abgeschlossen wird der Übergang zur eigentlichen Elongation durch das sogenannte „Promoter escape“ bis zur Position $\sim +15$. Ab dann findet keine Interaktion mehr mit den allgemeinen Initiationsfaktoren TFIID (TBP) und TFIIB statt (Zawel et al., 1995). TFIIB diffundiert vom Promotor ab, während TFIID (TBP) gebunden bleibt. Nun erfolgen Interaktionen zwischen RNAP und Elongationsfaktoren. Während der frühen Elongation tendieren die Komplexe noch dazu, zurückzugleiten und in Abhängigkeit von der Sequenz der DNA zu arretieren (Kireeva et al., 2000; Pal et al., 2001). Erst nachdem ~ 40 Basen RNA synthetisiert sind, handelt es sich um reife Transkriptionskomplexe (Rice et al., 1991; Samkurashvili & Luse, 1998). Zur Veranschaulichung der strukturellen Grundlage der Elongation dient das für alle Domänen gültige „sliding clamp“-Modell der RNAP (Darst et al., 1989; Polyakov et al., 1995; Nudler et al., 1996, 1998; Landick, 1997, 2001; Cramer, 2002; Gnatt, 2002). Analog zur DNA Replikationsmaschine, besitzt es insgesamt drei putative Elemente. (i) Eine DNA-Binderegion mit starken nicht-ionischen Interaktionen zwischen RNAP und DNA von ~ 9 Bp, vor der Stelle, an der die DNA sich in die Transkriptionsblase gabelt. (ii) Eine Hybrid-Binderegion, in der ~ 8 Bp RNA-DNA-Hybrid über ionische Wechselwirkungen gehalten wird, wobei die Interaktionen der ersten 3 Nukleotide im Hybrid mit der Klammer am stärksten sind. Zudem erfolgen Interaktionen an (iii) einer hypothetischen RNA-Bindestelle mit $\sim 6-8$ Nukleotiden Ausmaß, die die einzelsträngige RNA aus dem aktiven Zentrum herausführt. Wie bereits dargestellt wurde, sind die Sequenzen im aktiven Zentrum der RNAP, die mit den Nukleinsäuren interagieren, in allen RNAP hochkonserviert (Puhler et al., 1989; Sweetser et al., 1987). Des weitern besitzen eukaryelle,

bakterielle und archaeelle RNAP ähnliche bis gleiche biochemische Eigenschaften. Deshalb ist anzunehmen, daß das „sliding clamp“-Modell universeller Natur ist. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, daß auch die generelle Architektur der RNAP evolutionär konserviert ist (Polyakov et al., 1995).

Die zahlreichen Untersuchungen von Elongationskomplexen ergaben aber, daß es sich bei ihnen nicht um eine Population homogener Intermediäre handelt. Ein Elongationskomplex kann eine Vielzahl an Zuständen inne haben. Mindestens zwölf dieser Zustände sind definiert, von denen zum besseren Verständnis nur sieben kurz dargestellt werden (zusammengefaßt in Fish & Kane, 2002). Man unterscheidet eine (i) aktive von einer (ii) inaktiven Form eines Elongationskomplexes durch die Fähigkeit, kontinuierlich RNA zu synthetisieren. In einem (iii) unaktivierten Zustand ist der Komplex nicht fähig, die RNA zu verlängern, aber dennoch in der Lage zur RNA-Synthese (Erie et al., 1993). Wenn die RNAP in 3'-5'-Richtung auf der DNA zurückgleitet und dabei das 3'-Ende der RNA aus dem katalytischen Zentrum in den Trichter des Substrateinlasses gelangt, ist die RNAP (iv) arretiert und benötigt die Hilfe eines Elongationsfaktors (GreB oder TFIIS) zur (v) Reaktivierung. Ein Zurückgleiten im Verlauf einer (vi) reversen Translokation hat jedoch nicht zwangsläufig einen anschließenden Arrest zur Folge. Ein (vii) pausierter Komplex ist in einem aktiven Zustand, aber aufgrund von zum Beispiel Nukleotidmangel nicht in der Lage, RNA zu synthetisieren. Unabhängig von seinem Zustand umfaßt ein Elongationskomplex in etwa 30 Bp DNA, die von ihm vor exonukleolytischer DNA-Hydrolyse geschützt werden (Samkurashvili & Luse, 1996). Innerhalb dieser Region umfaßt die Transkriptionsblase ~12 bis 17 B einzelsträngige DNA und ein 8 bis 9 Bp RNA-DNA-Hybrid. Abhängig vom Zustand des ternären Komplexes verändert sich jedoch (i) die Positionierung der RNAP auf der DNA und (ii) der vor Nukleasen geschützte RNA-Bereich. Sind im gestellten, aktiven Zustand ~15 B RNA geschützt, so erweitert sich dieser Bereich im arretierten Zustand auf bis zu 27 Nukleotide (Rice et al., 1991; Gu et al., 1996).

Diese Zustände sind zum einen bestimmt durch spezifische DNA-Sequenzen („interne Arrest-Stellen“) und Klasse I- und II-Pausierungssignale oder zum anderen durch DNA-Binde-Proteine. Die Transkriptionsrate von Elongationskomplexen wird von Elongationsfaktoren beeinflusst, wobei eine Unterteilung in drei funktionelle Klassen mit unterschiedlichen Aktionsmechanismen geschieht (Fish & Kane, 2002). Eine Klasse von Elongationsfaktoren unterdrückt das Pausieren und stimuliert die Geschwindigkeit des Nukleotideinbaus (Reines et al., 1996; Conaway et al., 2000). Zu ihnen gehören bei der RNAP II TFIIF (Price et al., 1989), das Elongin (SIII) (Bradsher et al., 1993; Aso et al., 1995) und ELL (Shilatifard et al., 1996). Eine zweite Klasse der Elongationsfaktoren stimuliert die Transkription auf Chromatin-Matrizen. Hierzu gehört zum Beispiel der SWI/SNF-Komplex (Kwon et al., 1994; Imbalzano

et al., 1994). Die dritte Klasse von Elongationsfaktoren ist unter anderem in der Lage, arretierte Komplexe zu reaktivieren. Hierzu gehören GreB bei den Bacteria (Borukhov et al., 1992, 1993) und TFIIS bei den Eukarya (Izban & Luse, 1993b; Rudd et al., 1994).

Interessanterweise entdeckte man eine dem eukaryellen Elongationsfaktor TFIIS ähnliche Sequenz in *Sulfolobus acidocaldarius* und *Mc. thermolithotrophicus* (Langer & Zillig, 1993; Musfeldt, 1997). Insbesondere im C-terminalen Bereich, welcher beim TFIIS für seine Eigenschaften essentiell ist, zeigten sich die größten Übereinstimmungen. Aus diesem Grunde erfolgt einleitend eine ausführliche Darstellung der Struktur und der Funktion von TFIIS in der eukaryellen Elongation.

5. TFIIS, ein eukaryeller Elongationsfaktor mit einem archaeellen „Verwandten“- Aufbau und Funktion

In vitro und *in vivo* kommt es im Verlauf der Elongation immer wieder zu Problemen bei der Fortsetzung der RNA-Synthese. Diese können durch DNA-bindende Proteine (Reines & Mote, 1993), DNA-bindende Reagentien bzw. Moleküle (Reines, 1994) oder bestimmte DNA-Sequenzen, sogenannte interne Arrest-Stellen (Kerppola & Kane, 1991), entstehen. Im Extremfall findet eine Ausbildung von stabilen, arretierten Transkriptionskomplexen statt. Ein arretierter Komplex ist definitionsgemäß aufgrund von Konformationsänderungen der RNAP bzw. dem Zurückgleiten auf der DNA nicht mehr in der Lage, die RNA-Synthese fortzusetzen (Nudler et al., 1997). Hierbei verliert das katalytische Zentrum der RNAP den Kontakt zum 3'-Ende der neusynthetisierten RNA (Nudler et al., 1994; Chamberlin, 1995; Samkurashvili & Luse, 1996; Fiedler & Timmers, 2001; Pal et al., 2001). Bei der RNAP II hilft in diesem Fall TFIIS. Ein allgemeines Modell in Abbildung 2 veranschaulicht den Mechanismus.

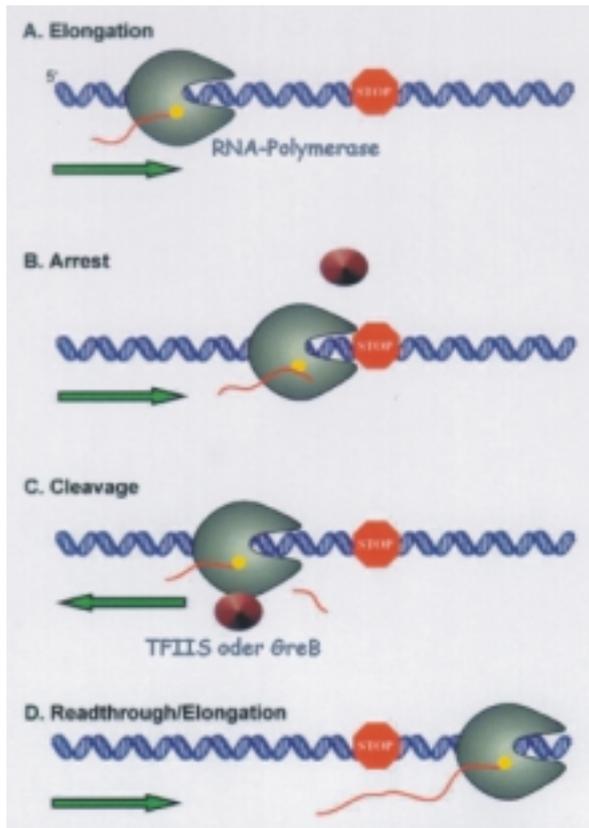


Abb. 2: Allgemeines Modell zum Effekt von „Cleavage“-Faktoren bei arretierten Komplexen. Wenn es im Verlauf der (A) normalen Elongation bedingt durch eine Blockade zum Stillstand der Transkription kommt, entstehen durch den Verlust des 3'-Endes der RNA im aktiven Zentrum der RNAP arretierte Komplexe (B). Arretierte Komplexe sind nicht in der Lage, die Transkription fortzusetzen. Durch die Aktivierung einer intrinsischen 3'-5'-Nukleaseaktivität der RNAP, vermittelt von den Elongationsfaktoren GreB (Bacteria) und TFIIS (C), können die Komplexe nach der Neupositionierung des 3'-Endes der RNA die Transkription fortführen (D). Modell nach Fish & Kane, 2002.

Der Elongationsfaktor aktiviert eine interne RNase-Aktivität der RNAP II (Reines et al., 1992; Izban & Luse, 1992; Reines, 1994; Aso et al., 1995). In einem arretierten ternären Elongationskomplex induziert TFIIS die Hydrolyse von 7-17 Nukleotiden (Izban & Luse, 1993b; Rudd et al., 1994; Samkurashvili & Luse, 1996). Auf diese Weise entsteht ein neues 3'-Ende, welches sich wieder im katalytischen Zentrum der RNAP befindet (Nudler et al., 1994; Chamberlin, 1995). Bei einem noch nicht arretierten, pausierenden Elongationskomplex werden Dinukleotide vom 3'-Ende der neusynthetisierten RNA abgespalten (Izban & Luse, 1992, 1993a). Die durch TFIIS stimulierte Nukleaseaktivität erfolgt unabhängig vom jeweiligen Zustand der RNAP. Einzig das Muster an entstehenden Hydrolyseprodukten verändert sich in Abhängigkeit von ihrem Zustand (Izban & Luse, 1992, 1993a, b). In einer stehenden, Transkriptions-kompetenten RNAP induziert der Faktor die Hydrolyse von Mono- und Dinukleotiden, die von einer erneuten RNA-Synthese begleitet wird. Dieser relativ einfache Mechanismus spielt eine entscheidende Rolle beim Durchlesen von Stoppsignalen (Reines et al., 1993). Wie aber vermittelt TFIIS dieses Signal? Strukturanalysen halfen, diese Frage zu beantworten.

TFIIS besteht aus drei Domänen, von denen die Carboxy-terminalen zwei Drittel für die Funktion *in vitro* ausreichend sind (Morin et al., 1997; Olmstedt et al., 1998; Awrey et al., 1998). Der zwischen den TFIIS verschiedener Organismen am

wenigsten konservierte N-terminalen Domäne I, konnte bisher *in vitro* keine Funktion im Verlauf der Elongation zugeordnet werden (Olmstedt et al., 1998). Von ihr wird aber aufgrund von Protein-Affinitäts-Chromatographien, bei denen Interaktionen mit generellen Initiationsfaktoren und der RNAP II verifiziert werden konnten, angenommen, daß auch sie bei der Transkription eine Funktion hat (Pan et al., 1997). Die konservierte Domäne II besteht aus einem Bündel von drei α -Helices am C-terminalen Ende der Domäne und einer flexiblen Region. Sie dient der Bindung des Faktors an die RNAP (Agarwal et al., 1991; Awrey et al., 1998). Die C-terminale Domäne III besteht aus einem Zinkfingermotiv aus einem dreisträngigen antiparallelen β -Faltblatt mit vier Cysteinresten und einem zentralen Zinkliganden (Quian et al., 1993). Sie vermittelt die Hydrolyseinduktion und kann an einzel- und doppelsträngige Nukleinsäuren binden (Agarwal et al., 1991; Jeon et al., 1994). Eine Linkerregion zwischen den Domänen II und III hat bei der korrekten Positionierung von TFIIS und RNAP eine entscheidende Bedeutung. Des weiteren vermittelt sie die Spezies-Spezifität von TFIIS (Shimasaki & Kane, 2000). Die Domäne III ist im TFIIS, wie auch in verschiedenen RNAP-Untereinheiten (Woychik et al., 1991; Hausner et al., 2000), konserviert. Innerhalb der Domäne III befindet sich in allen TFIIS-Proteinen ein hochkonserviertes (RSADE-) Aminosäure-Muster. Die Aspartat (D)- und Glutamat (E)-Reste in diesem Motiv sind essentiell für die Hydrolyse-Induktion (Ciprés-Palacin et al., 1995; Awrey et al., 1998). Der erste Schritt bei der Reaktivierung des arretierten Transkriptionskomplexes auf molekularer Ebene besteht aus der Interaktion zwischen den α -Helices-Bündeln der Domäne II des TFIIS und der größten Untereinheit (RPB1) der RNAP II. Der Faktor soll dabei an eine äußere Region des Trichters der Pore 1 binden, nahe dem 3'-Ende der RNA im katalytischen Zentrum (Cramer et al., 2001; Gnatt et al., 2001). Die Aktivierung der internen RNase-Aktivität der RNAP II wird durch Anteile der flexiblen Region der Domäne II und des Zinkfingers der Domäne III stimuliert. Die Übertragung des Signals wird durch die RPB9-Untereinheit vermittelt (Awrey et al., 1997; Hemming et al., 2000), welche in Archaea nicht vorhanden ist. Nach einer Hydrolyse der neusynthetisierten RNA kommt es zusätzlich zur Neupositionierung des 3'-Endes der RNA höchstwahrscheinlich zu einer Veränderung der Konformation der RNAP II, wodurch diese wieder in die Lage versetzt wird, die RNA-Synthese fortzusetzen (Awrey et al., 1998).

6. Genauigkeit der Transkription

Zur Herstellung funktioneller Proteine muß im ersten Schritt der Umsetzung genetischer Information die RNAP möglichst genaue Transkripte synthetisieren. Dennoch ist im Gegensatz zur DNA-Replikation, bei der Fehler zu permanenten

genetischen Veränderungen führen, eine absolute Genauigkeit der RNA-Synthese nicht so essentiell. Geschieht bei DNA-Polymerasen nur durchschnittlich alle 10^{-9} bis 10^{-10} Nukleotide ein Falscheinbau (Johnson, 1993; Kunkel & Bebenek, 2000), so besitzt die isolierte RNAP II eine relativ hohe Falscheinbaurate von $\sim 1:10^3$ bis 10^5 (Uptain et al., 1997). Die Genauigkeit der Synthese von DNA-Ketten wird im wesentlichen durch Basendiskriminierung erreicht. Erfolgt jedoch ein Falscheinbau, so kommt es zur Herabsetzung der Einbaugeschwindigkeit des Folgenukleotids und anschließender Entfernung des Falscheinbaus durch eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität in der DNA-Polymerase.

Auch RNAP sind in der Lage, die Genauigkeit der Transkription zu erhöhen. So deuten zum Beispiel Schätzungen von Fehlerraten bei DNA-abhängigen RNAP aus *E. coli* darauf hin, daß die Genauigkeit der Transkription in etwa 1000fach höher ist als von einer erwarteten Knüpfung korrekter oder inkorrektter Basenpaarungen (Libby & Gallant, 1991). Mittlerweile sind auch Modelle für eukaryelles und bakterielles Proofreading durch RNAP bekannt (Erie et al., 1993; Thomas et al., 1998). Geschieht ein Falscheinbau von Nukleotiden bei der Transkription der RNAP II, kommt es auch hier zur Verlangsamung des Einbaus von Folgenukleotiden. Ein solches „Zeitfenster“ ermöglicht der RNAP II ein TFIIIS-vermitteltes Proofreading. Im Gegensatz dazu arretieren *E. coli*-Elongationskomplexe nach Falscheinbau. Verbunden mit dem Herausschneiden von Falschnukleotiden, reaktiviert GreB diese Komplexe und verhilft zur Fortsetzung der Transkription.

7. Ziel der Arbeit

Wie beschrieben wurde, ist der Vorgang der Initiation der Transkription bei Archaea weitestgehend aufgeklärt. Auch regulatorische Mechanismen bei der Initiation sind untersucht worden. Dagegen ist die archaelle Elongation ein noch nahezu unbekannter Bereich. Bisher wurde noch kein archaeller Elongationsfaktor biochemisch beschrieben. In vorhergehenden Arbeiten wurde das vermeintlich zu TFIIIS homologe Protein aus *Mc. thermolithotrophicus* rekombinant hergestellt und stand für eine biochemische Charakterisierung zur Verfügung.

Das primäre Ziel der Arbeit war es daher, das Verständnis der Ereignisse im Verlauf der archaellen Transkription auf die Phase der Elongation zu erweitern. Zunächst sollten (i) abschließende Beweise für die Identifizierung des ersten archaellen Elongationsfaktors erbracht werden. Durch Einsatz dieses Proteins in die archaelle Elongation sollte (ii) der Mechanismus, mit dem dieser Faktor seine Aktivität ausübt, aufgeklärt werden und (iii) daraus folgende regulatorische Möglichkeiten untersucht werden. Des weiteren sollten (iv) erste Hinweise auf

mögliche Besonderheiten der einzelnen Phasen der Elongation bezüglich der Konformation von Elongationskomplexen und (v) der Interaktionen zwischen Nukleinsäuren und RNAP erbracht werden.

II Material und Methoden

1 Bakterienstämme

Escherichia coli, Stamm JM109 (Yanisch-Peron et al., 1985)

Methanococcus jannaschii, DSM 2661 (Jones et al., 1984)

Methanococcus thermolithotrophicus, DSM 2095 (Huber et al., 1982)

2 Bezugsquellen von Chemikalien und Enzymen

2.1 Enzyme und andere Proteine

Enzyme

| | |
|--|--|
| Exonuklease III | MBI Fermentas, Wilna (Litauen) |
| AmpliTaq [®] -DNA Polymerase | Perkin-Elmer Applied Biosystems, Warrington (England) |
| Reader [™] Taq-DNA-Polymerase | MBI Fermentas, Wilna (Litauen) |
| Taq-DNA-Polymerase | Diagonal, Münster |
| T4 Polynukleotid-Kinase | MBI Fermentas, Wilna (Litauen) |
| T4 Ligase | MBI Fermentas, Wilna (Litauen) |
| Alkalische Phosphatase | MBI Fermentas, Wilna (Litauen) |
| <i>Micrococcus</i> -Nuklease | MBI Fermentas, Wilna (Litauen) |
| RNase T1 | Roche, Mannheim |
| RNase A | Roche, Mannheim |
| Restriktionsendonukleasen: | |
| <i>Alw</i> NI | New England Biolabs (USA) |
| <i>Bst</i> EII | MBI Fermentas, Wilna (Litauen) |
| <i>Xho</i> I | MBI Fermentas, Wilna (Litauen) |

Folgende Proteine wurden mir freundlicherweise von Herrn PD Dr. Winfried Hausner zur Verfügung gestellt:

-rekombinantes α TBP, TFB und TFS von *Mc. thermolithotrophicus* und *Mc. jannaschii* (Hausner et al., 2000) und aufgereinigte RNAP von *Mc. thermolithotrophicus* (Frey et al., 1990).

Ein Großteil der im Verlaufe der Arbeit eingesetzten RNAP von *Mc. thermolithotrophicus* und *Mc. jannaschii* wurden im Rahmen einer Praktikums-Betreuung von mir in Zusammenarbeit mit dem Praktikanten Gero Schmeling, nach Frey et al., 1990, aufgereinigt.

2.2 Chemikalien

| | |
|--|---------------------------------|
| 8-Azido-GTP | Altcorp, Lexington (USA) |
| Acrylamid (reinst.) | Serva, Heidelberg |
| Agarose | Eurogentec, Seraing (Belgien) |
| Ampicillin | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| APS | Serva, Heidelberg |
| Bacto-Hefeextrakt | Difco, Detroit (USA) |
| Bacto-Trypton | Difco, Detroit (USA) |
| Bisacrylamid | Bio-Rad, München |
| Bromphenolblau | Serva, Heidelberg |
| Chloroform | Roth, Karlsruhe |
| Dinukleotide (pApC u.a.) | Sigma, St. Louis (USA) |
| dNTP-Mix | MBI Fermentas, Wilna (Litauen) |
| ddNTP-Terminationsmix | MBI Fermentas, Wilna (Litauen) |
| DTT | Biomol, Ilvesheim |
| EDTA | Serva, Heidelberg |
| Essigsäure | Merck, Darmstadt |
| Ethanol | Serva, Heidelberg |
| Ethidiumbromid | Serva, Heidelberg |
| Formaldehyd | Merck, Darmstadt |
| Formamid | Sigma, St. Louis (USA) |
| Glycerin (87 %) | Sigma, St. Louis (USA) |
| Harnstoff | Merck, Darmstadt |
| Isotope ($[\alpha^{32}\text{P}]\text{-ATP/CTP/UTP/dCTP};$ $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$) | Hartmann Analytic, Braunschweig |
| Kaliumpermanganat | Merck, Darmstadt |
| β -Mercaptoethanol | Roth, Karlsruhe |
| Methanol | Merck, Darmstadt |
| N,N'-Methylenbisacrylamid | Serva, Heidelberg |
| NTP-Mix | MBI Fermentas, Wilna (Litauen) |
| Oligonukleotide | MWG, Ebersberg |
| Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol | Roth, Karlsruhe |
| poly[d(AT)] | Sigma, St. Louis (USA) |
| Proteinstandard | Serva, Heidelberg |

Röntgenfilme

| | |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| KODAK BioMax MR | Kodak, Rochester (Großbritannien) |
| FUJI NIF RX | Fuji, Tokio (Japan) |
| Rotiphorese Gel 30 | Roth, Karlsruhe |
| Saccharose | Sigma, St. Louis (USA) |
| SDS | Serva, Heidelberg |
| Sigmacote | Sigma, St. Louis (USA) |
| Streptavidin Magnetpartikel | Roche, Mannheim |
| TEMED | Serva, Heidelberg |
| Tris | Roth, Karlsruhe |
| Whatman-Papier | 3MM, Maidstone (Großbritannien) |
| Xylencyanol | Serva, Heidelberg |

Der Reinheitsgrad der verwendeten Chemikalien war in der Regel p.a.. Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

3 Oligonukleotide

Die im Verlauf der Arbeit zur Konstruktion von Plasmiden (II. 5.1) und zur Herstellung von immobilisierten DNA-Matrizen (II. 5.5) eingesetzten Oligonukleotide sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

| Bezeichnung | Oligonukleotidsequenz |
|--------------------|---|
| M13 Rev oder RU | 5`- GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG -3` |
| M13 Rev-Biotin * | 5`- CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC -3` |
| M13 F oder FU | 5`- GCC AGG GTT TTC CCA GTC ACG A -3` |
| M13 F-Biotin* | 5`- ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG -3` |
| pUC19-Biotin * | 5`- CCC CTG ATT CTG ATT CTG TGG ATA ACC G -3` |
| pIC31/30-C-Biotin* | 5`- GTC TGT AAG CGG ATG CCG GGA G -3` |
| 31-47U | 5`- GCC AAG CTT TCG CGA GCT CGA GAT CTA GAT ATC GAT GAA TTC GAG CTC AG -3` |
| 31-49C | 5`- GCC AAG CTT TCG CGA GCT CGA GAT CTA GAT ATC GAT GAA TTC GAG CTG GG -3` |

* = 5`-Biotin

4 Gelelektrophoresen

4.1 Agarosegele

Die Auftrennung von Plasmiden und DNA-Fragmenten erfolgte, je nach Größe der DNA, durch horizontale Elektrophorese in 0,8 bis 2%igen Agarosegelen. Für ein 2%iges Agarosegel wurde zunächst 0,6 g Agarose in 27 ml H₂O und 3 ml 10 x TBE-Puffer (900 mM Tris, 900 mM Borsäure, 20 mM EDTA) durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlung auf circa 60 °C geschah eine Zugabe von 4 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml). Anschließend wurde die Gellösung in eine Gießvorrichtung gegossen. Für analytische Agarosegele wurde ein Kamm mit schmalen Zähnen eingesetzt (Auftragsvolumen ca. 6 bis 8 µl), für präparative Gele wurde ein Kamm mit breiten Zähnen (Auftragsvolumen ca. 30 bis 40 µl) verwendet. Die Proben wurden mit 6 x Auftragspuffer (50 % Saccharose, 4 M Harnstoff, 50 mM EDTA, 0,1 % Bromphenolblau) versetzt und zusammen mit DNA-Größenstandards (MBI Fermentas) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V in 1 x TBE-Puffer, gefolgt von einer Analyse auf einem UV-Schirm bei 366 nm.

4.2 Sequenzgelelektrophoresen

Zur Auswertung von Kaliumpermanganat- und Exonuklease III-Footprints (II 6.5 und 6.4.1) wurden die Proben zusammen mit Sequenzleitern (II 5.4) auf 6%igen Polyacrylamid-Harnstoffgelen aufgetrennt. Die Gelplatten hatten eine Länge von 30 oder 40 cm und die Abstandshalter eine Dicke von ~0,5 mm. Für ein 6%iges Sequenzgel wurden 40 ml einer 6%igen Polyacrylamid-Stammlösung (500 ml: 100 ml Rotiphorese Gel 30, 210 g Harnstoff, 250 ml 10 x TBE, auf 500 ml mit H₂O) mit 480 µl 10 % APS und 19 µl TEMED versetzt. Die Gellösung wurde zwischen die Gelplatten gegossen, wobei die Ohrenplatte zuvor mit Repell-Silane beschichtet wurde. Nach dem Gießen des Gels wurden Kämmen mit 15 bis 20 Zähnen eingesetzt. Nach der vollständigen Polymerisation des Sequenzgels wurden die zuvor für 3 min bei 95 °C denaturierten Proben auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x TBE-Puffer, während der ersten 10 min bei konstant 15 mA und im Anschluß bei konstant 25 mA. Nach der Elektrophorese wurde zunächst eine Gelplatte entfernt. Auf das Gel wurde Whatman-Filterpapier gelegt, dann wurde die zweite Gelplatte entfernt. Das Gel wurde mit Frischhaltefolie umwickelt und in eine Entwicklerkassette gelegt. Die Autoradiographie erfolgte auf einem Fuji NIF RX Röntgenfilm (20 x 40 cm) bei -70 °C. Die Dauer der

Exposition des Röntgenfilms richtete sich nach der Stärke der radioaktiven Strahlung auf dem Gel (~1 bis 72 h).

4.3 RNA-Gelelektrophoresen

Die RNA-Gelelektrophoresen dienten der Analyse von *in vitro*-Transkriptionsprodukten (II 6.1) und RNase-Schutzexperimenten (II 6.3). Es wurden 15-, 17-, 20- und 28%ige Polyacrylamid/Harnstoffgele verwendet.

| Stammlösung | 15 % | 17 % | 20 % | 28 % |
|-----------------------|--------|--------|--------|--------|
| Acrylamid | // | // | // | 250 g |
| Bisacrylamid | // | // | // | 30 g |
| Rotiphorese Gel 30 | 500 ml | 567 ml | 667 ml | // |
| Harnstoff | 420 g | 420 g | 420 g | 420 g |
| 10 x TBE | 100 ml | 100 ml | 100 ml | 100 ml |
| H ₂ O | ad 1 l | ad 1 l | ad 1 l | ad 1 l |

In den verwendeten Gelanlagen konnten 13 x 16 cm, 20 x 30 cm und 20 x 40 cm Gele laufen gelassen werden. Es wurden z. B. für ein 13 x 16 cm Gel 25 ml der entsprechenden Polyacrylamid/Harnstoffgel Stammlösung (s. Tabelle) mit 300 µl 10 % APS und 12 µl TEMED versetzt und zwischen zwei vorbereitete Glasplatten gegossen. An der Geloberkante wurden Kämmen mit 14 bis 20 Zähnen eingesetzt. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte bei RT in 1 x TBE-Puffer bei einer Stromstärke von maximal 30 mA. Im Anschluß an die Elektrophorese erfolgte die Analyse der Gele entweder mit Hilfe eines Röntgenfilms (II 4.2.1) oder einer Imaging-Platte (Fuji, Japan). Bei Verwendung von Röntgenfilmen wurde zunächst eine Glasplatte vom Gel entfernt und Whatman-Filterpapier aufgelegt. Nach der Entfernung der zweiten Glasplatte wurde das Gel in Frischhaltefolie eingewickelt und anschließend in eine Filmkassette gelegt. Auf das Gel wurde ein Röntgenfilm gelegt (Kodak X-OMAT AR, 13 x 18 cm für die 13 x 16 cm Gele und FUJI NIF RX, 22 x 45 cm für die 20 x 30 und 20 x 40 cm Gele) und dieser bei -70 °C je nach Intensität der radioaktiven Strahlung für 1 h bis mehrere Tage exponiert. Zur Quantifizierung von Ergebnissen wurde eine Imaging-Platte verwendet. Eine sogenannte „gelöschte“ (vor dem Auflegen auf das Gel für mindestens 20 min mit Auflicht behandelte) Platte wurde, je nach Stärke der Radioaktivität, für 15 min bis 3 h auf das Gel gelegt. Dieses wurde zuvor mit 2 Lagen Folie umwickelt, um sicherzustellen, daß keine Feuchtigkeit an die empfindliche Oberfläche der Imaging-Platte gelangt. Anschließend wurde die Platte auf einem Phospho-Imager

(FLA 3000 und FLA 5000, Fuji, Japan) gescannt und mit der AIDA 3.21-Image Analyzer Software der Firma Raytest (Straubenhardt) ausgewertet.

4.4 Präparative PA/Harnstoffgelelektrophoresen

Präparative Elektrophoresen erfolgten auf 20%igen Polyacrylamid/Harnstoffgelen (s. Tabelle in II 4.2.2). Die 20%igen Gele dienten der Reinigung von markierten und unmarkierten Oligonukleotiden (II 3), die für PCR-Ansätze verwendet werden sollten. Aufbau und Durchführung erfolgten analog II 4.2.2. Nach Beendigung des Gellaufs wurde bei radioaktiven Oligonukleotiden eine Platte entfernt und das Gel auf der anderen Glasplatte belassen. Das Gel wurde mit Folie umwickelt, mit fluoreszierenden Markern begrenzt und ein Röntgenfilm für maximal 1 min aufgelegt. Dann konnte die Bande aus dem Gel ausgeschnitten werden und in 1 x TE-Puffer (10 : 0,1 = 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA) über Nacht bei RT eluiert werden. Anschließend wurden die Oligonukleotide mit Ethanol gefällt (II 5.1.2), getrocknet und in 1 x TE-Puffer resuspendiert. Die aufgetrennten unmarkierten Oligonukleotide wurden mittels sogenanntem „UV-shadowing“ detektiert. Hierfür wurde das Gel von beiden Glasplatten getrennt und mit Folie umwickelt. Eine mit Silikat beschichtete Folie (Merck) wurde unter das Gel gelegt und von oben mit UV-Licht (312 nm) bestrahlt. Ein dadurch entstehender Schatten auf der Silikatschicht machte die unmarkierten Oligonukleotide sichtbar, so daß sie aus dem Gel ausgeschnitten werden konnten.

4.5 SDS-Polyacrylamidgele

Im Verlauf der Arbeit wurden 10%ige SDS-Polyacrylamidgele zur elektrophoretischen Auftrennung von UV-gecrosslinkten RNAP-Untereinheiten (II 7.1) nach Lämmli (1970) verwendet. Es wurden Gele mit einer Dicke von 1 mm und Gelmaßen von 13 x 16 cm eingesetzt. Vor dem Gießen der Gele wurden zunächst die Glasplatten unten und an den Seiten mit Abstandshaltern abgedichtet. Danach wurde zwischen die vertikal angeordneten Glasplatten die 10%ige Trenngellösung (5 ml Rotiphorese Gel 30, 3,75 ml Tris/SDS-Puffer, pH 8,8 (1,5 M Tris/HCl, 0,4 % SDS), 5,25 ml H₂O; +50 µl APS und 10 µl TEMED) bis etwa 1,5 bis 2,5 cm unter die obere Glaskante gegossen. Die Trenngellösung wurde dann mit wassergesättigtem Butanol überschichtet, um ein vollständiges Polymerisieren des Gels und eine gerade Gelkante zu erhalten. Nachdem das Trenngel vollständig polymerisiert war, wurde das Butanol mit Wasser abgespült und dieses mit

Whatman-Papier abgezogen. Auf das Trenngel wurde ein 3,75%iges Sammelgel (1 ml Rotiphorese Gel 30, 2 ml Tris/SDS-Puffer, pH 6,8 (0,5 M Tris/HCl, 0,4 % SDS / +40 μ l APS und 8 μ l TEMED) gegossen und sofort nach dem Gießen ein Kamm mit 10 Zähnen gesteckt. Das Auftragsvolumen betrug maximal 40 μ l pro Tasche. Die Proben wurden vor dem Auftrag mit 5 x Lämmli-Auftragspuffer (5 % SDS, 250 mM DTT, 250 mM Tris/HCl (pH 6,8), 50 % Glycerin, 0,5 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt und bei 95 °C für 3 min denaturiert. Bei Gelen, die im Anschluß silber-gefärbt (II 4.3.1) wurden, erfolgte zusätzlich ein Auftrag eines Proteingrößenstandards (Protein Test mixture 4 und 5, Serva; in 1fach Lämmli-Auftragspuffer). Die anschließende Elektrophorese erfolgte in 1 x SDS-Gelelektrophorese-Puffer (25 mM Tris, 38 mM Glycin, 0,1 % SDS) bei RT. Bis zum vollständigen Einlauf der Proben in das Sammelgel betrug die Stromstärke konstant 16 mA. Für die weitere Auftrennung der Proteine wurde eine konstante Stromstärke von 30 mA eingestellt. Die Auswertung erfolgte analog II 4.2.2.

4. 5. 1 Silberfärbung

Die gecrosslinkten RNAP-Untereinheiten wurden durch Silberfärbung (nach Heukeshoven & Dernick 1988, modifiziert) identifiziert. Die Inkubationen erfolgten nach Zugabe von jeweils 200 ml der angegebenen Lösungen bei RT unter leichtem Schütteln in einer Glasschale. Die Proteine wurden nach der Zugabe von Fixierlösung I (30 % Ethanol, 10 % Essigsäure) für ~1,5 h fixiert und anschließend 2 x für 10 min mit H₂O gewaschen, um das SDS zu entfernen. Danach folgte eine 1 bis 2stündige Inkubation in Fixierlösung II (30 % Ethanol, 0,4 M NaAc, 0,2 % Na₂S₂O₃, 0,5 % Glutaraldehyd pH 6,0) und drei weitere 15minütige Waschschrte mit H₂O. Nach 60 min Inkubation in Silbernitratlösung (0,1 % AgNO₃, 0,02 % Formaldehyd) und zweimaligem kurzen (~5 sec) Spülen mit H₂O wurde Entwicklerlösung (2,5 % Na₂CO₃, 0,01 % Formaldehyd) zugegeben. Je nach entstehender Bandenintensität wurde für ungefähr 2 bis 10 min entwickelt. Gestoppt wurde dieser Vorgang durch Abnahme der Entwicklerlösung und Zugabe von 50 mM EDTA.

5 Plasmide

Im Verlaufe der Arbeit wurden die Plasmide pIC 31/30PRO-C25, pIC 31/30PRO-C46 (Hausner et al., 2000), pIC 31/30PRO-C46C und pIC 31/30PRO-C46CCC eingesetzt. Durch den Austausch von C-Positionen durch andere Basen ist auf den Plasmiden eine Transkription ohne CTP-Zugabe bis Position +25 bzw. +46

möglich (sogenannte C-Minus Kassetten). Abbildung 3 zeigt schematisch die wichtigen Sequenzbereiche der unterschiedlichen DNA-Matrizen.

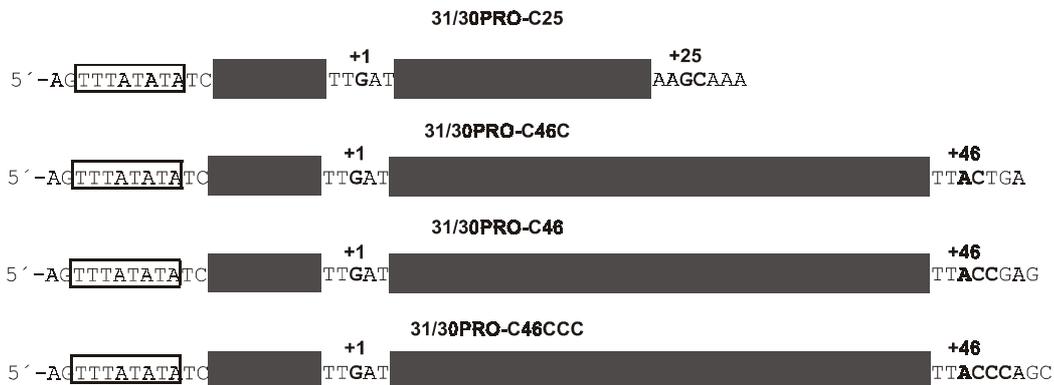


Abb. 3: Schematische Darstellung der Promotorregionen und C-Minus-Bereiche der im Verlaufe der Untersuchungen eingesetzten DNA-Matrizen. Dargestellt ist der codierende Strang mit der TATA-Box bei Position ~-25 (umrandet), dem Transkriptionsstart an Position +1 und den Positionen rund um die Stelle, an der in der Transkription das erste CTP benötigt wird.

Die Konstruktionen von pIC 31/30PRO-C25 und pIC31/30PRO-C46 sind beschrieben (Hausner et al., 2000). Die Konstruktion der Plasmide pIC 31/30PRO-C46C und pIC 31/30PRO-C46CCC wird im folgenden dargestellt.

5.1 Konstruktion der Plasmide pIC 31/30PRO-C46C und pIC 31/30PRO-C46CCC

Die Herstellung der Plasmide pIC 31/30PRO-C46C und -C46CCC erfolgte unter Verwendung von pIC 31/30PRO-C46 (Hausner et al., 2000). Sie basieren auf dem tRNA^{Val}-Promotor aus *Mc. vannielii* (Hausner et al., 1991). In pIC 31/30PRO-C46 sind die Cytosine auf dem codierenden Strang von Position +1 bis +46 durch andere Basen ersetzt worden. Die DNA-Sequenz auf dem codierenden Strang von Position +45 bis +50 ist 45-TACCGA-50. Bei pIC 31/30PRO-C46C wurde das Nukleotid an Position +48C in +48T mutiert, und bei pIC 31/30PRO-C46CCC wurde die Position +49G in +49C verändert. Die entstehenden Sequenzen sind demzufolge 45-TACTGA-50 und 45-TACCCA-50. Die verwendeten Primer (II 3, Oligonukleotide 31-47U und 31-49C) waren, bis auf die Positionen +48 bzw. +49, komplementär zu den Sequenzen von Position +95 bis +45 auf dem Ausgangsplasmid pIC 31/30PRO-C46. Sie wurden zusammen mit M13-Rev Primern und pIC 31/30PRO-C46 in PCR-Ansätze (II 5.5) gegeben. Abbildung 4 zeigt schematisch die Konstruktion der beiden Plasmide.

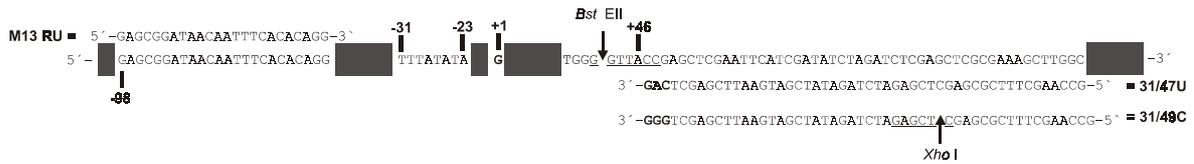


Abb. 4: Konstruktion der Plasmide pIC31/30PRO-C46C und pIC31/30PRO-C46CCC. Das linearisierte Ausgangsplasmid pIC31/30PRO-C46 von Position -98 bis +96 ist dargestellt. Die *Bst EII*-Schnittstelle an Position +42/43 ist eingezeichnet. Zur Herstellung von pIC31/30PRO-C46C erfolgte der Einsatz des Primers 31/47U, und für pIC31/30PRO-C46CCC wurde der Primer 31/49C verwendet. Als Gegenprimer diente ein M13-Oligonukleotid. Die *Xho I*-Schnittstelle an Position +78/79 und die veränderten 3'-Enden (fettgedruckt) auf den Primern sind gekennzeichnet.

Die Amplifikate wurden auf präparative Agarosegele aufgetragen (II 4.1) und anschließend eluiert (II 5.1.3). Die eluierte DNA wurde ebenso wie das verwendete Plasmid mit *Xho I* (spaltet an 5'-C↓TCGAG-3'; 3'-überhängend) und *Bst EII* (spaltet an 5'-G↓GTNACC-3'; 3'-überhängend) über Nacht bei 37 °C geschnitten. Am nächsten Tag wurden die Ansätze phenolisiert (II 5.1.1), Ethanol gefällt (II 5.1.2) und anschließend auf 0,8 und 2%igen Agarosegelen aufgetrennt und erneut mit Hilfe eines Gelelutions-Kit (DNA Extraction Kit, MBI Fermentas, Wilna, Litauen) gereinigt.

5. 1. 1 Phenolisierung

Zur Entfernung von Proteinen und zum Stop der RNase-Aktivität bei RNase-Schutzexperimenten (II 6.3) wurden die Proben phenolisiert (Sambrook et al., 1989). Ansätze mit geringem Volumen wurden auf mindestens 100 µl Volumen aufgefüllt und mit einem Volumenanteil Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) versetzt, für 30 sec gemischt (Vortex) und bei RT für 2 min zentrifugiert (Tischzentrifuge, 12500 rpm). Die wässrige (obere) Phase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit einem Volumenanteil Chloroform/Isoamylalkohol (24/1) versetzt, erneut gemischt und zentrifugiert. Nach Überführung der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß erfolgte in den meisten Fällen eine Ethanol-fällung der Nucleinsäuren (II 5.1.2).

5. 1. 2 Ethanol-fällung

Für die Untersuchung von spezifischen Transkriptionsprodukten archaeller Elongationskomplexe (II 6.1 bzw. 6.3) und phenolisierten Restriktionsverdau (II 5.1.1), erfolgte eine Ethanol-fällung.

Bei einer Standard-Fällung wurden z. B. 200 µl Probe mit 20 µl NaAc (3 M, pH 4,5-7,0 je nach Größe der Nukleinsäuren) auf eine Konzentration von 0,3 M eingestellt und mit dem 3fachen Volumen an 96%igen Ethanol (-20 °C) vermischt. Der Fällungsansatz wurde für 15 bis 20 min bei RT und bei maximaler Geschwindigkeit (Tischzentrifuge, bei 12500 rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und zur Entfernung von Salzen 500 µl 70%iger Ethanol (-20 °C) vorsichtig auf das Pellet gegeben. Im Anschluß folgte eine 6minütige Zentrifugation der Ansätze gefolgt von einer Abnahme des Überstands. Das Pellet wurde in einer Vakuumzentrifuge (Speed Vac Concentrator, Savant) getrocknet und anschließend in 1 x TE-Puffer oder 1fach Formamid-Auftragspuffer (II 6.1) resuspendiert.

5. 1. 3 Agarosegelelelution

Zur Entfernung störender Salze sowie zur Abtrennung von Primern, Restriktionsprodukten oder unspezifischen PCR-Amplifikaten wurden DNA-Fragmente und Plasmide über Agarosegelelektrophorese mit anschließender Agarosegelelelution mit einem Gelelelutionskit (DNA Extraction Kit, MBI Fermentas) gereinigt. Zunächst erfolgte eine Agarosegelelektrophorese nach II 4.1. Die auf dem UV-Schirm sichtbaren DNA-Banden wurden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein leeres, steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Elution wurde nach dem mitgelieferten Protokoll des Herstellers durchgeführt. Nach der Durchführung des Protokolls folgte eine Erfolgskontrolle der Elution. Es wurde 1 µl der gereinigten DNA zusammen mit unterschiedlichen Mengen eines DNA-Größenstandards (pBR322 DNA/Alu I Marker, 20 – bei Plasmiden und Gene Ruler 100 bp DNA Ladder – für PCR-Produkte (MBI Fermentas)) auf ein 0,8-2%iges Agarosegel aufgetragen. Nach einer 15minütigen Elektrophorese bei konstant 100 V konnte mit Hilfe des aufgetragenen Standards eine semiquantitative Konzentrationsbestimmung durchgeführt werden. Zusätzlich wurden die Konzentration (260 nm) und der Reinheitsgrad (280 nm Proteine, 320 nm andere Verunreinigungen) der eluierten DNA photometrisch gemessen (Beckmann DU-640). Die so aufbereiteten DNA-Matrizen bzw. Plasmide standen nun für die Konstruktion der Plasmide bzw. Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen DNA und Proteinen zur Verfügung.

5.2 Ligation und Transformation

Nach der Konzentrationsbestimmung der gereinigten Nukleinsäuren aus II 5.1 erfolgte der Einsatz von ~3 Teilen Insert (600 ng der 35 Bp DNA) auf ~1 Teil Vektor (150 ng 2871 Bp geschnittenes Plasmid) in ein Rapid-DNA-Ligation-Kit (MBI Fermentas). Die nach der Ligation resultierenden Plasmide sind pIC 31/30PRO-C46C und pIC 31/30PRO-C46CCC. Zur Vermehrung der Plasmid-DNA wurde eine Transformation in kompetente *E. coli*, JM 109-Zellen (Yanish-Perron et al., 1985) durchgeführt. Die Zellen wurden in LB₀-Medium (10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 5 g/l NaCl, pH 7,5) über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler angezogen. Es wurden ~100 ng Plasmid-DNA zu 80 µl kompetenten Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 45sekündigen Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad wurde erneut für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 500 µl LB₀-Medium und ein Schütteln der Ansätze für 1 h bei 37 °C. Jeweils 100 µl hiervon wurden auf vorgewärmte LB₀-Platten ausplattiert. Da auf dem Plasmid eine Ampicillin-Resistenz codiert ist, geschah die Selektion der Plasmid-haltigen Zellen durch Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin zum festen Nährboden.

5.3 Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-haltige Einzelkolonien (II 5.2) wurden in 5 ml LB₀-Flüssigmedium (+Ampicillin) überimpft und über Nacht auf einem Schüttler bei 37 °C bebrütet. Von den Übernachtskulturen wurden jeweils 900 µl Zellsuspension mit 100 µl Glycerin versetzt und für eine längerfristige Lagerung bei -70 °C eingefroren (Glycerinkulturen). Mit dem Rest erfolgte eine sogenannte Minipräparation der Plasmid-DNA mit Hilfe des E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kits von PeqLab (Erlangen). Hierbei wurden die Zellen zunächst alkalisch lysiert, chromosomale DNA ausgefällt, RNA durch RNase A Behandlung hydrolysiert und die Plasmid-DNA an Säulchen mit Silikamembranen gebunden. Abschließend wurden die Plasmide mit 1 x TE-Puffer eluiert. Die präparierte Plasmid-DNA wurde anschließend sequenziert (II 5.4). Aus *E. coli*-Zellen, die Plasmide mit einer korrekten Sequenz beinhalteten, wurde erneut Plasmid-DNA durch eine Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation (Maxipräparation) gewonnen.

5.4 DNA-Sequenzierung

Zur Verifizierung der Sequenz der hergestellten Plasmide und für die Herstellung von radioaktiv markierten Sequenzleitern bei Footprintversuchen (II 6.4.1 und 6.5) wurden Sequenzierreaktionen durchgeführt. Diese erfolgten gemäß der mitgelieferten Protokolle des Ampli Taq[®] FS Dye Terminator Sequencing Kits (Perkin Elmer) oder Cycle Reader[™] DNA-Sequencing Kits (MBI Fermentas). Die Sequenzierreaktionen geschahen mit der Methode der „Cycle-Sequenzierung“ (Innis et al., 1988; Murray, 1989), bei der durch den Einbau von Didesoxynukleotiden Kettenabbrüche erzeugt werden (Sanger et al., 1977).

Bei der Verifizierung der konstruierten Plasmide wurde es durch die Verwendung unterschiedlich Fluoreszenz-markierter Didesoxynukleotide ermöglicht, die vier Sequenzreaktionen in einem Ansatz durchzuführen. Die fluoreszenzmarkierten Produkte wurden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt, mit einem Laser angeregt und die emittierte Fluoreszenz detektiert. Die Auswertung der Sequenzierungsprodukte erfolgte mit dem ABIPRISM[™] 310 Genetic Analyser (Perkin Elmer).

Die Herstellung von radioaktiven Sequenzleitern zur Auswertung von Footprintergebnissen erfolgte mit radioaktiv markierten M13-Primern nach Protokoll des Herstellers (MBI Fermentas). Im Gegensatz zur Sequenzierung mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen in einem einzigen Ansatz geschah die radioaktive Sequenzierung verteilt auf vier Ansätze mit jeweils einem Terminationsnukleotid.

5.5 Herstellung der immobilisierten DNA-Matrizen

Die Plasmide pIC 31/30PRO-C25, pIC 31/30PRO-C46, pIC 31/30PRO-C46C und pIC 31/30PRO-C46CCC dienten als Ausgangs-Matrizen für die Amplifikation der DNA-Matrizen der im Verlauf der Arbeit durchgeführten Transkriptionsexperimente (II 6.1, 6.2 und 6.3), der Kartierung von frühen und reifen Elongationskomplexen (II 6.4.1 und 6.5) und der UV-Crosslinking Experimente (II 7.1). Alle Plasmide besitzen den tRNA^{Val}-Gen Promotor aus *Mc. vannielii* (Hausner et al., 1991). Es wurden unter Anwendung der Polymerase Kettenreaktion (PCR) (Saiki et al., 1985; Saiki et al., 1988), mit dem Einsatz von verschiedenen Primern (Tabelle in II 3), DNA-Bereiche mit 498-, 500-, 507-, und 532 Bp-Länge amplifiziert.

Die codierende Region wurde ab der Position +2 mutiert, so daß bei der Transkription des tRNA^{Val}-Gens bis zur Position +25 (pIC 31/30PRO-C25) oder Position +46, (pIC31/30PRO-C46, -C und -CCC) kein CTP benötigt wurde (Abb. 3

und II 5.1). Somit war man in der Lage, einen Elongationskomplex im Verlauf der Transkription an Position +25 (G25 Komplex, wobei G für das zuletzt inkorporierte Nukleotid steht) oder +46 (A46) zu stellen, wenn nur ATP, GTP und UTP zugegeben wurden.

Ein Beispielansatz von 50 μl Volumen für eine PCR mit *Taq*-DNA-Polymerase setzte sich wie folgt zusammen:

| | |
|--------------------------------------|---|
| 3,2 μl | Plasmid-DNA (1 ng/ μl) |
| 5,0 μl | 10 x Reaktionspuffer für <i>Taq</i> -DNA-Polymerase |
| 5,0 μl | dNTP-Mix (2 mM) |
| 2,0 μl | Rev-Primer (5 μM) |
| 2,0 μl | F-Primer (5 μM) |
| 1,5 μl | <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (1U/ μl) |
| <u>31,3 μl</u> | H ₂ O |
| 50,0 μl | |

Die Durchführung der PCR erfolgte im Gen Amp PCR System 2400 (PE Applied Biosystems). Bei einer „Standard-PCR“ wurde zunächst für 1 min 50 sec. bei 95 °C denaturiert. Es folgten 25 Zyklen bestehend, aus einem Denaturierungsschritt (5 sec 95 °C), einem Hybridisierungsschritt (30 sec 60 °C / in Abhängigkeit vom jeweiligen GC-Gehalt der verwendeten Primer) und einem Elongationsschritt (60 sec 72 °C). Nach Beendigung der Amplifikation wurden die Ansätze auf konstant 4 °C heruntergekühlt.

Bei der Amplifikation der DNA-Matrizen wurde immer ein Biotin-markierter Primer eingesetzt. Dieses diente einer späteren Kopplung an Streptavidin-Magnetpartikel (Roche) zur Herstellung sogenannter immobilisierter DNA. Durch die Kopplung der 5'-Biotin-markierten DNA-Matrizen an Streptavidin-Magnetpartikel war man in der Lage, die Transkriptionsbedingungen innerhalb eines Versuches zu variieren. So war es z. B. möglich, nach der Pausierung des Elongationskomplexes an Position +25 durch einen Pufferwechsel die Nukleotide aus dem Ansatz zu entfernen (Abb. 3 in II 6.1). Die Bindung der DNA an Streptavidin-Magnetpartikel erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

Nach der Kopplung des Biotin-5'-Endes der DNA mit den Magnetpartikeln wurde die DNA in 1 x TE-Puffer aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

6 *In vitro*-Transkriptionen

Die *in vitro*-Transkriptionsversuche wurden im zellfreien Transkriptionssystem für *Mc. thermolithotrophicus* (Gohl et al., 1992) mit rekombinanten

Transkriptionsfaktoren und aufgereinigter DNA-abhängiger RNAP aus *Mc. thermolithotrophicus* oder *Mc. jannaschii* (II 2.1) durchgeführt.

6.1 Immobilisierte *in vitro*-Transkriptionen

Für die Untersuchungen der archaeellen Elongation war es notwendig, die Transkriptionsbedingungen zu variieren. Hierfür wurde die Methode der immobilisierten Transkription etabliert. Abbildung 5 veranschaulicht das Prinzip und die Durchführung der immobilisierten Transkription.

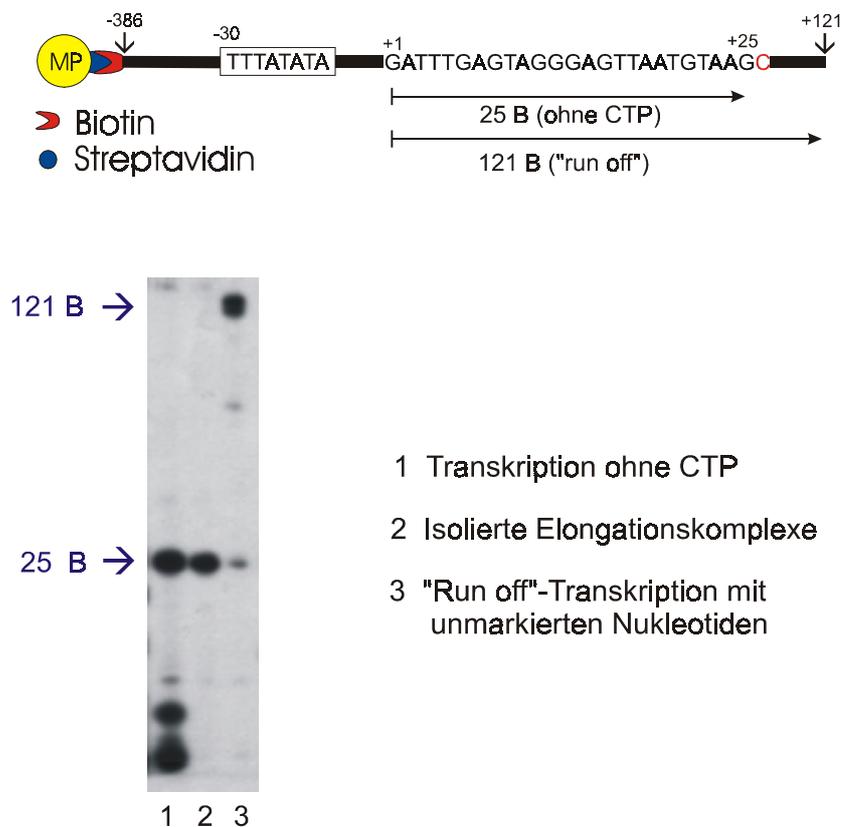


Abb. 5: Immobilisierte Transkription. *Oben*, schematische Darstellung der eingesetzten DNA-Matrize. Die TATA-Box und die Sequenz von Position +1 bis +26 sind gekennzeichnet. MP = Magnet-Partikel; Ohne den Einsatz von CTP kommt die Transkription an Position +25 zum Stillstand. Mit zusätzlichem CTP entsteht ein „run-off“-Transkript von 121 B. *Unten*, in *in vitro*-Transkriptionsansätzen ohne CTP transkribiert die RNAP auf der eingesetzten DNA bis Position +25 (Spur 1). Zusätzlich entstehen sehr viele kurze, abortive RNA-Produkte. Bei der Isolierung von Elongationskomplexen werden die DNA-Matrizen unter Verwendung eines Magnet-Partikel-Separators pelletiert, und somit die Elongationskomplexe von abortiven Transkripten, nicht gebundener RNAP, Transkriptionsfaktoren und Nukleotiden entfernt (Spur 2). Nach dem „Waschen“ verbleiben nur die ternären Komplexe und immobilisierten DNA-Matrizen im Ansatz. Werden alle vier Nukleotide zugegeben, entsteht ein, in diesem Falle 121 B, „run-off“-Transkript (Spur 3).

In einem „Standard“ immobilisierten *in vitro*-Transkriptionsansatz bestanden 25 μ l Transkriptionsansatz aus 190 fmol immobilisierter DNA, 0,8 pmol RNAP, 17 pmol TBP und 17 pmol TFB in 1fach Transkriptionspuffer (20 mM Tris (pH 8,5, eingestellt bei RT), 40 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA und 3 mM DTT).

Die Ausbildung von Initiationskomplexen geschah während einer 30 bis 45minütigen Inkubation bei 37 °C oder Raumtemperatur. Anschließend erfolgte, je nach Experiment, die Zugabe eines Nukleotidmixes (ohne CTP) mit oder ohne radioaktives Substrat und eine weitere Inkubation von 1 bis 10 min bei 55 oder 65 °C. Hiernach wurden die pausierten Elongationskomplexe in den meisten Experimenten isoliert. Die Isolierung diente der Entfernung von ungebundener RNAP, Initiationsfaktoren, abortiven Transkriptionsprodukten und Nukleotiden, um anschließend veränderte Transkriptionsbedingungen einzustellen. Die Isolierung erfolgte durch mehrfaches Pellettieren der Ansätze mittels eines Magnetpartikel-Separators (MPS), gefolgt von einer Resuspendierung in sogenanntem Waschpuffer. Der Waschpuffer bestand aus 1fach Transkriptionspuffer und zusätzlichem N-lauroylsarkosin (Nls von 0,1 bis 0,5 %). Die isolierten Komplexe wurden abschließend in 1,25fachem Transkriptionspuffer ohne Magnesium gelöst. Die Variationen im Verlauf der verschiedenen Untersuchungen sind in den Legenden und Überschriften der einzelnen Abbildungen dargestellt. Die Transkriptionen wurden durch Zugabe entsprechender Mengen an 3fach Formamid-Auftragspuffer (98 % Formamid (deionisiert), 0,1 % Bromphenolblau, 0,1 % Xylencyanol und 10 mM EDTA) gestoppt. Teilweise erfolgte der Stop der Reaktionen durch Phenolisierung (II 5.1.1) und Ethanol-fällung (II 5.1.2). Die gefällten Produkte wurden in 1fach Formamid-Auftragspuffer resuspendiert.

6.2 Herstellung von RNA-Dinukleotid-Standards

Zur Identifizierung von TFS-induzierten Hydrolyseprodukten erfolgte die Herstellung von Dinukleotidstandards.

pApU/pUpA-Standard wurde durch Verwendung von 0,25 mg/ml poly-[dAT] (Sigma), anstelle von immobilisierter DNA-Matrize, 400 ng RNAP, 200 ng TFS und einem Nukleotidset bestehend aus ATP und UTP in 1fach Transkriptionspuffer generiert. Abhängig von den Nukleotidkonzentrationen resultierten, durch TFS-induzierte Hydrolyse-Resynthese (III 3), unterschiedliche Dinukleotide. Zur Erzeugung von pUpA wurden 50 µM UTP und 500 µM ATP eingesetzt, gefolgt von einer 15minütigen unspezifischen Transkription bei 55 °C. Durch den Einsatz von 500 µM UTP und 100 µM ATP wurden pApU-Dinukleotide erzeugt. Gemischte pUpA/pApU-Standards wurden mit 250 µM ATP und 100 µM UTP generiert. Es wurde entweder radioaktives UTP oder ATP zur Markierung zugegeben. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 3fach Formamid-Auftragspuffer gestoppt.

Radioaktive pApC-, pApG- und pUpG-Standards wurden durch Markierung nicht radioaktiver Ausgangsdinukleotide (Sigma) erzeugt. Es wurden jeweils 5 mM

Dinukleotide zusammen mit 5 bis 10 μCi $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ und 10 U T4 Polynukleotid-Kinase (PNK) in vom Hersteller mitgeliefertem Puffer für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die PNK überträgt in einer sogenannten „forward“-Reaktion eine terminale Phosphatgruppe des eingesetzten $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ auf die terminale 5'-OH-Gruppe der verwendeten Dinukleotide (Harrison & Zimmerman, 1986). Die Inaktivierung der PNK geschah durch eine 3minütige Inkubation bei 95 °C und die Zugabe von 3fach Formamid-Auftragspuffer. Vor dem Auftrag auf ein 28%iges RNA-Gel (II 4.2.2) erfolgte eine Verdünnung der Proben in 1fach Transkriptionspuffer.

6.3 RNase-Schutzexperimente

Zur Darstellung von Besonderheiten früher und reifer Elongation und zur Untersuchung von arretierten Elongationskomplexen wurden RNase-Schutzexperimente durchgeführt. Es wurden RNase A und RNase T1 verwendet. Diese Enzyme hydrolysieren die RNA Sequenz-spezifisch. RNase A spaltet an U- und C-Positionen (Richards & Wyckoff, 1971). Die Hydrolyse erfolgt zwischen dem 3'-Phosphat eines Pyrimidins und der 5'-Hydroxyl-Gruppe des folgenden Nukleotids ($\text{C/UpN} \rightarrow \text{C/Up} + \text{N}$). RNase T1 spaltet spezifisch an G-Stellen (Uchida & Egami, 1971). Hier geschieht der Schnitt zwischen dem 3'-Phosphatatom des GMP und der 5'-OH-Gruppe des nachfolgenden NMP ($\text{GpN} \rightarrow \text{Gp} + \text{N}$). Die Positionierung der Elongationskomplexe wurde analog zu II 6.1 durchgeführt. Isolierte Elongationskomplexe wurden in 1fach Transkriptionspuffer resuspendiert und anschließend für 30 sec bis 6 min mit 50 U Rnase T1 bzw. 0,5 bis 16 $\mu\text{g/ml}$ RNase A bei 37 °C inkubiert. Die sofortige Inaktivierung der RNasen erfolgte durch mehrfaches Phenolisieren (II 5.1.1). Nach einer anschließenden Ethanol-Fällung (II 5.1.2) wurden die getrockneten Proben in 1fach Auftragspuffer resuspendiert, für 3 min 15 sec bei 85 °C denaturiert und dann auf ein 15 bis 20%iges RNA Gel (II 4.2.2) aufgetragen. Zur Auswertung der Versuche wurde eine Cordycepin-RNA-Sequenzleiter generiert. Hierfür wurde zusätzlich zum verwendeten Nukleotidmix Cordycepin im 4fachen Überschuß zum ATP gegeben. Cordycepin oder 3'-desoxy-ATP ist ein ATP-Nukleotid-Analog. Nach dem Einbau von Cordycepin in die RNA-Kette wird die RNA-Synthese blockiert, und eine 3'-desoxy-ATP-RNA-Sequenzleiter entsteht. Teilweise erfolgte ein zusätzlicher Einsatz von GpA-Dinukleotid, um ein verändertes Laufverhalten der hydrolysierten RNA durch die fehlenden 5'-Phosphate (s. oben) auszugleichen.

6.4 Exonuklease III-Footprinting

Die Exonuklease III (Exo III) (Rogers & Weiss, 1980) ist das Produkt des *xthA*-Gens aus *E. coli*. Es ist ein multifunktionelles, prozessives Enzym, welches Phosphodiesterbrücken in dsDNA spaltet. Bei der Spaltung der Phosphodiesterbindung bleibt am 3'-Ende der dsDNA eine Hydroxygruppe zurück, das Phosphoratom der Bindung wird mit abgespalten. Die Hauptaktivität der Exo III ist eine 3'→5'-Doppelstrang spezifische Exonukleaseaktivität. Durch die Exonukleaseaktivität wird sowohl dsDNA mit glatten Enden als auch dsDNA mit 5'-überhängenden Enden hydrolysiert. Es erfolgt jedoch keine Hydrolyse von dsDNA mit 3'-überhängenden Enden.

Zur Bestimmung von Bereichen auf der DNA, die durch einen im Verlauf der Transkription zum Stillstand gekommenen Transkriptionskomplex (II 6.1) vor einer Hydrolyse geschützt sind, kann die 3'→5'-Exonukleaseaktivität des Enzyms genutzt werden (Shalloway et al., 1980).

6.4.1 Exo III-Footprinting unterschiedlicher *Methanococcus* Elongationskomplexe

Die Exo III-Footprintexperimente wurden ebenso wie die RNase-Footprints (II 6.3) auf immobilisierten DNA-Matrizen durchgeführt. Zunächst erfolgte die Markierung der verwendeten Matrizen mit [γ -³²P]-ATP durch die T4 Polynukleotid-Kinase (=PNK; MBI Fermentas). Normalerweise würden beide 5'-Enden einer dsDNA markiert werden. Es stellte sich jedoch im Verlauf der Markierungen heraus, daß weder die mit Biotin modifizierten 5'-Enden, noch die mit Streptavidin Magnetpartikeln gekoppelten 5'-Enden der DNA markiert wurden. Ein Standard-Markierungsansatz bestand aus 30 µl immobilisierter Matrize (entsprechend 1900 fmol), 10 U PNK und 20-30 µCi radioaktives Isotop in vom Hersteller mitgeliefertem Markierungspuffer. Die Markierung wurde im Gene Amp PCR System 2400 (PE Applied Biosystems) durchgeführt. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend auf konstant 4 °C heruntergekühlt. Ein Denaturierungsschritt erfolgte nicht, da die Streptavidin-Magnetpartikel bei 95 °C abgespalten werden. Die Entfernung von nicht übertragenen [γ -³²P]-ATP-Phosphoratomen und der PNK geschah durch Pellettieren des Markierungsansatzes mit einem Magnet Partikel Separator (MPS, Roche). Der Überstand wurde entfernt, die markierte DNA wurde mit H₂O gewaschen und in 30 µl 1 x TE-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte der Einsatz in die *in vitro*-Transkription. Ein Standard-Ansatz bestand aus den in II 6.1 geschilderten Komponenten. Die Ausbildung von Präinitiationskomplexen geschah während einer 30minütigen

Inkubation bei 37 °C. Zur Erzeugung der Elongationskomplexe wurden unmarkierte Nukleotide (ATP und GTP 20 µM, UTP 2 µM) zugegeben und dann für 10 min bei 55 °C inkubiert. In Kontrollansätze wurde zusätzlich radioaktives UTP gegeben. Die Isolierung der Komplexe wurde durchgeführt wie in II 6.1 beschrieben.

Nach der Isolierung wurden die Ansätze aufgeteilt und teilweise mit 20 µM NTP (Kontrollen), ohne Nukleotide (A46 Komplexe) oder ohne Nukleotide aber mit 200 ng TFS (zurückgelaufene Elongationskomplexe) für 5 min bei 55 °C inkubiert. In allen Fällen folgte ein 15minütiger Restriktionsverdau bei 55 °C mit 10 U *Bst* EII pro 25 µl Transkriptionsansatz, um nicht komplexierte DNA-Hintergrundsignale zu minimieren. *Bst* EII schneidet die DNA auf dem codierenden Strang an Position +42/43, welche durch A46 bzw. TFS-hydrolysierte RNAP vor Verdau geschützt ist. Eine erneute Isolierung führte zur Entfernung markierter, nicht komplexierter DNA-Abschnitte. Die Zugabe von 25 U Exo III pro 25 µl Ansatz, gefolgt von einer maximal 15minütigen DNA-Hydrolyse bei 37 °C, ergab durch die RNAP geschützte Regionen. Gestoppt wurde die Exo III-Reaktion durch die Zugabe von 3fach Formamid-Auftragspuffer. Zur Identifizierung der DNA-Bereiche erfolgte der Auftrag der Proben immer zusammen mit DNA-Sequenzleitern (II 5.4), die mit den gleichen M13-Primern erzeugt wurden wie die eingesetzte immobilisierte DNA. Eine schematische Darstellung der Durchführung von Exo III-Footprints auf immobilisierten Matrizen ist im Ergebnisteil in Abbildung 14 dargestellt.

6.5 Kaliumpermanganat-Footprints reifer Elongationskomplexe auf linearisierter Plasmid-DNA

Für die Darstellung der Transkriptionsblase eines reifen *Mc. thermolithotrophicus* Elongationskomplexes wurden Kaliumpermanganat-Footprints durchgeführt (Jiang & Gralla, 1995). Aufgrund der Vergleichbarkeit mit Footprint-Daten von frühen *Methanococcus*-Elongationskomplexen, bei denen mit *Alw* NI linearisiertes pIC31/30PRO-C25 Plasmid verwendet wurde, bestand die DNA-Matrize für diese Versuche aus *Alw* NI-linearisiertem pIC31/30PRO-C46 Plasmid. *Alw* NI schneidet die DNA im Plasmid 3'-überhängend (5'-CAGNNN↓CTG-3'), so daß bei einer „run off“-Transkription ein über 2000 Basen langes Produkt entstehen würde. *In vitro*-Transkriptionsansätze bestanden, bis auf die eingesetzte DNA-Matrize, (300 ng auf 25 µl) aus den in II 6.1 beschriebenen Komponenten. Die Herstellung der ternären Komplexe erfolgte durch Zugabe von 20 µM ATP, GTP und 2 µM UTP und einer 10minütigen Transkription bei 55 °C. In Transkriptions-Kontrollansätzen wurde zusätzlich radioaktives UTP zugegeben. Im Anschluß an die Ausbildung reifer Elongationskomplexe wurden 6 mM frisch angesetztes Kaliumpermanganat

zugegeben und für 5 min bei 45 °C inkubiert. Das Kaliumpermanganat ist ein Oxidationsmittel, welches spezifisch T-Positionen in einzelsträngigen DNA-Abschnitten modifiziert. In Footprint-Kontrollansätzen erfolgte die Modifikation mit Ansätzen ohne RNAP-Zugabe. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1,5 µl Reduktionsmittel β-Mercaptoethanol und 20 µl Stopplösung (12,5 µl H₂O, 5 µl EDTA 0,5 M, 2,5 µl SDS 10 %) pro 25 µl Ansatz gestoppt. Anschließend wurden die Ansätze phenolisiert (II 5.1.1) und Ethanol-gefällt (II 5.1.2). Die getrockneten Proben wurden in 10 µl 1 x TE-Puffer resuspendiert und 4 µl hiervon in asymmetrische PCR-Ansätze pipettiert. Zusätzlich zu der jeweiligen DNA enthielten die Ansätze 2 µM eines radioaktiv-markierten M13-Primers, 40 µM dNTP und 1 U ReaderTM *Taq*-DNA Polymerase (MBI Fermentas) in vom Hersteller gelieferten Sequenzierpuffer (MBI-Fermentas). Das Programm für die asymmetrische PCR wurde gemäß des mitgelieferten Protokolls des Cycle ReaderTM Sequencing Kits durchgeführt. Die Proben wurden nach Beendigung des Programms mit 3fach Formamid-Auftragspuffer versetzt, für 3 min bei 95 °C denaturiert und zusammen mit Sequenzleitern auf 6%ige Sequenzgele aufgetragen (II 4.2.1).

7 UV-Crosslinking

Für die Untersuchung der im aktiven Zentrum der RNAP von *Mc. jannaschii* bestehenden Wechselwirkungen zwischen RNAP-Untereinheiten und RNA wurde die Methode des UV-Crosslinkings benutzt. Das Grundprinzip des UV-Crosslinkings besteht aus der Anregung einer chemisch inerten Substitution eines Nukleotidanalogs mit UV-Licht. Durch die UV-Bestrahlung wird eine zuvor inerte Gruppe in eine hoch reaktive Form überführt, die in der Lage ist, mit einer Aminosäure in direkter Umgebung eine kovalente Bindung zu knüpfen.

Für die Versuche mit *Mc. jannaschii*-Elongationskomplexen erwies sich der Einsatz von 8-Azido GTP (8N₃GTP) als optimal. Es hat eine photoaktive Azido-(N₃-) Gruppen-Substitution im Basen-Ring des Nukleotids. Wird diese chemisch inerte Azido-Form mit UV-Licht bestrahlt, so wird daraus die reaktive Nitren-Form (N*) gebildet, die unspezifisch mit jeder Aminosäure in direkter Umgebung eine kovalente Bindung knüpft. Das Absorptionsmaximum (λ_{\max}) von 8-Azido GTP liegt bei 278 nm. Da die Substitution direkt im Basen-Ring des Nukleotids liegt, handelt es sich um eine sogenannte 0 Å-Probe (0 Å entsprechen 0,3 – 0,4 nm). Abbildung 6 zeigt das verwendete Nukleotid-Analog in seiner inaktiven und aktivierten Form.

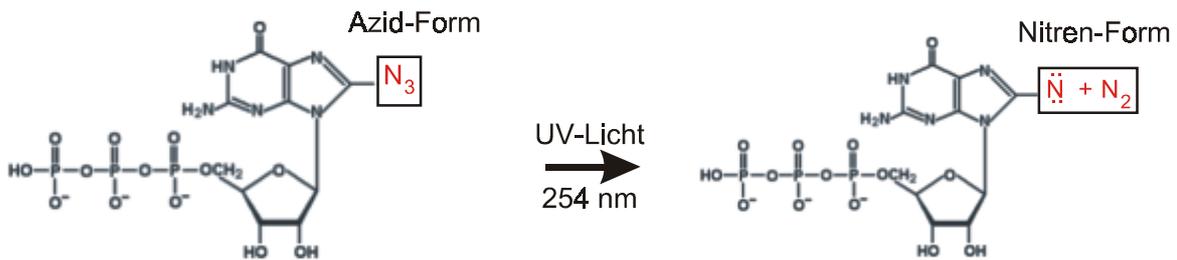


Abb. 6: Strukturformel von 8-Azido GTP, inaktive und aktive Form. 8-Azido GTP ist im inaktiven Zustand in der Azid-Form (N_3^-). Bei der Bestrahlung mit UV-Licht resultiert ein reaktiver Zustand, die Nitren-Form. Diese reagiert mit Aminosäuren in direkter Umgebung (0 \AA) und knüpft eine kovalente Bindung.

7.1 UV-Crosslinking mit Azido-GTP und reifen Elongationskomplexen

Um zu untersuchen, mit welcher *Mc. jannaschii* RNAP-Untereinheit Azido-GTP im katalytischen Zentrum interagiert, wurden zunächst unmarkierte A46-Komplexe analog zu II 6.1 auf immobilisierten DNA-Matrizen erzeugt. Diese wurden isoliert und in 1fach Transkriptionspuffer resuspendiert. Komplementiert wurden diese Ansätze mit radioaktivem $0,8 \mu\text{M}$ $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ (370 Bq/pmol) und $40 \mu\text{M}$ 8-Azido GTP. Vor der Zugabe von 8-Azido GTP wurde der Raum verdunkelt und nur noch bei schwacher Beleuchtung weitergearbeitet. Nach einer 45 sec Inkubation bei $55 \text{ }^\circ\text{C}$ erfolgte eine erneute Isolierung der nun an AzG49 (AzG für 8-Azido GMP) stehenden Komplexe. Nach 1minütiger direkter Bestrahlung mit UV-Licht von 254 nm Wellenlänge mit einer Handlampe (VL-6.MC/12 Watt; Vilber Lourmat, Frankreich), wurden 100 mM DTT zugegeben und für 5 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Damit wurden noch reaktive Nitren-Gruppen des Azido GTP reduziert und inaktiviert. Kontrollansätze bestanden zum einen aus Komplexen, die zuvor eine 3minütige „run-off“-Transkription durchgeführt haben, zum anderen aus AzG49-Komplexen, die nicht mit UV-Licht bestrahlt wurden. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 mM Ca_2Cl sowie 50 U *Micrococcus*-Nuklease und eine 20minütige Inkubation bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Dieser Arbeitsschritt diente der Entfernung von DNA- und RNA-Resten, die an die RNAP-Untereinheiten gebunden bleiben und dadurch das Laufverhalten im Protein-Gel stark verändern würden. Die *Micrococcus*-Nuklease hydrolysiert relativ unspezifisch einzel- und doppelsträngige DNA und RNA zu Oligo- und Mononukleotiden mit 3'-Phosphatresten (Laskowski M. Sr., 1967). Gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 x Lämmli-Auftragspuffer und einer 3minütigen Denaturierung bei $95 \text{ }^\circ\text{C}$. Im Anschluß erfolgte der Auftrag der Proben, teilweise zusammen mit einem Protein-Standard (Serva), auf ein 10%iges SDS-Gel (II 4.3).

III Ergebnisse

1 Charakterisierung des archaeellen Elongationsfaktors TFS

Ein ~12,5 kDa großes Protein aus *Mc. thermolithotrophicus* besitzt sowohl Sequenz-Homologie zum C-Terminus des eukaryotischen Elongationsfaktors TFIIS als auch zu kleinen RNAP I, II und III-Untereinheiten (A12.6/B12.2/C11). Anhand von Western-Blots konnten wir zeigen, daß dieses Protein keine Untereinheit der RNAP ist (Lange, 1999). Aufgrund biochemischer Analysen konnten wir dieses Protein als archaeellen Elongationsfaktor identifizieren und charakterisieren (Hausner et al., 2000). Dieser archaeelle Elongationsfaktor mit TFIIS-ähnlichen Eigenschaften ist der Transkriptionsfaktor S, TFS.

1.1 TFS verstärkt die Nukleaseaktivität in isolierten Elongationskomplexen

Die Aktivität des eukaryellen Homologs TFIIS besteht in der Stimulierung einer intrinsischen Nuklease-Aktivität der RNAP II (Izban & Luse 1992; Reines, 1992). Bei Transkriptions-kompetenten Elongationskomplexen kommt es dadurch zur Freisetzung von Mono- und Dinukleotiden vom 3'-Ende der synthetisierten RNA-Kette. Diese Hydrolyse-Aktivierung hilft der RNAP II, mit verschiedenen Problemen bei der Fortsetzung der Transkription zurecht zu kommen (zusammengefaßt in Wind & Reines 2000; Fish & Kane, 2002).

Zur Untersuchung der Funktion des archaeellen homologen Proteins und zum Nachweis, ob die intrinsische Nuklease-Aktivität in der *Methanococcus*-RNAP verstärkt wird, wurden ternäre Komplexe in der frühen Elongation auf Position G25 (G steht für das zuletzt eingebaute Ribonukleotid) pausiert. Dieses erfolgte durch Verwendung einer immobilisierten DNA-Matrize, auf der vom Transkriptionsstartpunkt an Position +1 bis zur Position +25 kein CTP benötigt wird (II 6.1 und Sequenz in Abbildung 7, oben). Um den Nachweis der Verstärkung der Nukleaseaktivität der RNAP durch das Protein nicht durch Resyntheseereignisse nach RNA-Hydrolyse zu maskieren, wurden die Initiationsfaktoren, nicht gebundene RNAP und Nukleotide entfernt (Abb. 7, Spur 7). Im Anschluß folgte eine Inkubation der isolierten Elongationskomplexe in An- und Abwesenheit von TFS.

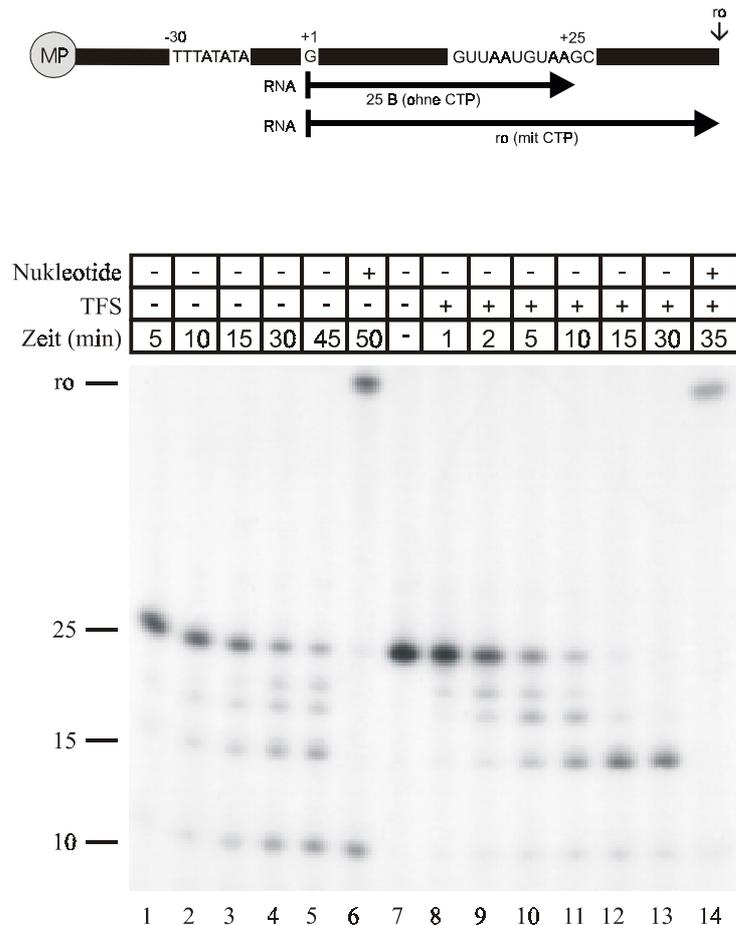


Abb. 7: TFS verstärkt die intrinsische Nuklease-Aktivität in G25-Komplexen. *Oben*, schematische Darstellung der eingesetzten immobilisierten DNA-Matrize. Die Sequenz von Position +1 bis +25 ist so verändert worden, daß bis Position +25 kein CTP benötigt wird. Die Sequenz der TATA-Box, der Position des Transkriptionsstarts an +1 und die Positionen +15 bis +26 sind gezeigt; MP = Magnet-Partikel, ro = „run-off“. *Unten*, Spur 7 zeigt den isolierten G25-Komplex, der nach 45minütiger Initiationskomplexbildung bei Raumtemperatur und anschließender 15minütiger Transkription mit 20 μ M ATP und GTP und 2 μ M [α - 32 P]UTP (370 Bq/pmol) entsteht. Nach Entfernung freier RNAP, Faktoren und Nukleotiden (s. II 6.1) und Zugabe von 200 ng TFS oder entsprechendem Ausgleichspuffer zeigen die Spuren 8 bis 13 bzw. 1 bis 5 die mit der Zeit resultierenden zurückgelaufenen Komplexe und ein 10 B RNA-Signal. Anschließend wurde eine 5minütige Verlängerungsreaktion mit 40 μ M ATP, GTP, UTP und CTP durchgeführt (Spuren 6 und 14). Die Analyse erfolgte auf einem 17%igen PA/Harnstoffgel.

Mit diesem Versuch lassen sich zwei Aussagen treffen. Erstens, TFS verstärkt die Nuklease-Aktivität der pausierten RNAP. Vergleicht man z. B. die Resultate nach 15minütiger Hydrolyseinduktion miteinander (Spuren 3 und 12), ist festzustellen, daß ohne TFS ein Teil der G25-Komplexe RNA hydrolysierte und zurücklief, mit TFS jedoch alle Ausgangskomplexe 10 B hydrolysiert hatten und bis auf Position +15 zurückgelaufen waren. Dabei entstanden die G15-Komplexe schrittweise über Intermediärzustände, wie an den resultierenden Signalen zwischen +25 und +15 zu erkennen war. Zweitens, es entsteht bei der TFS-unabhängigen RNA-Hydrolyse eine zusätzliche Bande mit einer Größe von zehn Nukleotiden, welche mit zunehmender Inkubationsdauer akkumulierte (Spuren 1 bis 5). Offensichtlich war

die Bildung der 10 B RNA in Anwesenheit von TFS minimiert (Spuren 8 bis 13). Eine anschließende Inkubation mit allen vier Nukleotiden („run off“-Transkription oder „Chase“) zeigte, daß bis auf das 10 B Signal nahezu alle Elongationskomplexe mit verkürzter RNA in der Lage waren, ein 121 B „run off“-Transkript zu erzeugen (Spuren 6 und 14). Einzig ein sehr geringer Anteil an G25-Komplexen verblieb ohne TFS noch an Position +25 (Spur 6). Ob es sich bei der 10 B RNA um freigesetzte RNA oder um RNA innerhalb eines ternären Transkriptions-inkompetenten Komplexes handelte, wird in Abschnitt III 1.2.1 analysiert.

1.2 TFS-induzierte Hydrolyse-Produkte sind Dinukleotide

Der Mechanismus der TFS-induzierten RNA-Hydrolyse wurde genauer untersucht, indem die entstehenden Produkte auf einem hochauflösenden 28%igen PA/Harnstoffgel analysiert wurden. Hierbei lassen sich grundlegende Unterschiede bei der Hydrolyse mit und ohne TFS feststellen. Als ersten und entscheidenden Punkt zeigt Abbildung 8, daß im Verlauf TFS-induzierter RNA-Hydrolyse Dinukleotide entstanden (Spuren 10 bis 15). Dieses verdeutlichte der Einsatz der Dinukleotidstandards pUpG und pApC (Spur Std). Im Gegensatz zur Hydrolyse mit TFS entstanden ohne das Protein keine Spaltprodukte im Dinukleotidbereich (Spuren 1 bis 7). Es handelt sich also um zwei unterschiedliche Mechanismen von Nukleasereaktionen.

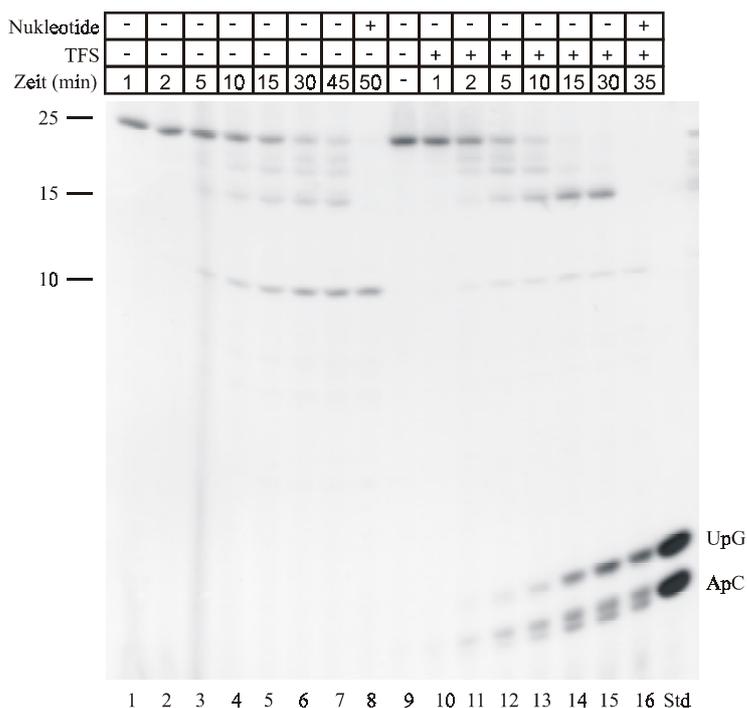


Abb. 8: Darstellung der im Verlaufe der RNA-Hydrolyse mit und ohne TFS entstehenden Produkte. Die Durchführung des Versuchs erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie in Abb. 7, wobei die Analyse auf einem 28%igen PA/Harnstoffgel geschah. Spur 9 zeigt den isolierten, Nukleotid-freien G25-Komplex. Die Spuren 1 bis 7 und 10 bis 15 zeigen die ohne und mit TFS resultierenden G15- und Übergangskomplexe mit den entsprechenden Spaltprodukten. Nach NTP-Zugabe und 5 min Inkubation bei 55 °C waren die verlängerbaren RNA-Signale nicht mehr zu erkennen (Spuren 8 und 16). In der rechten Spur wurden die Dinukleotidstandards pUpG und pApC aufgetragen (Std).

Verfolgt man den Verlauf der Dinukleotidzunahme in den Spuren 11 bis 15, ist zu erkennen, daß die schneller laufenden Dinukleotide zuerst entstanden. Im Folgenden wurde daher eine detaillierte Analyse der Dinukleotide durchgeführt.

1. 2. 1 Verifizierung der durch TFS induzierten Hydrolyseprodukte und Analyse der 10 B RNA

Eine zweite Isolierung zeigte, ob es sich bei der 10 B langen, nicht verlängerbaren RNA tatsächlich um freigesetzte Produkte handelte oder um zurückgelaufene, TFS-unabhängig entstandene, arretierte Komplexe (Abb. 9 A). Nach 45minütiger Inkubation bei 55 °C war eine gemischte Population an Elongationskomplexen von G25 bis G15 zu erkennen (Spur 1, s. auch Abb. 7, Spur 5). Bei der Trennung von freigesetzter RNA (Spur 2, Überstand) und immobilisierter DNA mit ternären Komplexen (Spur 3, Pellet) war zu erkennen, daß nur die 10 B RNA im Überstand zu detektieren war, d. h. nur sie wurde freigesetzt. Alle Signale von +25 bis +15 zeigten, wie aus den vorherigen Versuchen zu erwarten war, frühe Elongationskomplexe. Zur Klärung der Frage, ob die 10 B RNA vom 3'- oder 5'-Ende freigesetzt wurde, erfolgte eine Hydrolyse mit RNase T1 (Spur 4). Die RNase T1 spaltet spezifisch hinter G-Stellen ((GpN → Gp + N), Abb. 9 A, oben). Das resultierende 6 B große Hydrolyseprodukt lief schneller als die 10 B RNA, behielt dabei aber die gesamte Signalstärke. Die RNA wurde also vom 3'-Ende im aktiven Zentrum der RNAP freigesetzt. Hierbei entstanden eine 4 B lange, nicht markierte und eine 6 B große, markierte RNA (UAAG und U*UAA*UG; * = radioaktives Phosphat). Bei einer Freisetzung der RNA vom 5'-Ende wäre ein markiertes 5 B und ein markiertes 2 B RNA-Signal entstanden (s. auch Sequenz in II 6.1, Abb. 5).

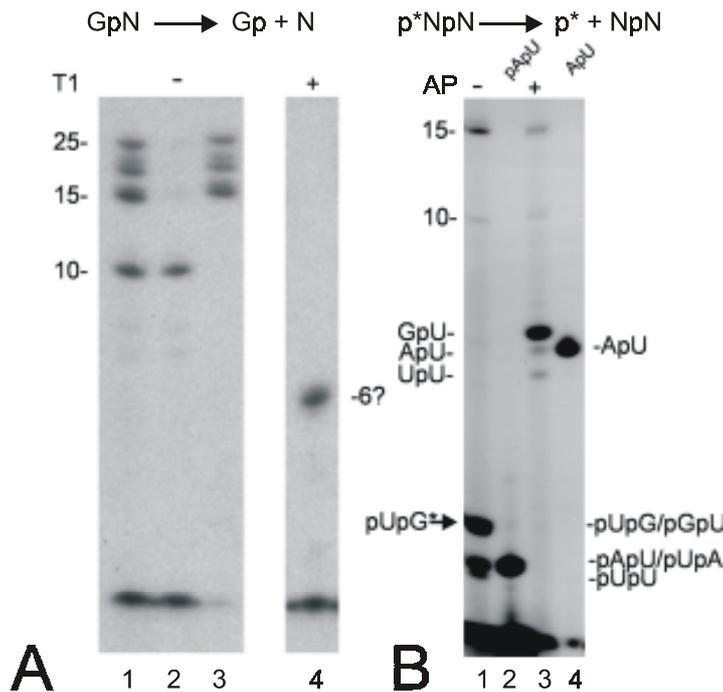


Abb. 9: Verifizierung der Hydrolyseprodukte. A, isolierte Elongationskomplexe wurden ohne Nukleotide und ohne TFS für 45 min bei 55 °C inkubiert (Spur 1). Anschließend erfolgte eine erneute Trennung von Überstand und Elongationskomplexen (Spuren 2 und 3). Die freie RNA im Überstand wurde dann für 15 min bei 37 °C mit 10 U RNase T1 hydrolysiert (Spur 4). B, die nach 15 min TFS-induzierter Hydrolyse entstandenen Dinukleotide (Spur 1) wurden ebenso wie ein pApU-Standard (Spur 2) für 15 min bei 37 °C mit 10 U alkalischer Phosphatase (AP) inkubiert (Spuren 3 und 4). Es wurde ein 28%iges PA/Harnstoffgel eingesetzt.

Weiterhin wurde geklärt, welche TFS-abhängigen Hydrolyse-Produkte im Verlauf der RNA-Spaltung entstanden (Abb. 9 B). Aufgrund der bereits bekannten Untersuchungen zur TFIIS-vermittelten Hydrolyseinduktion (Izban & Luse, 1992, 1993a, b) ist davon auszugehen, daß die Hydrolyse vom 3'-Ende der RNA im katalytischen Zentrum der RNAP erfolgt.

Bei der Hydrolyse der U-markierten 25 B RNA vom 3'-Ende können folgende radioaktive Dinukleotide entstehen: pUpA/pApU, pUpG/pGpU und pUpU (siehe Sequenz in Abb. 7). Tatsächlich zeigt Spur 1, daß mindestens drei Dinukleotide (pUpA/pApU und pGpU/pUpG sind hierbei nur schwer zu unterscheiden) als Produkte entstanden. Der anschließende Einsatz von alkalischer Phosphatase (Spur 3; alkalische Phosphatase (AP) entfernt 5'-Phosphate) veranschaulichte, daß es sich tatsächlich um diese Dinukleotide handeln mußte (vergleiche mit AP behandeltem pApU-Standard in Spur 4). Das Laufverhalten der Dinukleotide im Gel ist, beginnend mit dem langsamsten, pUpG/pGpU > pApU/pUpA > pUpU (Izban & Luse, 1993 und Bobkova et al., 1997). Die starke Signal-Abnahme des pUpA/pApU läßt vermuten, daß mehr pUpA-Dinukleotide entstanden sein müssen. Auch bei dem pGpU/pUpG-Signal war eine Abnahme zu erkennen. Wenn die Hydrolyse von +25 bis +15 jedoch nur im Dinukleotidmodus erfolgen würde, dürften lediglich pUpA, pUpG und pUpU entstanden sein. Da dieses offensichtlich nicht der Fall war, ist anzunehmen, daß neben Dinukleotiden eventuell auch Mononukleotide abgespalten werden.

Der Elongationsfaktor TFS aus *Mc. thermolithotrophicus* induziert also eine ebensolche Freisetzung von (Mono-) und Dinukleotiden wie der eukaryelle homologe Elongationsfaktor TFIIS.

1.3 TFS kann arretierte Komplexe befreien

Ein Effekt der TFIIS-induzierten Hydrolyse durch die RNAP II ist, daß hiermit arretierten Elongationskomplexen eine Fortsetzung der Transkription ermöglicht wird (Izban & Luse, 1992, 1993b). Ein arretierter Komplex ist definiert als ein ternärer Komplex, der innerhalb einer Zeitspanne von ~5 min nach Zugabe von Nukleotiden nicht in der Lage ist, die RNA-Synthese fortzusetzen (Samkurashvili & Luse, 1996). Bei den Versuchen am G25-Komplex waren nur sehr wenige Komplexe (Abb. 7, Spur 6) arretiert. Auch die Veränderung der Transkriptionsbedingungen durch eine starke Erhöhung der Salzkonzentration (von 40 mM bis zu 800 mM KCl), Verlängerung der Inkubationszeiten (über Nacht), Verringerung der Temperatur (bis auf 4 °C), Austausch des Mg²⁺-Ions im aktiven Zentrum der RNAP durch z. B. Mn²⁺ oder Veränderung des pH-Wertes (sowohl Erhöhung als auch Absenkung) zeigten keinen Effekt bezüglich einer verstärkten Arretierung (Daten nicht gezeigt).

Um zu beweisen, daß *Methanococcus*-TFS als Elongationsfaktor in der Lage ist, die arretierte RNAP zu befreien, erfolgte der Einsatz einer zusätzlichen DNA-Matrize. Sie basiert auf der „G25-Matrize“, wobei zusätzliche CTP-Stellen bis Position +46 mutiert wurden (Hausner et al., 2000). Die Elongationskomplexe verblieben nach einem Transkriptionsstart aufgrund von CTP-Mangel an Position A46 (A steht für das letzte inkorporierte Nukleotid; s. DNA-Sequenz in Abb. 11). Abb. 10 zeigt pausierte G25- und A46-Komplexe (Spuren 1 und 4 G25 und Spur 7 A46). Diese wurden für 6 min mit 40 µM NTPs in Ab- und Anwesenheit von TFS bei 55 °C verlängert, um ein „run off“-Transkript zu erzeugen (Spuren 2, 3 und 8, 9).

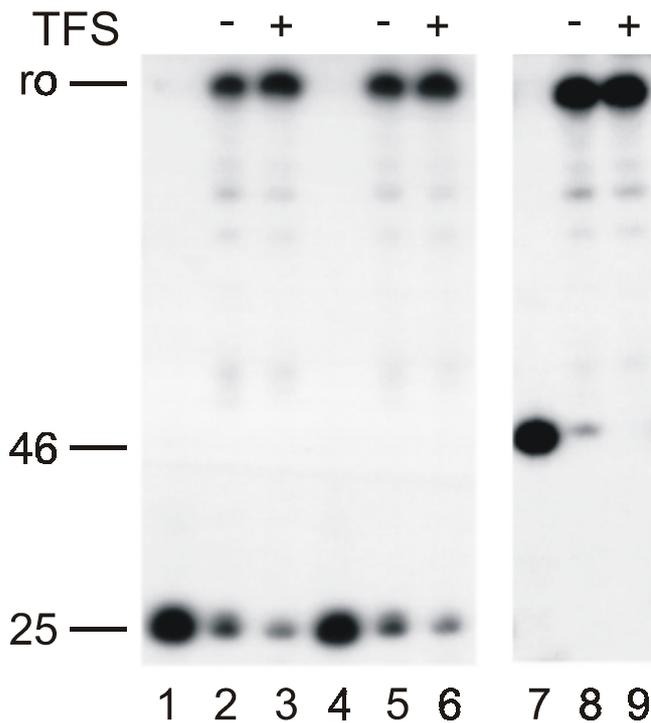


Abb. 10: TFS ist in der Lage, die Anzahl arretierter Elongationskomplexe zu verringern. Pausierte und isolierte G25- und A46-Komplexe wurden erzeugt, wie in Abb. 7 beschrieben (Spuren 1, 4 und 7). Im Anschluß an die Abtrennung der Initiationsfaktoren und freier RNAP, erfolgte bei einem Teil der G25-Komplexe (Spur 4) eine Inkubation für ~2 h bei 55 °C in Anwesenheit von 40 µM ATP und GTP und 4 µM UTP. Eine Verlängerung der RNA-Kette wurde durch die Zugabe von je 40 µM NTP (Spuren 2, 3, 5, 6, 8 und 9) mit und ohne TFS ermöglicht. Die Analyse erfolgte auf einem 15%igen PA/Harnstoffgel.

Es wird in beiden Fällen deutlich, daß die Anzahl an arretierten Komplexen in Anwesenheit von TFS verringert wurde (G25-Komplex, Spuren 2 und 3 im Vergleich), im Falle des A46-Komplexes sogar quantitativ aufgehoben wurde (Spuren 8 und 9 im Vergleich). Bei einer vorhergehenden Inkubation der G25-Komplexe in Anwesenheit von je 20 µM ATP, GTP und UTP für 2 h bei 55 °C, war im Verlaufe der 6minütigen Verlängerung das gleiche Resultat zu beobachten (Spuren 5 und 6). Außerdem ist zu erkennen, daß durch die befreiten Komplexe die Gesamtmenge an „run off“- Transkripten leicht erhöht war.

Zusammenfassend läßt sich somit feststellen, daß es sich bei TFS aufgrund seiner Eigenschaften, (i) RNA-Hydrolyse mit der Freisetzung von Dinukleotiden in der RNAP zu induzieren und (ii) der Befreiung arretierter Komplexe, um einen archaeellen Elongationsfaktor handelt, mit ähnlichen Eigenschaften wie TFIIIS bei den Eukarya oder GreA und GreB bei den Bacteria.

2 Charakterisierung früher und reifer Elongationskomplexe

Die Elongation der Transkription ist in mehrere aufeinanderfolgende Abschnitte unterteilt (zusammengefaßt in Dvir, 2002; Fish & Kane, 2002). Zwei dieser Phasen sind gekennzeichnet durch (i) frühe und (ii) reife Elongationskomplexe mit unterschiedlichen Eigenschaften und Konformationen (Samkurashvili & Luse,

1996; 1998). Während frühe Elongationskomplexe allgemein dazu neigen, auf der DNA zurückzugleiten, häufig zu arretieren oder von der DNA zu dissoziieren, sind reife Elongationskomplexe sehr stabil an die DNA gebunden. Auch die Konformation der RNAP verändert sich. Haben frühe Komplexe häufig „arretierte“ Konformationen, so weisen reife Komplexe eine „normale“ Konformation auf (s. I Einleitung).

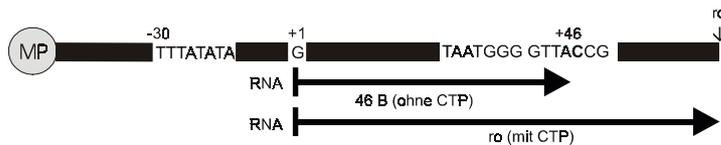
Bei der Charakterisierung des archaeellen Elongationsfaktors TFS im vorherigen Abschnitt erfolgte der Einsatz zweier DNA-Matrizen. Auf der „G25-Matrize“ entstehen frühe Elongationskomplexe, auf der „A46-Matrize“ reife Elongationskomplexe. Schon hier wurden bei einer vergleichenden Betrachtung des Verhaltens hinsichtlich der Befreiung von arretierten Komplexen Unterschiede offensichtlich (Abschnitt III 1.3, Abb. 10). Daher war es interessant zu erfahren, ob im Verlauf der Elongation bei *Methanococcus* weitere Unterschiede auftreten. Im Folgenden wurden die Besonderheiten von frühen (G25) und reifen (A46) *Methanococcus*-Elongationskomplexen bezüglich ihrer Eigenschaften (III 2.1) und ihrer Konformationen (III 2.2) untersucht.

2. 1 Eigenschaften früher und reifer Elongationskomplexe

2. 1. 1 Die Aktivität der intrinsischen Nuklease der RNAP früher und reifer Komplexe ist unterschiedlich

Frühe G25-Elongationskomplexe sind gekennzeichnet durch eine relativ hohe eigene Hydrolyseaktivität, die durch TFS verstärkt wird (Abschnitt III 1.1).

Isolierte man reife A46-Komplexe (Abb. 11, Spur 1) und inkubierte sie anschließend über einen längeren Zeitraum (Spur 9, 180 min) ohne Nukleotide, war im Unterschied zu frühen G25-Komplexen auffällig, daß A46-Komplexe eine sehr geringe intrinsische Hydrolyseaktivität aufwiesen (leichte Signalstärkeabnahme von 1 bis 180 min, Spuren 3, 5, 7 und 9).



| | | | | | | | | | |
|------------|---|---|---|----|----|-----|-----|-----|-----|
| Nukleotide | - | + | - | + | - | + | - | + | - |
| Zeit (min) | 0 | 1 | 1 | 45 | 45 | 120 | 120 | 180 | 180 |

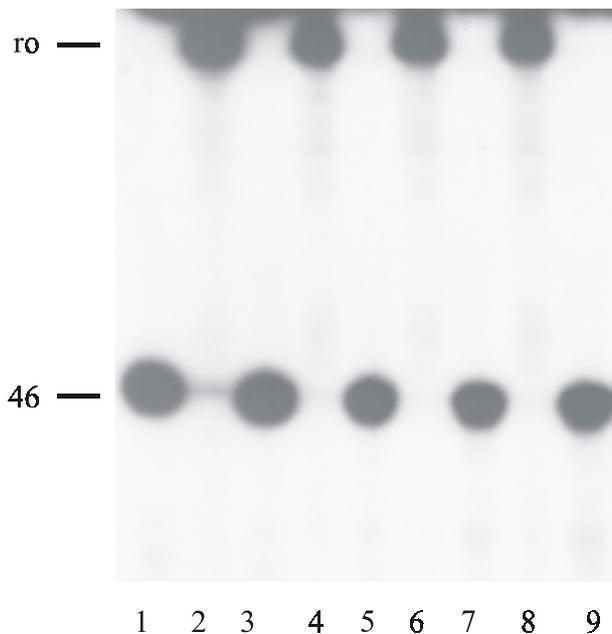


Abb. 11: Langzeitinkubation ohne Nukleotide und ohne TFS am reifen Elongationskomplex.

Oben, schematische Darstellung der verwendeten immobilisierten DNA-Matrize. Die Sequenz von Position +1 bis +46 ist so verändert, daß bis zu dieser Position kein CTP benötigt wird. Die Sequenz der TATA-Box, des Transkriptionsstarts an Position +1 und die Positionen +36 bis +49 sind gezeigt; MP = Magnet-Partikel. *Unten*, pausierte A46-Elongationskomplexe wurden isoliert und von Nukleotiden, Faktoren und nicht-komplexierter RNAP getrennt (Spur 1). Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 55 °C für die angegebenen Zeiten ohne Nukleotide (Spuren 3, 5, 7 und 9), gefolgt von einer 5minütigen „run off“-Transkription (Spuren 2, 4, 6 und 8). Die Analyse des Versuches erfolgte auf einem 15%igen PA/Harnstoffgel.

Bei einer anschließenden Verlängerungs-Reaktion für 5 min bei 55 °C war zu erkennen, daß ebenso wie bei den frühen Komplexen, auch bei den reifen Elongationskomplexen nur sehr wenige arretierte Komplexe entstanden (s. auch Abb. 10) bzw. keine RNA von den Komplexen freigesetzt wird (Spuren 2, 4, 6 und 8). Eine ähnlich geringe Hydrolyseaktivität besitzt ein früher Elongationskomplex nur bei einer Absenkung der Inkubationstemperatur auf unter 10 °C (Daten nicht gezeigt).

2. 1. 2 TFS-induzierte Hydrolyse bei reifen Komplexen erfolgt in Dinukleotidschritten

Im Gegensatz zum unterschiedlichen Verhalten nukleotidfreier früher und reifer Elongationskomplexe bei der TFS-unabhängigen Hydrolyse, erfolgte auch bei reifen Elongationskomplexen eine TFS-induzierte Hydrolyse in Dinukleotidschritten (Abb. 12). Anders als bei der TFS-induzierten Hydrolyse am

frühen Elongationskomplex, wurde am reifen Komplex das Ausmaß an Hydrolyse jedoch nicht über die Zeit, sondern über das Verhältnis von in den Transkriptionsansatz eingesetzte RNAP zu TFS dargestellt (von 1:4 bis 1:32). Das zelluläre Verhältnis von TFS und RNAP wurde ermittelt, es beträgt 2:1 (Daten nicht gezeigt).

Bei der Untersuchung der verkürzten RNA war zunächst ein sehr stabiles, um zwei Dinukleotide verkürztes, Intermediärprodukt an G42 zu erkennen (Spuren 1 und 2). Dieses wurde mit steigenden TFS-Konzentrationen weiter hydrolysiert und ein um 10 B verkürzter U36-Komplex entstand (Spuren 3 und 4). Die Analyse der Dinukleotide zeigte aber, daß die RNA-Hydrolyse, im Gegensatz zur Hydrolyse bei frühen G25-Komplexen, über 10 B fortgesetzt werden konnte. Bei der Analyse der Spaltprodukte ist bei einer idealen Dinukleotidhydrolyse zu erwarten, daß pUpA (45/46), pGpU (43/44) und pUpG (39/40) nachweisbar sind (s. Sequenz in Abb. 12). Fast ausschließlich pUpA und pGpU/pUpG waren daher beim Einsatz geringer Mengen an TFS zu detektieren. Bei höheren Konzentrationen an TFS resultierte als zusätzliches markiertes Hydrolyseprodukt pUpU. Dieses Produkt entstand höchstwahrscheinlich durch eine fortgesetzte RNA-Hydrolyse von 16 B an Position +31/32 (s. Sequenz in Abb. 12). Eine anschließende Dinukleotidabspaltung ergab dann das pUpU.

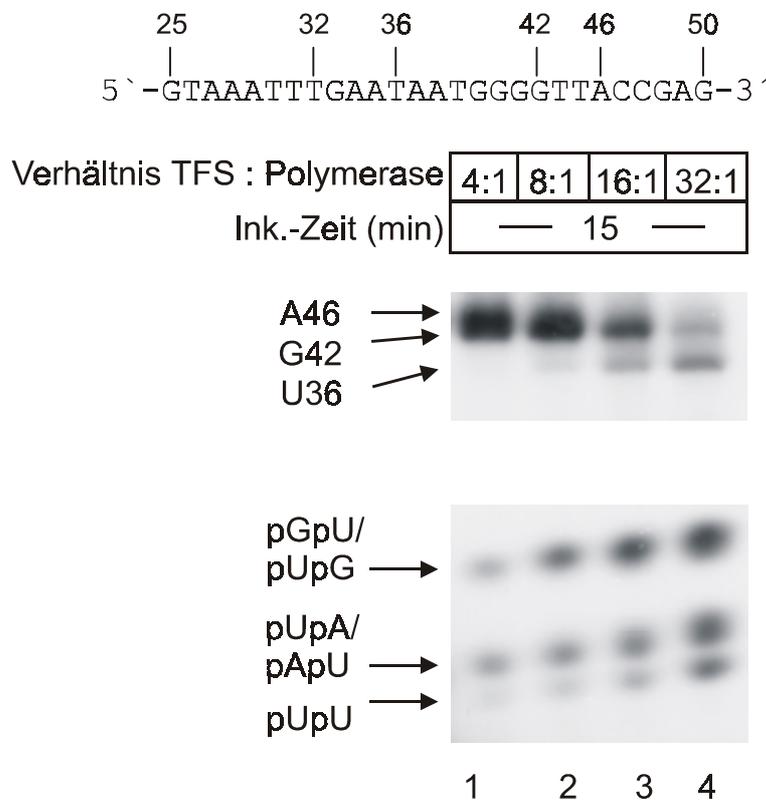


Abb. 12: A46-Elongationskomplexe hydrolysieren TFS-induziert Dinukleotide. *Oben,* isolierte A46-Komplexe wurden ohne Nucleotide mit steigenden Mengen TFS (Spur 1, 50 ng - Spur 4, 400 ng) für 15 min bei 55 °C inkubiert. Die Hydrolyse erfolgte über zwei stabile Elongationskomplexe mit verkürzter RNA an G42 und U36. *Unten,* Analyse der resultierenden Dinukleotide. Die Sequenz von Position +25 bis +50 ist gezeigt. Der Gellauf erfolgte auf einem 28%igen PA/Harnstoffgel.

2. 1. 3 Frühe Elongationskomplexe werden leichter freigesetzt als reife Elongationskomplexe

Eine Inkubation isolierter G25- und A46-Komplexe ohne die für die katalytische Aktivität essentielle Mg^{2+} -Ionen zeigte, daß die Komplexe sich unterschiedlich verhielten. Während die meisten A46-Komplexe stabil an der DNA gebunden blieben, erfolgte in der frühen Phase der Elongation beim Großteil der RNAP eine Freisetzung der RNA-Transkripte.

Abb. 13 zeigt isolierte, nukleotidfreie frühe und reife Elongationskomplexe, die in Transkriptionspuffer ohne Mg^{2+} -Ionen resuspendiert und bis maximal 2 h bei 55 °C inkubiert wurden. Bei einer anschließenden Zugabe von Mg^{2+} -Ionen, NTP und TFS war die freigesetzte RNAP anhand der nicht verlängerten Ausgangssignale zu erkennen. Die Quantifizierung der Signale zeigte den Unterschied. Nach 15 min waren schon fast 40 % der RNA früher Komplexe freigesetzt, dagegen blieb die Anzahl bei den reifen Elongationskomplexen selbst nach 2 h Inkubation bei 25 %.

| | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|---|----|----|----|-----|---|----|----|----|-----|
| Anzahl freigesetzter RNAP (%) | 0 | 37 | 71 | 84 | 90 | 0 | 7 | 19 | 25 | 25 |
| Mg^{2+} /Nukleotide/TFS | - | + | + | + | + | - | + | + | + | + |
| Zeit (min) | 0 | 15 | 30 | 60 | 120 | 0 | 15 | 30 | 60 | 120 |

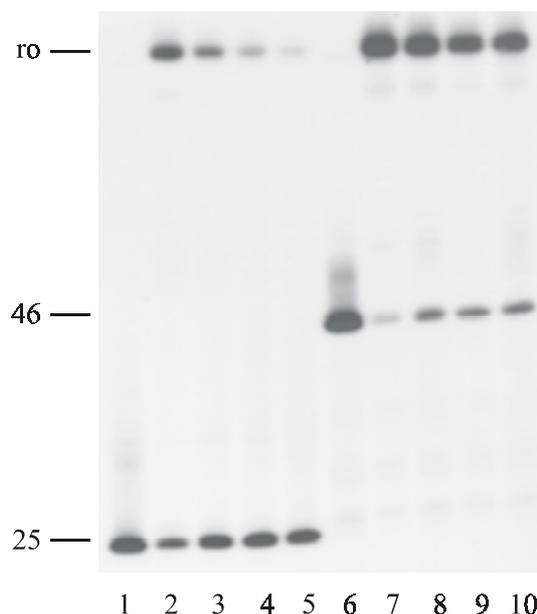


Abb. 13: Das Mg^{2+} -Ion im aktiven Zentrum der RNAP ist von entscheidender Bedeutung für die Stabilität früher Komplexe. Isolierte, nukleotidfreie G25- und A46-Komplexe wurden ohne Mg^{2+} -Ionen in Transkriptionspuffer für die angegebenen Zeiten inkubiert. Anschließend erfolgte eine „run off“-Transkription für 5 min bei 55 °C. Das Verhältnis von freigesetzter zu komplexierter RNAP wurde quantifiziert. Der Gellauf erfolgte auf einem 15%igen PA/Harnstoffgel.

Interessanterweise zeigen TFS-induzierte zurückgelaufene G15-Komplexe ohne Mg^{2+} -Ionen eine höhere Stabilität als G25-Komplexe (Daten nicht gezeigt). Ein möglicher Grund hierfür sowie die Grundlage für die unterschiedlichen Eigenschaften früher und reifer Elongationskomplexe wird im nächsten Abschnitt dargestellt.

2. 2 Kartierung von frühen und reifen Elongationskomplexen

In Abschnitt III 2.1 (und III 1.3) konnte gezeigt werden, daß sich frühe und reife Elongationskomplexe in ihren Eigenschaften unterscheiden. Ein wesentlicher Unterschied ist, daß reife Elongationskomplexe viel stabiler an ihrer Position verbleiben, frühe Komplexe hingegen eher die Tendenz haben, RNA zu hydrolysieren und zurückzulaufen (vergl. Abb. 7 und 11) bzw. freigesetzt zu werden (Abb. 13). Zusätzlich zeigte III 1.3, daß alle reifen arretierten Komplexe mit Hilfe von TFS in der Lage sind, die Transkription fortzusetzen (Abb. 10). Diese spezifischen Verhaltensweisen der Komplexe sind sehr wahrscheinlich durch unterschiedliche Konformationen bzw. Positionierungen der RNAP auf der DNA bedingt. Es ist bekannt, daß bei eukaryellen Transkriptionskomplexen in verschiedenen Stadien der Elongation die Konformationen der RNAP II auf der DNA unterschiedlich sind (Samkurashvili & Luse, 1998). Im folgenden Abschnitt wird unter Verwendung von DNA- (Exonuklease III und Kaliumpermanganat) und RNA- (RNase A und RNase T1) Schutzexperimenten gezeigt, daß sich die frühe und die reife Elongation auch in der Konformation der RNAP unterscheiden.

2. 2. 1 Schematische Darstellung immobilisierter Exonuklease III-Footprints

Mit Hilfe von Exonuklease III (Exo III) erfolgte die Erfassung der Ausdehnung eines Elongationskomplexes auf der DNA. Die Exo III hydrolysiert vom 3'-Ende von dsDNA kontinuierlich Mononukleotide (s. II 6.3). Hierbei wird die Hydrolyse der von einem ternären Komplex bedeckten DNA verhindert und somit die Ausdehnung der RNAP auf der DNA sichtbar gemacht. Abb. 14 zeigt den schematischen Verlauf eines Versuchs.

Exonuklease III - Footprinting von immobilisierten Transkriptionskomplexen

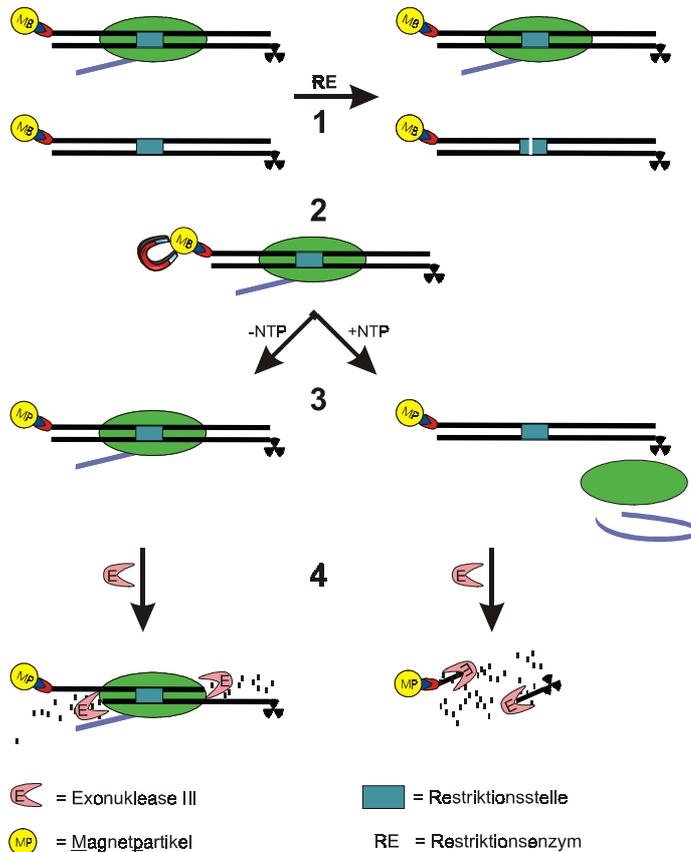


Abb. 14: Schematische Darstellung des Exo III-Footprintings von immobilisierten Komplexen. Nach der Positionierung von Elongationskomplexen kann zunächst eine Restriktionshydrolyse nicht-komplexierter 5'-markierter DNA erfolgen (1). Diese „Vorbehandlung“ minimiert das Auftreten möglicher störender unspezifischer Hintergrundsignale im Verlauf der Exonuklease-Reaktion. Ein anschließender Isolierungsschritt (2) trennt die komplexierte markierte DNA von der geschnittenen freien DNA im Überstand. Bei einem Teil der Komplexe erfolgt vor der Exonuklease-Zugabe, als Kontrolle, eine „run-off“-Transkription (3). Nach der Inkubation mit Exo III

Für die Kartierung der Stromaufwärts- und Stromabwärts-Grenze der ternären Elongationskomplexe in verschiedenen Exo III-Footprint-Ansätzen wurden je nach eingesetzten Primern unterschiedlich große (498 bis 532 Bp) DNA-Matrizen verwendet. Diese waren jeweils am 5'-Ende des codogenen oder nicht-codogenen Strangs mit Biotin-Streptavidin Magnetpartikeln gekoppelt und am 5'-Ende des anderen Strangs radioaktiv-markiert. Zusätzlich befand sich eine *Bst* EII-Schnittstelle (5'-G↓GTNACC-3') bei Position +43. Eine schematische Darstellung der DNA ist in Abb. 10 gezeigt.

2.3 Exo III-Footprints reifer Elongationskomplexe ohne TFS-induzierte Hydrolyse

In vorangegangenen Arbeiten konnten die vor Exo III-Hydrolyse geschützten DNA-Bereiche von frühen G25-Komplexen ermittelt werden (Lange, 1999). Diese

weisen eine für arretierte RNAP charakteristische Konformation auf, obwohl sie Transkriptions-kompetent sind. Im Verlaufe der Identifizierung des TFS als archaellen Elongationsfaktor wurde offensichtlich, daß die Eigenschaften früher und reifer Elongationskomplexe unterschiedlich waren. Footprintergebnisse an eukaryellen Elongationskomplexen (Samkurashvili & Luse, 1996, 1998) zeigen, daß sich frühe und reife RNAP II-Komplexe in ihrer Konformation unterscheiden. Bei den Archaea sind bisher noch keine vergleichenden Footprint-Daten von frühen und reifen Elongationskomplexen bekannt. Zur Untersuchung, ob die unterschiedlichen Eigenschaften der *Mc. thermolithotrophicus*-Elongationskomplexe auch in einer veränderten Konformation manifestiert sind, wurden reife Elongationskomplexe mit und ohne TFS kartiert (Abb. 15 und 16) und mit den Ergebnissen von frühen G25-Komplexen verglichen.

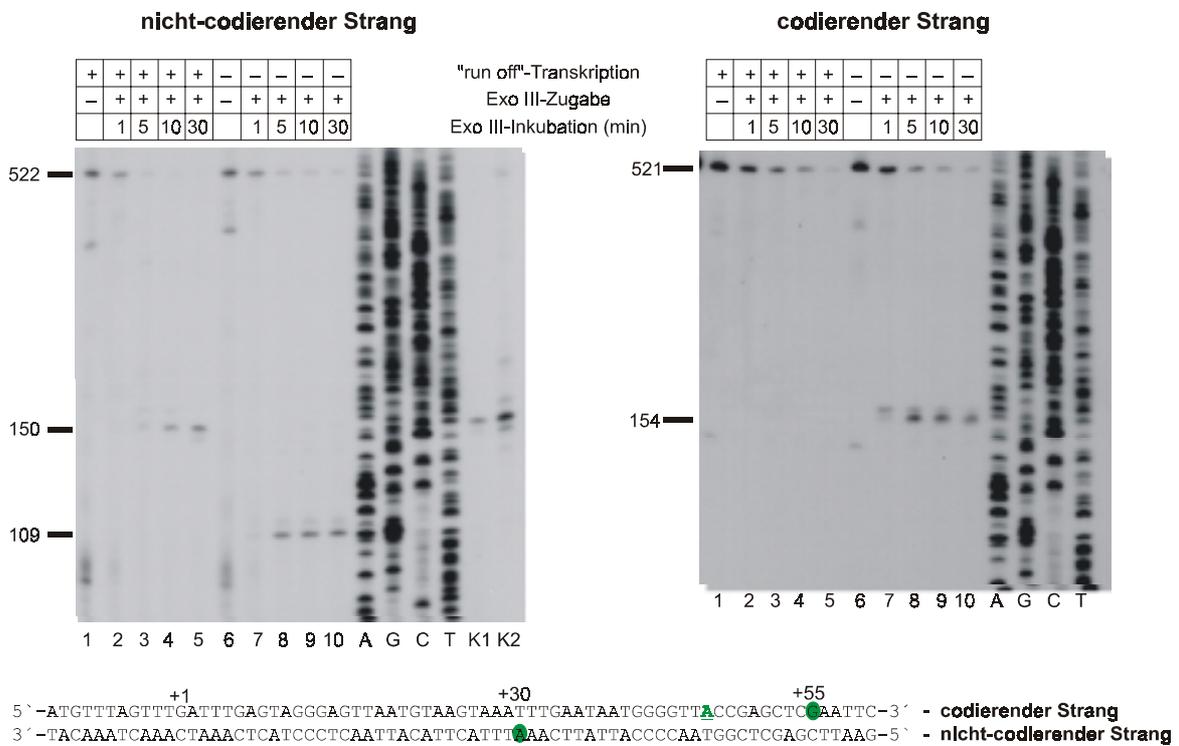


Abb. 15: Exo III-Footprint reifer A46-Elongationskomplexe ohne TFS-induzierte RNA-Hydrolyse. Es wurden A46-Komplexe an einem Strang radioaktiv-markierter DNA erzeugt. Nach der Pausierung wurde nicht komplexierte markierte DNA mit 50 U *Bst* EII für 20 min bei 37 °C gespalten und entfernt. Die Spuren 1 und 6 zeigen die nicht hydrolysierte DNA vor Exo III-Zugabe. Nach der Zugabe von 30 U Exo III pro Ansatz, erfolgte die Hydrolyse der DNA für 1 bis 30 min (Spuren 2 bis 5 und 7 bis 10). Unten ist ein Ausschnitt der Sequenz von pIC31/30PRO-C46 mit den Begrenzungen (Kreise) der RNAP (+30 bis +55) gezeigt. Die Position der 3'-RNA bzw. des katalytischen Zentrums der RNAP an A46 ist in der Sequenz hervorgehoben. A, G, C und T = Sequenzen; K1 und K2 = Exo III-Verdau markierter DNA ohne Protein. Die Auswertung erfolgte auf einem 6%igen Sequenzgel.

Abb. 15 zeigt die vor Exo III-3'→5'-exonukleolytischer DNA-Hydrolyse geschützten Abschnitte der Stromaufwärts- und Stromabwärts-Regionen. Es waren ~109 Bp (nicht-codierender Strang) und ~154 Bp (codierender Strang) vor Exo III-

Hydrolyse geschützte DNA-Bereiche zu erkennen. Hiermit ergab sich eine Ausdehnung der RNAP auf der DNA von ~26 Bp. Dieses entspricht in etwa der Größe früher Elongationskomplexe, wobei die Konformation der RNAP an dieser Position eine andere war (s. Schema in III 2.7). Bei der Auswertung des Footprints auf dem nicht-codierenden DNA-Strang war ein Signal von ~150 Bp innerhalb der „run-off“-Kontrollansätze zu erkennen (Spuren 4 und 5). Diese Signale entstanden auch in Exo III-Kontrollen, bei denen radioaktiv-markierte DNA ohne Proteine eingesetzt wurde (Spuren K1 und K2). Diese Beobachtung läßt vermuten, daß es, bedingt durch die RNAP an A46, zu einer Konformationsänderung der DNA kam und dadurch eine fortgesetzte DNA-Hydrolyse durch die Exo III den geschützten Bereich sichtbar machen konnte.

2.4 Exo III-Footprints reifer Elongationskomplexe mit TFS-induzierter Hydrolyse

Bei TFS-induzierten G15-Komplexen ist trotz RNA-Hydrolyse eine Erweiterung des Footprintmusters in Stromabwärts-Richtung zu erkennen (Lange, 1999). Es ist gezeigt worden, daß TFIIS RNA- und DNA-Bindeaktivität besitzt (Agarwal et al., 1991; Powell et al., 1996). Daher war es interessant zu überprüfen, ob auch beim reifen Elongationskomplex mit „normaler“ Konformation eine Erweiterung des geschützten Stromabwärts-DNA-Bereichs erfolgt. Das wäre ein weiterer Hinweis darauf, daß auch TFS in der Lage ist, an DNA zu binden und dadurch die Begrenzung eines ternären Komplexes zu erweitern.

Abb. 16 C zeigt die RNA reifer TFS-hydrolysierter G42- und U36-Komplexe. Abb. 16 A und B zeigen die vor Exo III-Hydrolyse geschützten DNA-Bereiche von ~129 und ~133/134 Bp (codierender Strang) und ~82/83 und ~87/88 Bp (nicht-codierender Strang). Das Ausmaß der Komplexe nach TFS-induzierter RNA-Hydrolyse betrug damit ~28 bis 31 Bp, was denen früher TFS-induzierter G15-Komplexe entsprach (s. Schema in Abb. 22).

2.5 Kaliumpermanganat-Footprint eines reifen Elongationskomplexes

Das Ausmaß der Transkriptionsblase am frühen G25-Komplex ist mit ~19 Nukleotiden im Vergleich zu Transkriptionsblasen vergleichbarer Komplexe anderer Organismen relativ groß (pers. Mitteilung, Hausner). Es ist jedoch wahrscheinlich, daß diese Vergrößerung durch eine erhöhte Hydrolyseaktivität der *Methanococcus*-RNAP in der frühen Elongation zustande kommt (s. zum Beispiel Abb. 7). Um die Frage zu klären, ob das Ausmaß des „open complex“ im reifen Elongationskomplex anders ist, wurden zur Identifizierung der Transkriptionsblase an Position A46 Kaliumpermanganat (KMnO₄)-Footprints durchgeführt (Abb. 17). Diese wurden aufgrund der Darstellung des „open complex“ am G25-Komplex am linearisierten Plasmid pIC31/30PRO-C46 durchgeführt (II 6.5).

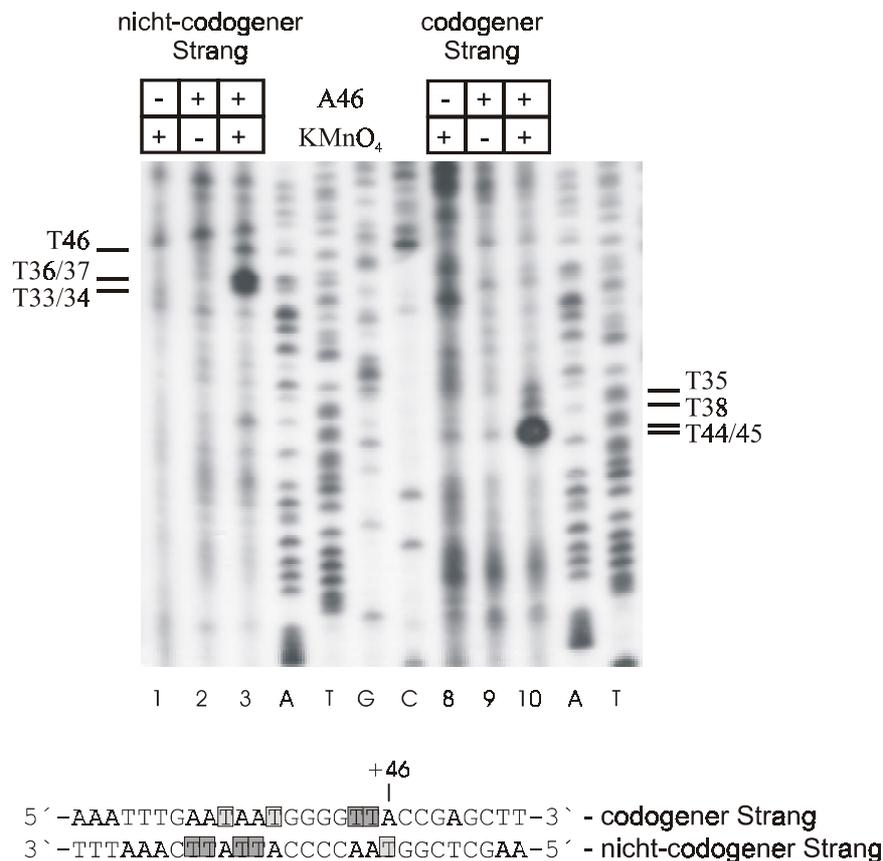


Abb. 17: Darstellung der Transkriptionsblase am pausierten A46-Komplex. Die Erzeugung der Komplexe und die Durchführung des Footprints erfolgte wie in II 6.5 beschrieben. *Oben*, die Spuren 3 und 10 zeigen die nach der Pausierung mit KMnO₄ modifizierten ungepaarten Thymidine am nicht-codogenen und codogenen Strang im „open complex“ eines A46-Komplexes nach 3 min bei 45 °C. Die Kontrollspuren 1, 2, 8 und 9 zeigen den beim indirekten Nachweis entstandenen unspezifischen Hintergrund. A, T, G und C = Sequenzen. Die Analyse erfolgte auf einem 6%igen Sequenzgel. *Unten*, schematische Darstellung der modifizierten Basen im „open complex“; starke Modifikationen haben einen dunkleren Hintergrund. Der Bereich des vermutlichen RNA-DNA-Hybrids ist unterstrichen.

Abb. 17 zeigt, daß im Vergleich zum frühen Komplex ein kleinerer „open complex“ bestand. Dieser hatte ein ungefähres Ausmaß von 13 bis 17 Nukleotiden. In Kontrollansätzen, in denen entweder nur Plasmid-DNA (Spuren 1 und 8) oder unmodifizierte A46-Komplexe (Spuren 2 und 9) in die asymmetrische PCR eingesetzt wurden, waren keine Signale in den entsprechenden Bereichen zu erkennen.

Aufgrund struktureller und biochemischer Analysen von bakteriellen und eukaryellen Elongationskomplexen, konnte ein RNA-DNA-Hybrid von ~8 bis 9 Bp bestimmt werden (Korzheva & Mustaev, 2001; Cramer, 2002). Das Muster der unterschiedlich starken Modifizierungen der Thymidine am nicht-codogenen Strang deutet darauf hin, daß das RNA-DNA-Hybrid bei *Methanococcus*-Elongationskomplexen maximal ~8 Bp umfaßt. Aufgrund der Tatsache, daß von Position +45 bis +39 keine Thymidine auf dem nicht-codogenen-Strang vorhanden sind, ist dieses jedoch nicht eindeutig bewiesen. Die starke Modifizierung des Thymidins an Position +38 spricht allerdings eindeutig gegen ein 9 Bp RNA-DNA-Hybrid. Die schematische Gegenüberstellung der Resultate von KMnO₄-Footprints am frühen und am reifen Komplex erfolgt nach der Darstellung von RNase-Schutzexperimenten in Abschnitt II 2.7.

2.6 RNase-Schutzexperimente am frühen und am reifen Elongationskomplex

Ebenso wie die RNAP Abschnitte auf der DNA vor enzymatischer Hydrolyse schützen kann (III 2.3 und 2.4), ist in einem ternären Elongationskomplex auch ein Teil der RNA vor Hydrolyse geschützt. Das Ausmaß geschützter Bereiche ist dabei abhängig vom jeweiligen Zustand der RNAP. Bei einem transkriptionsinkompetenten Komplex gleitet die RNAP auf der DNA zurück und verliert das 3'-Ende der RNA aus dem aktiven Zentrum, was durch eine Erweiterung geschützter RNA-Abschnitte zu erkennen ist (Rice et al., 1991; Komissarova & Kashlev, 1997a, b). RNase-Schutzexperimente sollten zeigen, ob die bisher präsentierten Unterschiede früher und reifer Elongation, sowohl in ihren Eigenschaften als auch insbesondere in der Konformation der Komplexe, auf RNA-Ebene sichtbar werden.

Im Verlauf der RNase T1-Experimente zur Detektion der im frühen Elongationskomplex bedeckten RNA-Abschnitte wurde der G25-Komplex für maximal 6 min mit RNase T1 inkubiert (Abb. 19). Es ergab sich ein Ausmaß von 24/25 B geschützter RNA. Erst nach längeren Inkubationszeiten war die RNase T1 in der Lage, ein G abzuspalten. Zusätzliche minimale Signale von 19 bzw. 17 B entstanden nach verlängerter Inkubation. Sie resultierten höchstwahrscheinlich durch Komplexe, die aufgrund der RNase T1-Inkubation freigesetzt wurden, sind aber vernachlässigbar gering (z. B. Spur 6, nach 3 min ~ 4 % der Gesamtaktivität in psl). Ein ohne RNase T1 behandelter Komplex (Spur 1) diente als Kontrolle, welche zeigte, daß die um 1 B verkürzte RNA kein Hydrolyseprodukt eines frühen Komplexes mit erhöhter intrinsischer RNase-Aktivität war.

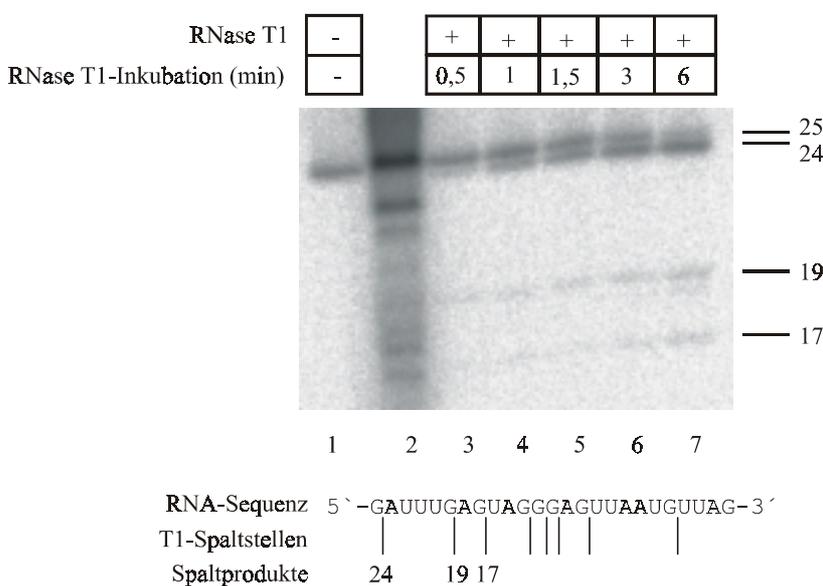


Abb. 19: RNase T1-Schutzexperiment mit einem frühen endmarkierten G25-Elongationskomplex. *Oben*, isolierte ternäre Komplexe wurden in Anwesenheit von jeweils 20 μ M ATP, GTP und UTP für 30 sec (Spur 3) bis 6 min (Spur 7) mit 50 U RNase T1 bei 37 °C inkubiert. Eine Kontrolle (Spur 1) zeigt, daß die resultierende verkürzte RNA keine zurückgelaufenen frühen Komplexe darstellten. Spur 2 zeigt eine Cordycepin-RNA-Sequenzleiter. Die Analyse des Versuchs erfolgte auf einem 17%igen PA/Harnstoff-gel. *Unten*, schematische Darstellung der RNA, T1-Spaltstellen und entstehenden Produkten.

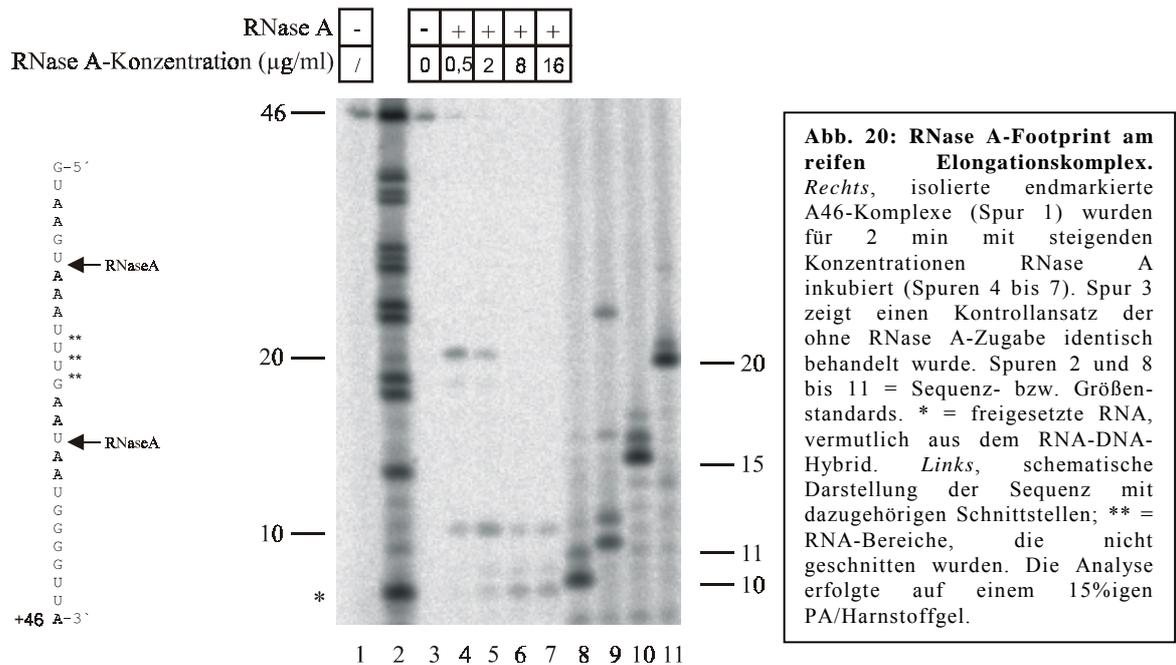
Beim Vergleich zwischen vor RNase T1 geschützter RNA-Bereiche früher und reifer Komplexe ist festzustellen, daß ebenso wie auf DNA-Ebene, Unterschiede bestehen. Der RNA-Schutzbereich am frühen Komplex erweitert sich, entsprechend dem veränderten „arretierten“ Exo III-Muster.

2. 6. 2 Frühe und reife Elongationskomplexe schützen unterschiedlich große RNA-Bereiche vor RNase A-Spaltung

Die RNase T1 spaltet spezifisch an G-Positionen. Die Sequenz der synthetisierten RNA der frühen und reifen Komplexe unterscheidet sich jedoch (s. Sequenzen in Abb. 18 und 19). Aufgrund der Sequenzspezifität der RNase T1 wurde, um den geschützten Bereich weiter aufzulösen, eine weitere RNase, RNase A, verwendet.

Die RNase A spaltet spezifisch an U- und C-Positionen (II 6.3). Da sie abhängig von der eingesetzten Menge, insbesondere frühe ternäre Komplexe zerstören kann, wurden die Versuche mit Konzentrationsreihen des Enzyms durchgeführt.

Abb. 20 zeigt das Ergebnis eines RNase A-Schutzexperiments mit einem endmarkierten A46-Elongationskomplex. Es wurde deutlich, daß die geschützten RNA-Bereiche mit steigender Konzentration an RNase A kleiner wurden.



Der reife Elongationskomplex schützte, in Abhängigkeit von der Konzentration der RNase A, einen Bereich von ~20 oder ~10 Nukleotiden. Das entspricht in etwa den Dimensionen im RNase T1-Versuch.

Abb. 21 zeigt das Ergebnis des RNase A-Schutzexperiments am frühen G25-Komplex. Hier war offensichtlich, daß schon 2 µg/ml RNase A ausreichten, um den frühen Elongationskomplex zu zerstören (vergl. Abb. 20 und 21 Spuren 4, bei 2 µg/ml RNase). Beim frühen Komplex wurde in Abhängigkeit der RNase A-Konzentration ein Bereich von 16 bis 20 Nukleotiden geschützt. Aufgrund der geringeren Stabilität war schon bei einer Konzentration von 0,5 µg/ml RNase A die Freisetzung der RNA anhand von zusätzlich entstehenden Signalen (* in Abb. 21) zu beobachten.

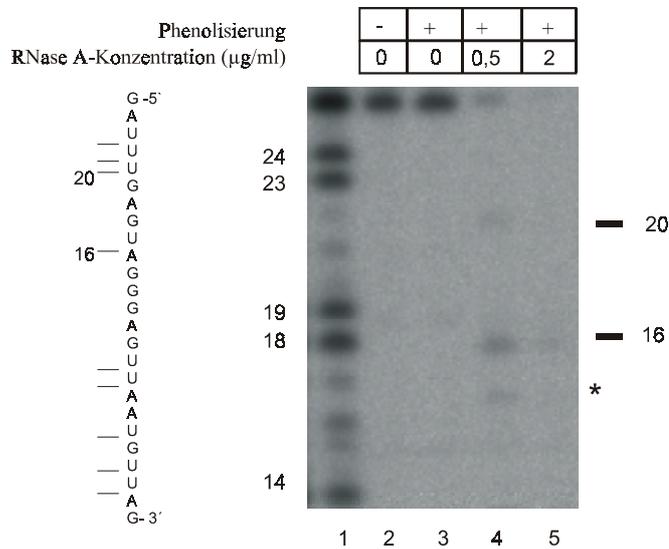


Abb. 21: RNase A-Footprint am frühen Elongationskomplex. G25-Komplexe wurden in Anwesenheit von Nukleotiden mit steigenden Mengen von RNase A inkubiert (Spuren 4 und 5). Nach 2 min erfolgte der Reaktionsstop durch mehrfache Phenolisierung. Spur 2 zeigt den Ausgangskomplex vor RNase-Zugabe. Spur 3 zeigt einen phenolisierten Kontrollansatz. In Spur 1 wurde eine Cordycepin-RNA-Sequenzleiter aufgetragen. * zeigt aus abdissoziierten Komplexen freigesetzte RNA. Der Gellauf erfolgte auf einem 17%igen PA/Harnstoffgel. Die RNA-Sequenz mit dazugehörigen Spaltstellen, ist *links* gezeigt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse aller RNase-Schutzexperimente, daß auch auf Ebene der RNA Unterschiede bei der Konformation früher und reifer Elongationskomplexe existieren.

2.7 Schematische Gegenüberstellung der Kartierung früher und reifer Elongationskomplexe

Eine abschließende schematische Gegenüberstellung der Ergebnisse aus III 2.3 bis 2.6 soll die fundamentalen Konformationsunterschiede früher und reifer Elongationskomplexe veranschaulichen und ist in Abb. 22 gezeigt.

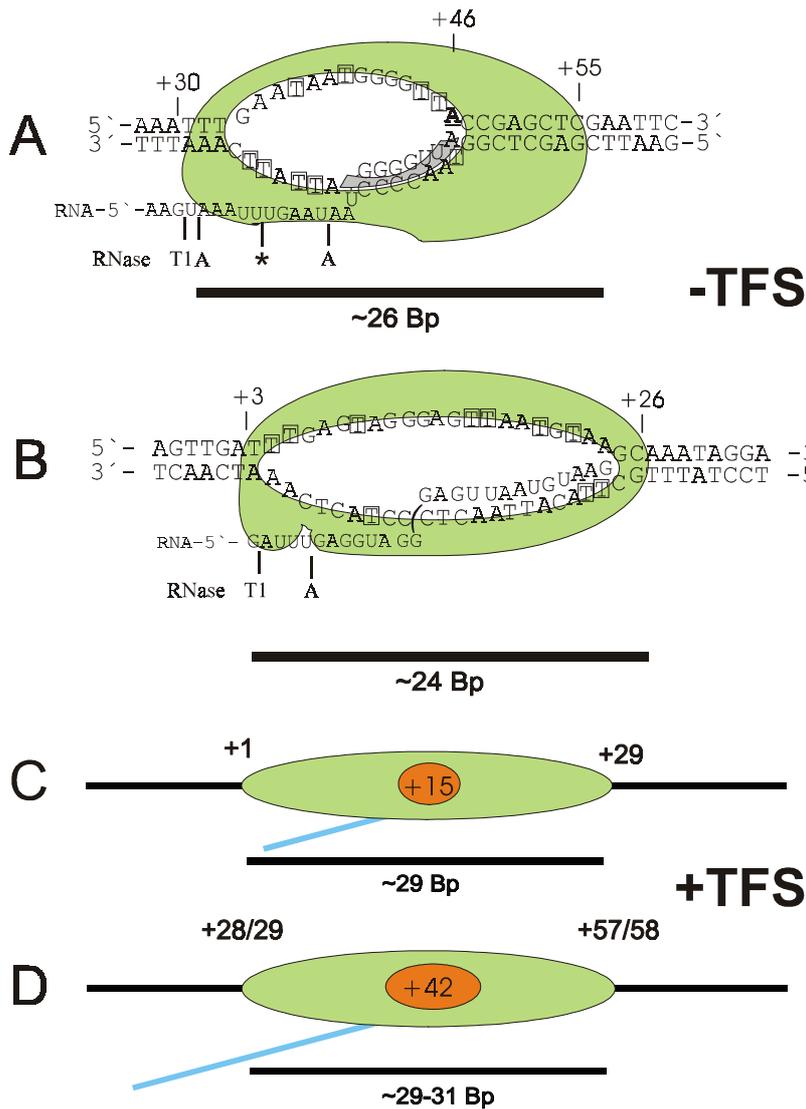


Abb. 22: Die schematische Gegenüberstellung der Exo III-, KMnO₄- und RNase -Footprints zeigt Konformationsunterschiede in den unterschiedlichen Phasen der Elongation. A und B zeigen die A46- und G25-Komplexe im Vergleich. Das vermutliche RNA-DNA Hybrid im A46-Komplex ist in grau hinterlegt. Beim G25-Komplex ist nur ein vermutlicher RNA-DNA-Interaktionsbereich dargestellt. RNase-Schnittstellen sind angegeben. Die modifizierten Thymidine im „open complex“ sind umrandet. Die Größe der Komplexe umfasst ~26 Bp (A46) bzw. ~24 Bp (G25). * zeigt die Größe der RNase T1 geschützten RNA im G49-Komplex. C und D zeigen den reifen (G42) und frühen (G15) Elongationskomplex nach erfolgter RNA-Hydrolyse, in

Bei Betrachtung der frühen und reifen Komplexe ohne TFS (Abb. 22 A und B) ist festzustellen, daß grundlegend unterschiedliche Exo III-Begrenzungen bestehen. Diese zeigen beim frühen Komplex eine „arretierte“ Konformation einer Transkriptions-kompetenten RNAP und beim reifen Komplex eine „normale“ Stellung der RNAP auf der DNA (mittig über der DNA, bezogen auf das zuletzt inkorporierte Nukleotid). Die Konformationen entsprechen denen eukaryeller und bakterieller früher und reifer Elongationskomplexe (Krummel & Chamberlin, 1992; Samkurashvili & Luse, 1998). Die unterschiedlichen RNase-Footergebnisse bestätigen die unterschiedlichen Konformationen auch auf RNA-Ebene eindeutig. Hier ist das Schutzmuster im frühen G25-Komplex aufgrund der „arretierten“ Konformation erweitert. Die Ausmaße der offenen Transkriptionsblase unterscheiden sich ebenfalls. Beim reifen A46-Komplex entspricht sowohl die

Dimension des „open complex“ als auch das vermutliche RNA-DNA-Hybrid vergleichbaren Elongationskomplexen (Korzheva & Mustaev, 2001).

Vergleicht man die vor Exo III geschützten DNA-Abschnitte nach TFS-induzierter Hydrolyse (Abb. 22, C und D), fällt auf, daß in beiden Fällen eine Erweiterung der vor Exo III geschützten DNA-Abschnitte in Stromabwärts-Richtung zu erkennen ist. Diese Erweiterungen deuten darauf hin, daß TFS durch DNA-Bindung dafür verantwortlich ist. Während beim frühen Komplex eine Erweiterung von ~ 3 Bp nach 10 B RNA-Hydrolyse erfolgt, so ist die Erweiterung beim reifen Komplex etwas weniger stark. Hier erfolgt ebenfalls eine Erweiterung um ~ 3 Bp nach RNA-Hydrolyse, jedoch sind beim G42-Komplex erst 4 B RNA hydrolysiert worden.

Es ist also festzustellen, daß die unterschiedlichen Eigenschaften früher und reifer Elongationskomplexe aus einer Konformationsänderung im Verlauf der Transkription zu resultieren scheinen. Hierfür spricht auch die erwähnte höhere Stabilität von TFS-induzierten G15-Komplexen (Abb. 22 C und nicht gezeigte Daten) ohne Mg^{2+} , welche eher die Konformation reifer Komplexe besitzen.

3 Der Motor für TFS-induzierte Hydrolyse ist das Pausieren von Elongationskomplexen

In den vorangegangenen Abschnitten konnte gezeigt werden, daß TFS als archaeeller Elongationsfaktor in der Lage ist, eine intrinsische Nuklease-Aktivität in der DNA-abhängigen RNAP aus *Mc. thermolithotrophicus* zu aktivieren. Der Motor, der den Mechanismus der Hydrolyse-Aktivierung antreibt, ist beim homologen TFIIS-Protein identifiziert worden (Reines et al., 1993). Für *Methanococcus*-TFS wurde er jedoch noch nicht ermittelt. Aus diesem Grunde wurden Experimente durchgeführt, die den Mechanismus der TFS-Hydrolyse-Aktivierung aufklären sollten.

3.1 TFS induziert einen Hydrolyse-Resynthese-Mechanismus in der pausierten RNAP

Beim TFIIS konnte gezeigt werden, daß in pausierten Komplexen die TFIIS-induzierte Nuklease Aktivität eingeschaltet wird (Izban & Luse, 1992), bei der es im Anschluß zur Freisetzung von Mono- und Dinukleotiden kommt. Bei der Charakterisierung des TFS als archaeeller Elongationsfaktor wurde gezeigt, daß die

TFS-induzierte Hydrolyse durch Pausieren der RNAP aktiviert wird. In Abwesenheit von Nukleotiden erfolgt RNA-Hydrolyse, gefolgt von einem Zurücklaufen der RNAP auf der DNA. Zur genaueren Analyse des Mechanismus der Hydrolyse-Induktion wurden die folgenden Untersuchungen aufgrund der geringeren eigenen Hydrolyseaktivität hauptsächlich am reifen Elongationskomplex durchgeführt.

Abb. 23 A zeigt, daß in unmarkierten isolierten A46-Komplexen in Anwesenheit von radioaktiven Nukleotiden im Verlauf einer Zeitreihe eine endständige Markierung der RNA im ternären Komplex erfolgte. Hierbei erreichte die Stärke der Markierung schon nach 2 min ein relatives Maximum (A, Spur 3 und C). Ergab die Quantifizierung der Signalstärke (C) für den 2 min-Wert ~680 psl (Wert für Radioaktivität), so hatte z. B. der 15 min-Wert nur eine leicht erhöhte Aktivität von ~750 psl. Wie zu erwarten, erfolgte im Gegensatz dazu ohne TFS nur eine relativ schwache Markierung der RNA, die erst nach ~15 min sichtbar wurde (Spur 11 und C; 15 min-Wert ~ 200 psl). Bei Betrachtung der Hydrolyseprodukte war eine Akkumulation an Dinukleotiden offensichtlich (A und C), was bedeutet, daß im Komplex regelmäßig ein Dinukleotid hydrolysiert wurde, um anschließend wieder zwei Nukleotide einzubauen. Die Ermittlung der Hydrolyse-Induktionsrate unter Verwendung quantifizierter Daten ergab einen Wert von ~30 sec unter den gewählten Bedingungen (insbesondere Verhältnis TFS zu RNAP).

Die Verifizierung der entstehenden Dinukleotide unter Verwendung alkalischer Phosphatase (Abb. 23 D) zeigte, daß das Haupthydrolyseprodukt (zu ~90 % in den Spuren 3 und 4) pUpA von +45/46 war.

Abb. 23 B zeigt, daß auch im frühen Elongationskomplex dieser Mechanismus präsent war und somit nicht nur für die reife Elongation, sondern allgemein von Bedeutung ist. Im Unterschied zur fortgeschrittenen Elongation erfolgte aufgrund der bereits gezeigten Eigenschaften (erhöhte eigene Nuklease-Aktivität) eine wesentlich stärkere TFS-unabhängige Markierung der RNA und ein heterogeneres TFS-induziertes Hydrolysemuster, da TFS-abhängige und -unabhängige Hydrolyse sich in der frühen Elongation gegenseitig überlagern konnten.

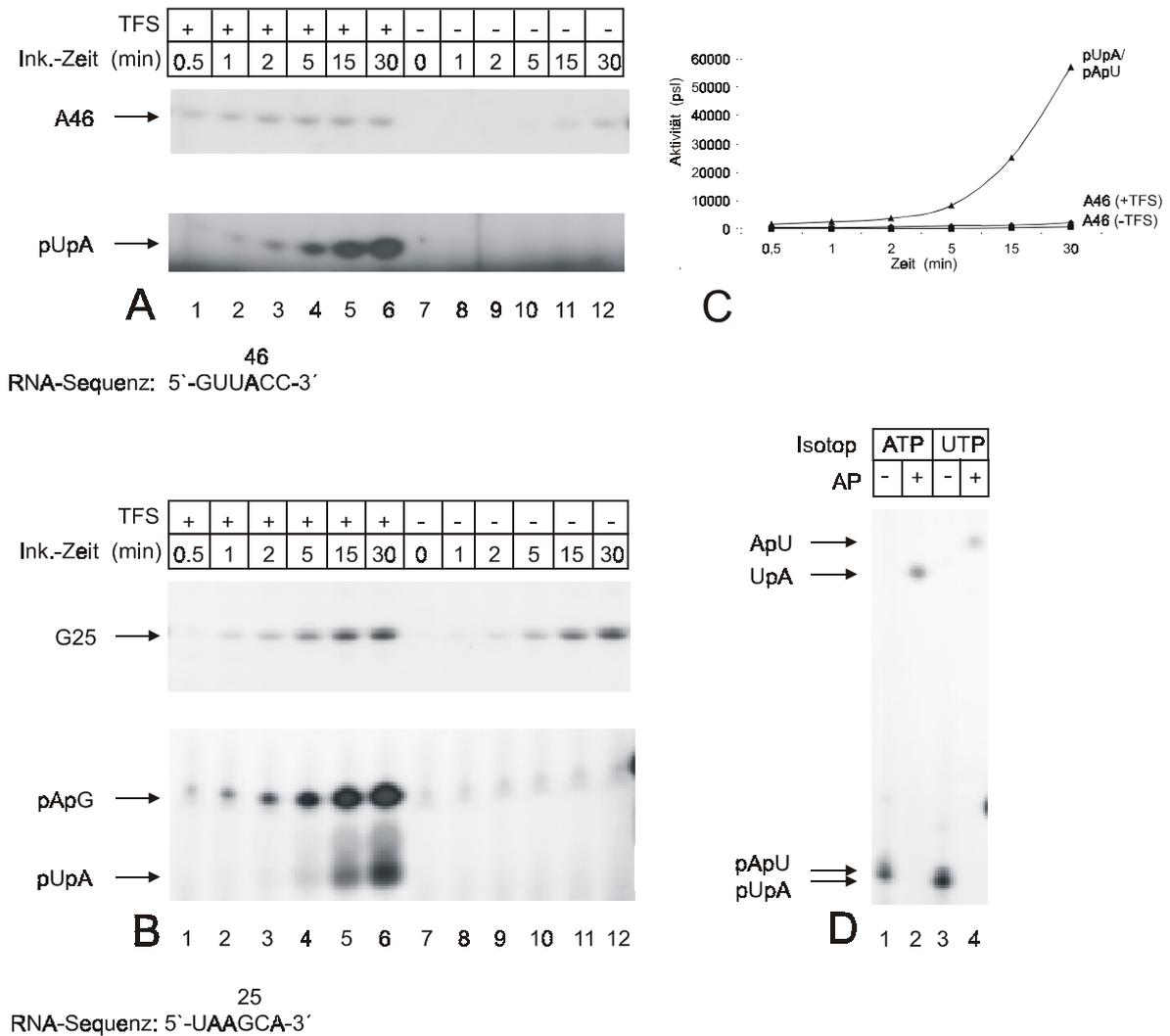


Abb. 23: Ein Hydrolyse-Resynthese-Mechanismus wird durch TFS in der pausierten RNAP aktiviert. A und B. Es wurden reife und frühe Komplexe pausiert und isoliert (II 6.1). Anschließend erfolgte die Zugabe von 20 µM GTP, ATP und 2 µM UTP (A), 20 µM GTP, UTP und 2 µM ATP (B) zusammen mit oder ohne 200 ng TFS und einer 2minütigen Inkubation bei 55 °C. Danach wurde radioaktives UTP (A) oder ATP (B) zugegeben und für die angegebenen Zeiten inkubiert. C. Ein Plot der quantifizierten Daten aus A diente der Ermittlung der Hydrolyse-Induktionsrate; psl = Menge an Radioaktivität. D. Verifizierung von Dinukleotiden, die am reifen Elongationskomplex nach 15 min Hydrolyse-Resynthese entstanden. Spuren 1 und 2 = ATP-Markierung, Spuren 3 und 4 = UTP-Markierung; AP = alkalische Phosphatase. Die Analyse erfolgte auf 28%igen PA/Harnstoffgelen.

3. 2 TFS-induzierte Hydrolyse erfolgt auch in der abortiven Transkription

Der Prozess der RNA-Synthese beginnt immer mit einer abortiven Phase der Transkription. Hier erfolgt die irreversible Freisetzung großer Mengen an kurzer ~3 bis 12 B RNA, insbesondere abhängig von der DNA-Sequenz, (Holstege et al., 1997). In dieser Phase sind RNAP II-Komplexe nicht TFIIS-sensitiv. TFIIS ist erst

in der Lage eine RNA-Hydrolyse zu induzieren, wenn mehr als 12 Nukleotide RNA synthetisiert sind (Sijbrandi et al., 2002). Er benötigt für seine Funktion ein 8 bis 9 Bp-RNA-DNA-Hybrid (Keene & Luse, 1999) und potentiell ein freies 3'-Ende der RNA, wie aufgrund von UV-Crosslinking gezeigt wurde (Powell et al., 1996). Da bisher festgestellt werden konnte, daß die TFS-induzierten Ereignisse den TFIS-induzierten relativ ähnlich waren, war anzunehmen, daß auch TFS erst ab einer entsprechenden Länge der RNA-Kette in der Lage ist, die RNAP zu aktivieren. Abb. 24 zeigt jedoch, daß die *Methanococcus*-RNAP schon in abortiven U5-Komplexen TFS-sensitiv war, da Dinukleotide freigesetzt wurden. Es wurden Transkriptionskomplexe in der abortiven Phase der Transkription mit GpA, UTP und +/- GTP an Positionen +5 und +6 gehalten, da das an Position +7 notwendige ATP fehlte (Sequenz, links in Abb. 24). Die resultierenden 5 und 6 B RNA waren mit und ohne TFS ähnlich stark. Bei den Signalen handelte es sich größtenteils um freigesetzte abortive Transkriptionsprodukte. Betrachtet man den Dinukleotidbereich, so ist zu erkennen, daß in Anwesenheit des Faktors pUpG (+5/6) und pUpU (+ 3/4 und +4/5) entstanden, ohne den Faktor aber nicht. Ein Vergleich der Signalstärken mit denen in der produktiven Phase der Elongation (Abb. 23) macht aber deutlich, daß die Hydrolyse-Induktion in der abortiven Phase nicht so schnell zu erfolgen scheint wie die Freisetzung der RNA. Ein Vergleich der Signalstärken zeigte, daß die Freisetzung von kurzer RNA schneller erfolgte, als die Hydrolyse-Induktion (z. B., Spur 10, Verhältnis pUpU zu abortive 5 B RNA nach 10 min = ~1 : 20; Spur 4, Verhältnis pUpG zu abortive 6 B RNA = ~1 : 8).

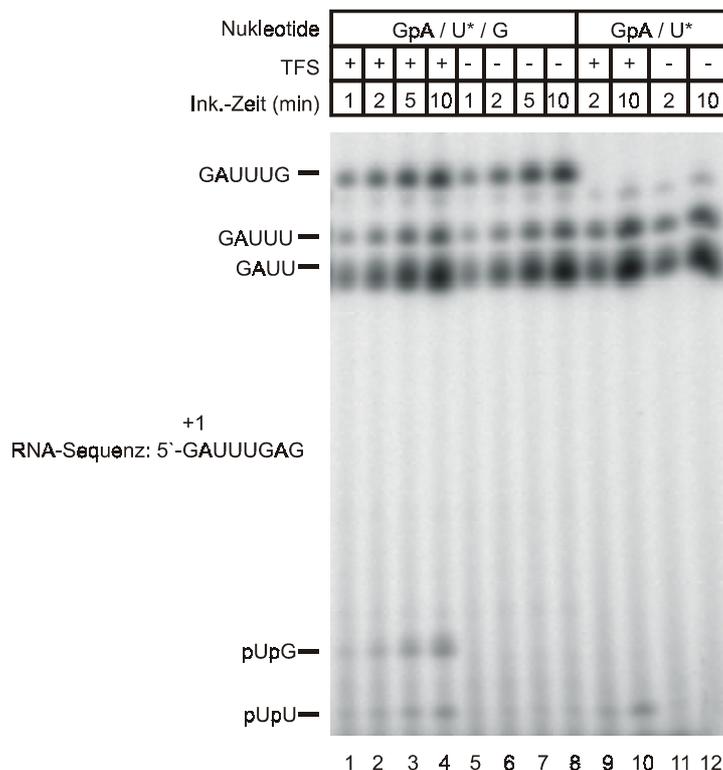


Abb. 24: Die TFS-abhängige Hydrolyse-Induktion erfolgt auch in der abortiven Phase der Transkription. Initiationskomplexe wurden mit 80 μ M GpA, 2 μ M [α - 32 P]UTP (370 Bq/pmol) +/- 4 μ M GTP für die angegebenen Zeiten inkubiert. Die resultierenden Produkte waren RNA von Position +4 (Spuren 9 bis 12) bis +6 (Spuren 1 bis 8). Im Verlauf der maximal 10 min Inkubation entstanden in Anwesenheit von TFS (Spuren 1 bis 4, 9 und 10) zusätzliche Signale im Dinukleotidbereich (pUpU und pUpG). Die RNA-Sequenz ist links gezeigt. Der Gellauf erfolgte auf einem 28%igen PA/Harnstoffgel.

Die Mechanismen der Hydrolyse-Induktion durch TFIIS und TFS unterscheiden sich also grundlegend dadurch, daß TFS schon in der abortiven Phase der Transkription an Position +5 in der Lage ist, die intrinsische Nuklease-Aktivität der RNAP zu stimulieren. Somit ist sicher, daß für die TFS-induzierte Hydrolyse in der abortiven Phase (i) kein „vollständiges“ RNA-DNA-Hybrid benötigt wird, (ii) eine Hydrolyse-Induktion weit vor Position +12 erfolgt und (iii) dafür wahrscheinlich kein RNA-Kontakt nötig ist.

Ob dies jedoch bei der Aktivierung der Nuklease-Aktivität in den anderen Phasen der Elongation der Fall ist oder dort ein RNA-Kontakt erfolgt, kann hiermit nicht abschließend gesagt werden.

4 TFS ist der erste archaelle Proofreadingfaktor

Es konnte gezeigt werden, daß der Elongationsfaktor TFS in der Lage ist, die intrinsische Hydrolyse-Aktivität der RNAP verbunden mit einem Hydrolyse-Resynthese-Mechanismus zu aktivieren. Der Motor für diese Aktivierung ist das Pausieren der Elongation. Bei der biochemischen Charakterisierung von TFS als Elongationsfaktor konnte bewiesen werden, daß der Faktor arretierten Komplexen die Fortsetzung der RNA-Synthese ermöglicht.

Bei den Bacteria arretieren Elongationskomplexe unter anderem durch den Falscheinbau von Nukleotiden. Sie können von Gre-Faktoren reaktiviert werden (Erie et al., 1993). Im eukaryellen System wird durch den Falscheinbau von Nukleotiden die Elongationsrate verlangsamt (Thomas et al., 1998). Durch diese Verlangsamung wird es der RNAP II ermöglicht, vermittelt durch TFIIS, den Falscheinbau zu beheben. Ob im Verlauf der Elongation bei *Methanococcus* auch ein Falscheinbau von Nukleotiden erfolgt, was die Konsequenzen sind und welche Rolle TFS hierbei spielt, wird im folgenden beantwortet.

4.1 *Mc. thermolithotrophicus*-RNAP baut falsche Nukleotide in die RNA-Kette ein

Die isolierte RNAP II besitzt eine relativ hohe Falscheinbaurate von $\sim 1:10^3$ bis 10^5 (Uptain et al., 1997). Aufgrund der hohen Homologie zwischen den RNAP bei Eukarya und Archaea (Cramer, 2002; Werner et al., 2002) ist davon auszugehen, daß auch *Mc. thermolithotrophicus*-RNAP im Verlauf der Transkription falsche

Nukleotide einbaut. Um diese Annahme zu bestätigen, wurden isolierte A46-Komplexe mit steigenden Konzentrationen an „falschen“ Einzelnukleotiden (ATP, GTP oder UTP anstelle von CTP) für 5 min bei 55 °C inkubiert. Abbildung 25 zeigt das Ergebnis.

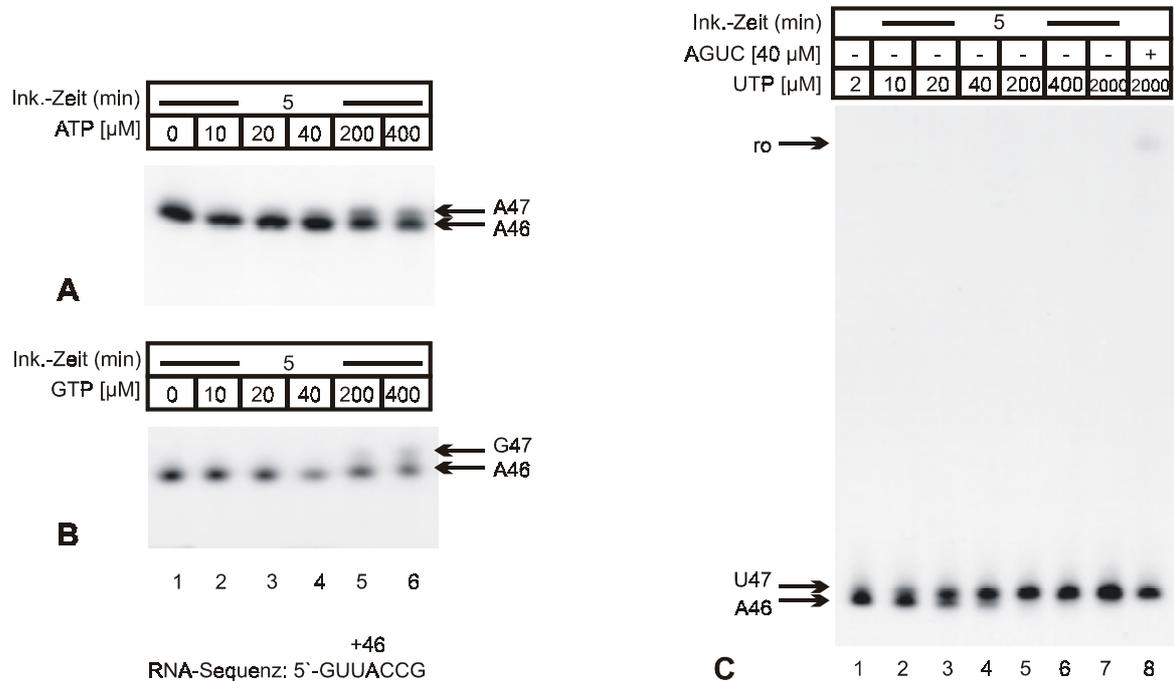


Abb. 25: Falscheinbau von Nucleotiden in die RNA an C47 geschieht in Abhängigkeit vom Substrat und seiner Konzentration. Isolierte A46-Komplexe wurden für 5 min bei 55 °C mit steigenden Mengen an ATP (A), GTP (B) oder UTP (C) inkubiert. Im Anschluß an die Inkubation mit 2 mM UTP (C, Spur 7) erfolgte eine 5minütige „run off“-Transkription, um festzustellen, ob U47-Komplexe ein entsprechendes Produkt erzeugen (Spur 8). Die RNA-Sequenz von Position +43 bis +49 ist unten links gezeigt. Die Analyse erfolgte auf 15%igen PA/Harnstoffgelen.

Es ist zu erkennen, daß die an A46 pausierende RNAP Falscheinbau an C47 durchführte. Wurden isolierte Komplexe mit Einzelnucleotiden inkubiert, war zu erkennen, daß die Purine ATP und GTP sehr schlecht anstelle des Pyrimidins CTP an Position +47 eingebaut wurden und A47- bzw. G47-Komplexe erzeugten (A und B). Dieses geschah zu einem sehr geringen Teil erst ab Nucleotidkonzentrationen von 200 bis 400 μ M (A und B, Spuren 5 und 6). Bei dem Einsatz des Pyrimidins UTP als Substrat erfolgte Falscheinbau schon bei einer Konzentration von 2 bis 10 μ M (C, Spuren 1 und 2), so daß U47-Komplexe resultierten. Versuchte man die Komplexe mit Falscheinbau zu verlängern (C, Spur 8) so zeigte sich, daß sie nicht mehr in der Lage waren, ein „run off“-Transkript zu produzieren. Die Komplexe waren durch den Falscheinbau arretiert, was bedeutet, daß sie ohne Hilfe nicht in der Lage sind, die Transkription wieder aufzunehmen.

Nicht nur das Substrat und dessen Konzentration sind ausschlaggebende Faktoren für Falscheinbau, ganz entscheidende Komponenten sind auch die Temperatur und die Zeit. Inkubierte man A46-Komplexe mit 2 mM UTP (Abb. 26), erfolgte ein UMP-Einbau auf U47, abhängig von der Inkubationsdauer und der Temperatur. Waren bei 55 °C und 2 min Inkubation nahezu alle Komplexe an U47 (Spur 8), so verblieb selbst nach 5minütiger Inkubation bei 30 °C der Großteil an A46 (Spur 4 und „run off“-Transkription in Spur 5).

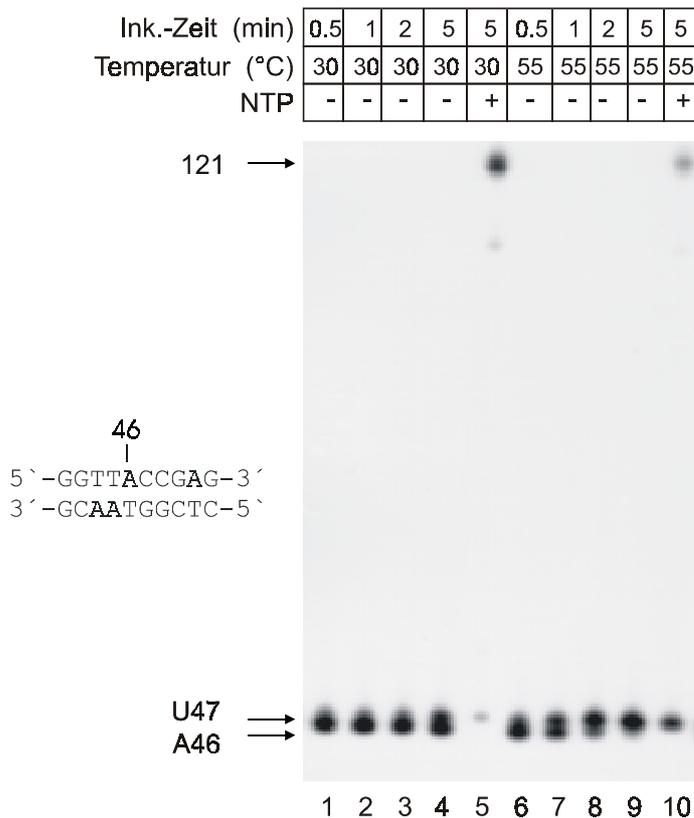


Abb. 26: Steigende Temperaturen verstärken den Falscheinbau von UMP. Isolierte A46-Komplexe wurden mit 2 mM UTP bei 30 °C oder 55 °C für die angegebenen Zeiten inkubiert. Anschließend an die maximal 5 min Inkubation (Spuren 4 und 9) erfolgte eine 5minütige „run off“-Transkription, welche die arretierten Komplexe sichtbar machte (Spuren 5 und 10). Die DNA-Sequenz von Position +42 bis +51 ist links zu sehen. Die Analyse erfolgte auf einem 15%igen PA/Harnstoffgel.

Unabhängig von den gegebenen Bedingungen bleibt festzuhalten, daß Komplexe nach Falscheinbau arretierten (Spur 5, „run off“ bei 30 °C). Da, wie gezeigt wurde, TFS in der Lage ist, arretierten Komplexen eine Fortsetzung der Transkription zu ermöglichen (III 1.3), wurden die Effekte von TFS bei nach Falscheinbau arretierten RNAP untersucht.

4. 2 TFS reaktiviert durch Falscheinbau arretrierte Komplexe und entfernt dabei das falsche Nukleotid

Bei der Identifizierung von TFS als archaeeleler Elongationsfaktor konnte gezeigt werden, daß TFS in der Lage ist, geringen Mengen an arretrierten Komplexen eine Fortsetzung der Transkription zu ermöglichen (III. 1.3).

Um zu klären, ob und wie TFS nach Falscheinbau arretrierte Komplexe reaktiviert, wurde eine gemischte Population an Elongationskomplexen erzeugt (Abb. 27 A, Spur 1). Es waren sowohl Transkriptions-kompetente (A46) als auch arretrierte (U47) Komplexe vorhanden. Nach einer NTP-Zugabe waren nur die A46-Komplexe in der Lage, ein „run off“-Transkript zu synthetisieren (Spur 2). Isolierte man die arretrierte Komplexe und inkubierte sie in Anwesenheit von UTP und TFS, war festzustellen, daß sie auf U45 zurückliefen, nachdem ein Dinukleotid (pApU) von +46/47 hydrolysiert wurde (Abb. 27 B). Nach Zugabe aller vier Nukleotide ist zu erkennen, daß diese reaktivierten Komplexe ein „run off“-Transkript erzeugten (Spur 4).

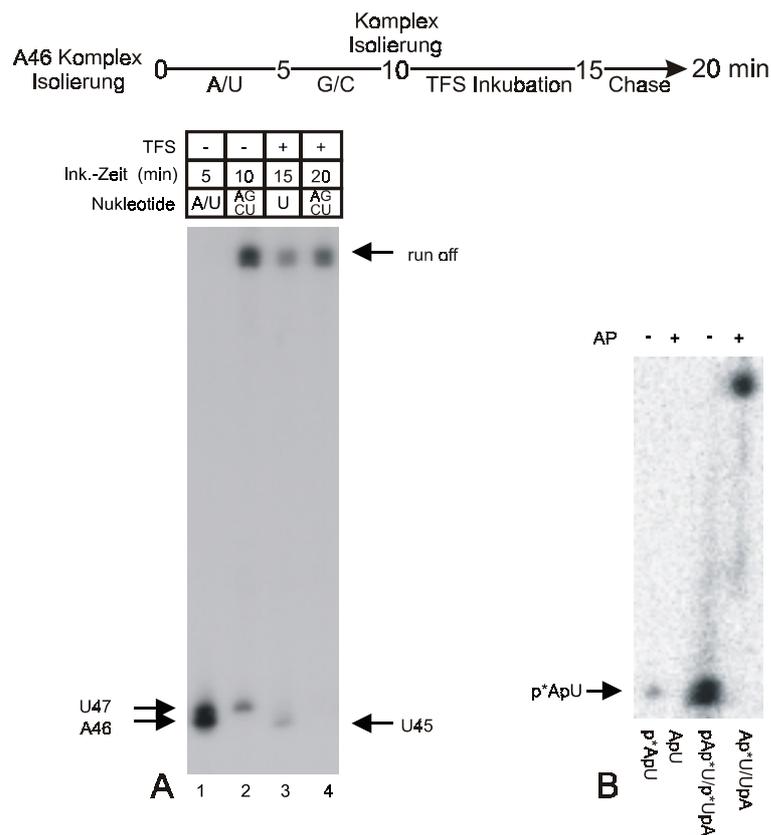


Abb. 27: TFS reaktiviert arretrierte U47-Komplexe und entfernt dabei falsch eingebaute Nukleotide. A, isolierte, markierte A46-Komplexe wurden mit 20 μ M UTP und ATP für 5 min bei 55 $^{\circ}$ C inkubiert (Spur 1). Eine anschließende 5 min Verlängerung zeigte die an U47 verbliebenen arretrierte Komplexe (Spur 2). Die U47-Komplexe wurden isoliert und anschließend mit TFS (+ 20 μ M UTP) reaktiviert (Spur 3). Nach Zugabe aller Nukleotide (je 20 μ M) wurde ein „run off“-Transkript synthetisiert (Spur 4). B, ein endmarkierter A46-Komplex wurde mit UTP auf U47 gestellt, isoliert und anschließend mit TFS inkubiert. Die Verifizierung des bei der Reaktivierung entstehenden Dinukleotids (Spur 1, p*ApU, * = radioaktives Phosphat) erfolgte mit dem Einsatz eines p*ApU/pUp*A-Dinukleotidstandards (s. II 6.2) und anschließender Inkubation mit 50 U alkalischer Phosphatase (AP) für 15 min bei 37 $^{\circ}$ C. Ein Versuchsverlaufsschema (oben) veranschaulicht die Durchführung. Die Analyse erfolgte auf 15- und 28%igen PA/Harnstoffgelen.

Die Verifizierung des entstehenden Dinukleotids mit Hilfe eines Standards und dem Einsatz alkalischer Phosphatase ergab, daß es sich um pApU von +46/47 handelte (Abb. 27 B), da nach alkalischer Phosphatase-Behandlung ($p^*ApU \rightarrow p^* + ApU$) das Signal nicht mehr zu erkennen war. TFS ist also in der Lage, einen nach Falscheinbau arretierten Komplex durch die Hydrolyse eines Dinukleotids zu reaktivieren und dadurch ein falsch eingebautes Nukleotid zu entfernen. Wenn anschließend eine Fortsetzung der Transkription erfolgt und hierbei ein CMP an Position +47 inkorporiert wird, ist die Genauigkeit der Transkription TFS-vermittelt erhöht.

4.3 Durch Falscheinbau arretierte Komplexe verlieren nicht den Kontakt zum 3'-Ende der RNA im katalytischen Zentrum der RNAP

Es ist bekannt, daß in eukaryellen und bakteriellen arretierten RNAP das 3'-Ende der RNA aus dem katalytischen Zentrum gelangt, da die RNAP auf der DNA zurückgleitet (sogenanntes „backtracking“). Eine Faktor-vermittelte Reaktivierung hat, abhängig von der Dimension des Zurückgleitens, die Freisetzung längerer Nukleotide (~7 bis 17 B) zur Folge. Nach der Hydrolyse ist das 3'-Ende der RNA wieder im katalytischen Zentrum positioniert (zusammengefaßt in Fish & Kane, 2002).

Im Verlauf der TFS-vermittelten Reaktivierung arretierter U47-Komplexe kam es zur Freisetzung eines Dinukleotids. Es waren keine längeren Hydrolyse-Produkte zu erkennen. Ob ein Arrest der *Mc. thermolithotrophicus*-RNAP dennoch verbunden mit einem Zurückgleiten der RNAP und dem Verlust des 3'-Endes der RNA aus dem aktiven Zentrum erfolgt, wurde mit RNase-Schutzexperimenten untersucht.

Abb. 28 zeigt ein RNase A-Schutzexperiment mit einem isolierten A46-Ausgangskomplex, einem arretierten U47- sowie einem Transkriptionskompetenten C48-Komplex. Die geschützten RNA-Bereiche veränderten sich zusammen mit den eingebauten Nukleotiden nur um 1-2 Positionen (Spuren 4 bis 6, 10 bis 12 B und 20 bis 22 B). Wenn ein Zurückgleiten oder der Verlust des 3'-Endes der RNA aus dem aktiven Zentrum der RNAP geschehen wäre, so hätte sich ein erweitertes Schutz-Muster am U47-Komplex ergeben. Es wird also deutlich, daß der arretierte Komplex ein Schutzmuster aufweist, welches nicht darauf hindeutet, daß das 3'-Ende der RNA aus dem aktiven Zentrum gelangt war.

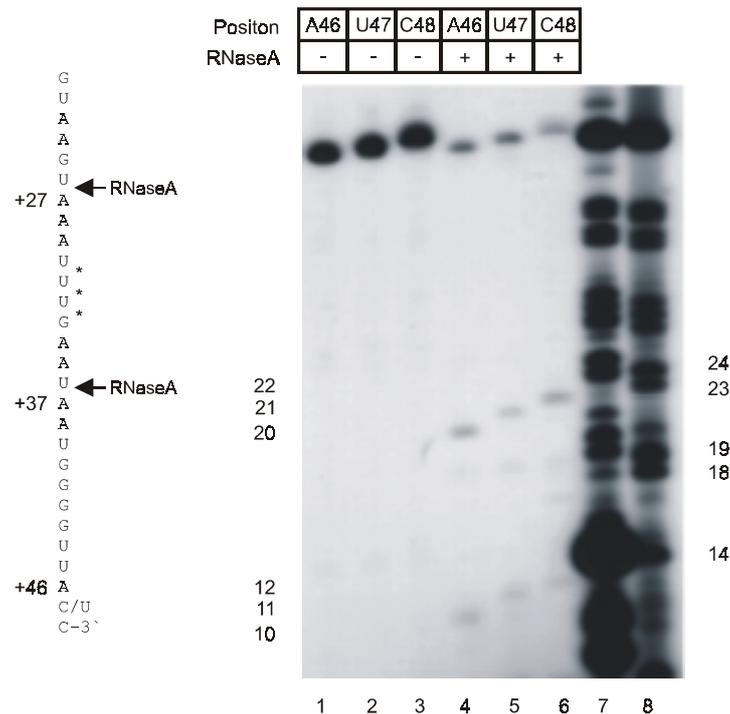


Abb. 28: RNase A-Footprints von pausierten und arretierten Elongationskomplexen zeigen ähnliche Muster. Isolierte U-markierte A46-Komplexe wurden aufgeteilt und mit unterschiedlichen Einzelnukleotiden inkubiert. A46-Komplexe (Spur 1) wurden mit 20 μ M ATP und 2 μ M UTP vor RNaseA-Zugabe inkubiert. U47-Komplexe (Spur 2) wurden mit 200 μ M UTP und 5 min Inkubation generiert. C48-Komplexe (Spur 3) resultierten aus 2 μ M CTP Zugabe, gefolgt von 30 sec Transkription bei 55 $^{\circ}$ C. Diese Komplexe wurden für 2 min bei 37 $^{\circ}$ C mit 0,5 μ g/ml RNaseA hydrolysiert (gefolgt von mehrfacher Phenol Extraktion). Zwei vor RNase A geschützte Bereiche waren zu erkennen (Spuren 5 bis 7). Links ist ein Abschnitt der RNA dargestellt. Die Pfeile zeigen die RNase A-Spaltstellen. Der * zeigt Bereiche der RNA, die nicht hydrolysiert wurden. Diese 3xU-Region wurde entweder von der RNase schlecht erkannt, weil sie zum Teil mit As dimerisierte oder der Bereich wurde von der RNAP geschützt. Als RNA-Längenstandard (Spuren 7 und 8) diente eine 3'-dATP (Cordycepin) RNA-Leiter (Spur 7, mit GpA als Startnukleotid, s. II 6.3). Die Analyse erfolgte auf einem 15%igen PA/Harnstoffgel.

Auch RNase T1-Schutzexperimente zeigten ein Ergebnis mit fortlaufend geschützten RNA-Bereichen (Daten nicht gezeigt). Erst an Position \sim +50 veränderte sich der zunehmende geschützte Bereich, da zuvor von der RNAP geschützte U- bzw. G-Positionen zugänglich wurden (Daten nicht gezeigt). Eine durch Falscheinbau arretierte *Methanococcus*-RNAP zeigt also ein anderes Verhalten, als eukaryelle und bakterielle arretierte Komplexe, bei denen ein Zurückgleiten und ein Verlust des 3'-Endes der RNA aus dem aktiven Zentrum erfolgen. Dafür spricht auch, daß die bisher resultierenden TFS-induzierten Hydrolyseprodukte ausnahmslos Dinukleotide waren.

4.4 Der Falscheinbau von UMP anstelle von CMP erfolgt langsamer

Bei der Reaktivierung der arretierten U47-Komplexe erfolgte das Proofreading nach dem Falscheinbauereignis. Es ist bekannt, daß die Verlangsamung des Einbaus, des nach Falscheinbau folgenden Nukleotids, ausschlaggebend für eukaryelles TFIIS-abhängiges Proofreading ist (Thomas et al., 1998). Um zu überprüfen, ob ein Falscheinbau von UMP langsamer stattfindet als der Einbau von CMP, wurden die Einbauraten von UMP und CMP an Position +47 ermittelt. Zur Vergleichbarkeit der Einbaugeschwindigkeiten, wurde die Ermittlung der Einbauraten bei 30 °C durchgeführt. Bei 55 °C verlief der CMP-Einbau zu schnell. Abb. 29 A zeigt, daß CMP schon nach 5 sec nahezu quantitativ von der RNAP eingebaut wurde (Spur 3). Da an Position +47 und +48 jeweils ein CMP inkorporiert wurde (s. Sequenz in Abb. 28), war demzufolge der Einbau des ersten CMP schon nach ca. ~2,5 sec erfolgt. Betrachtet man dagegen die Geschwindigkeit des UMP-Einbaus bei 30 °C, war zu erkennen, daß für einen quantitativen Einbau dieses Nukleotids ~15 bis 20 min benötigt wurden. Die Einbaugeschwindigkeit von UMP war somit etwa 350 bis 500 mal langsamer als die von CMP.

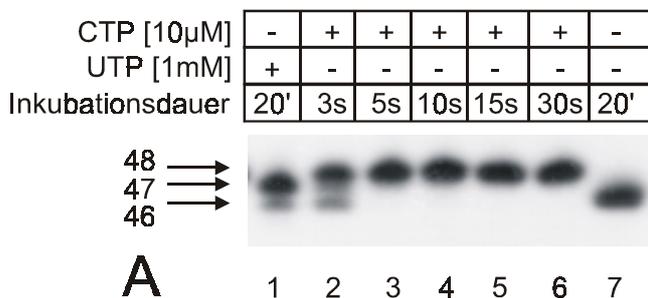
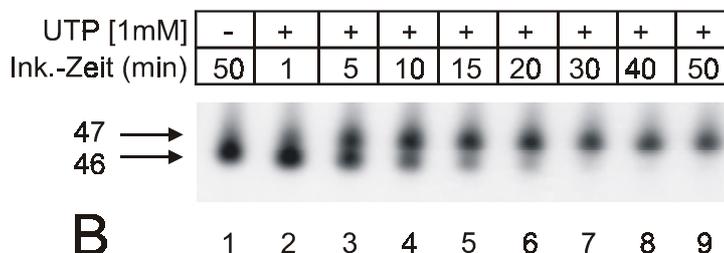


Abb. 29: Der Falscheinbau von UMP erfolgt langsamer als der Einbau von CMP. Isolierte A46-Komplexe wurden mit 10 µM CTP (A) oder 1 mM UTP (B) für die angegebenen Zeiten bei 30 °C inkubiert. Die Versuchsdurchführung erfolgte analog zu Abb. 26. Die Analyse erfolgte auf 15%igen PA/Harnstoffgelen.



Zur Ermittlung der K_M -Werte für den Einbau von CMP und UMP wurden entsprechende Zeitreihen mit unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Es

ergab sich für den CMP-Einbau ein K_M -Wert von $\sim 1,2 \mu\text{M}$ und für den Einbau von UMP ein Wert von $\sim 200 \mu\text{M}$. Diese Werte sind vergleichbar mit RNAP II-Einbauraten (Thomas et al., 1998). Hier wurde der K_M -Wert für GMP-Einbau mit $\sim 6 \mu\text{M}$ ermittelt. Es sollte somit möglich sein, TFS-induziert, Falscheinbau-Ereignisse zu minimieren.

4.5 TFS ist in der Lage, Falscheinbau zu unterbinden

Wie gezeigt wurde, erfolgt der Falscheinbau in Abhängigkeit von mehreren Faktoren. Wesentlich für TFS-Proofreading ist aber, daß die Einbauraten von UMP an Position +47 verlangsamt ist. Um zu zeigen, ob TFS in der Lage ist, mit Hilfe von Hydrolyse-Induktion einen Falscheinbau schon im Vorfeld zu unterbinden, wurden isolierte A46-Komplexe mit und ohne TFS mit steigenden Mengen UTP inkubiert (Abb. 30). Bei Betrachtung der Komplexe war ohne TFS das bekannte Ergebnis zu beobachten, mit steigenden UTP-Konzentrationen wurde zunehmend Falscheinbau auf U47 durchgeführt (A, Spuren 4 bis 6), und die Komplexe arretierten (A, Spuren 10 bis 12). In Anwesenheit von TFS verblieben jedoch nahezu alle Komplexe auf A46 (A, Spuren 1 bis 3) und waren in der Lage, ein „run off“-Transkript zu synthetisieren (A, Spuren 7 bis 9). Bei der Analyse der hierbei entstandenen Spaltprodukte (Abb. 30 B) war jedoch zu erkennen, daß auch hier mit steigenden UTP-Konzentrationen Falscheinbau stattfand. Die Ermittlung des prozentualen Verhältnisses der Hydrolyseprodukte vor Falscheinbau ($p\text{Up}^*\text{A}$) zu Hydrolyseprodukten nach Falscheinbau ($p^*\text{ApU}$) zeigte, mit steigenden Substratkonzentrationen, einen Wechsel im Hydrolysemuster. So erfolgte z. B. bei $200 \mu\text{M}$ UTP nur noch jede zweite Hydrolyse-Induktion vor Falscheinbau (s. B., $\% p\text{ApU}/p\text{UpA}$).

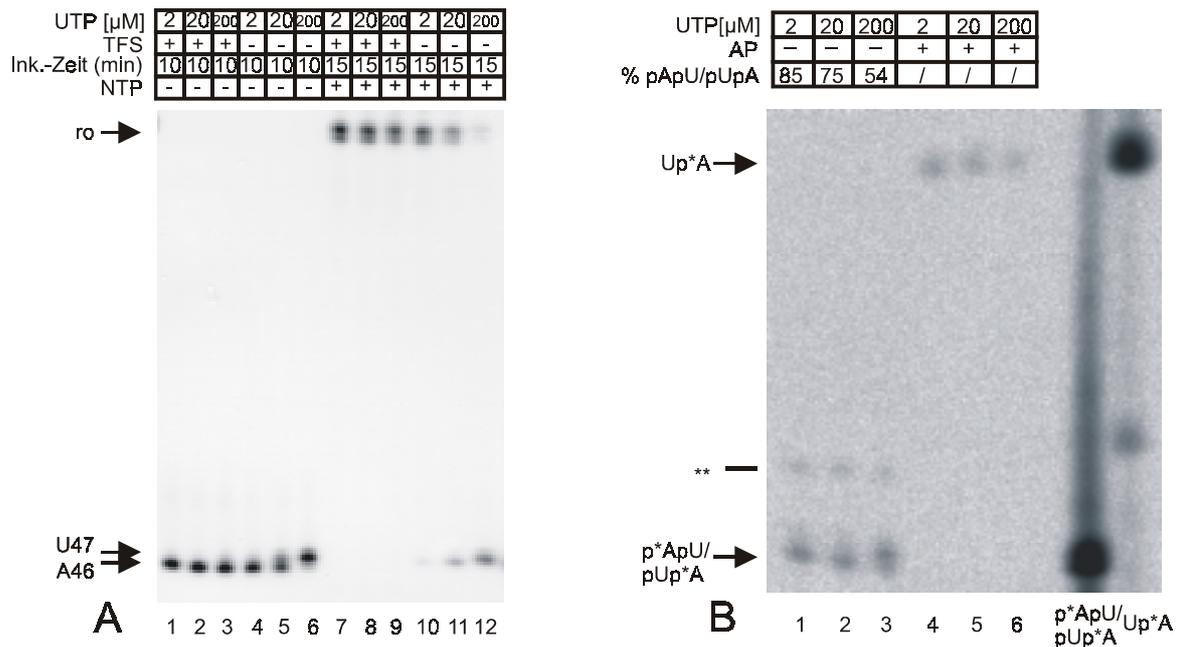


Abb. 30: TFS-induzierte RNA-Hydrolyse kann Falscheinbau verhindern. **A**, isolierte A-markierte Komplexe wurden mit 20 μ M ATP, GTP, mit und ohne TFS und steigenden Mengen an UTP bei 55 °C für 10 min inkubiert (Spuren 1 bis 6). Um arretierte Komplexe zu identifizieren, erfolgte anschließend eine 5minütige „run off“-Transkription (Spuren 7 bis 12). **B**, die Verifizierung der bei TFS-vermitteltem Proofreading entstehenden Dinukleotide (Spuren 1 bis 3) erfolgte mit AP (Spuren 4 bis 6). Ein Plot der Mengen an radioaktivem Signal vor AP-Zugabe zu Signal nach AP-Inkubation (%pUpA/pApU) zeigte das Verhältnis von Hydrolyse vor Falscheinbau (pUpA) zu Hydrolyse nach Falscheinbau (pApU). ** ist höchstwahrscheinlich pApG von Position +46/47 (s. Abb. 25). Die Analyse erfolgte auf 15- und 28%igen PA/Harnstoffgelen.

Vergleicht man abschließend die Gesamtmenge an entstandenen Dinukleotiden im Verlaufe steigender UTP-Konzentrationen, war keine signifikante Zunahme an Aktivität festzustellen (Gesamtaktivität p*ApU/pUp*A bei 2 μ M UTP ~1000 psl, bei 200 μ M UTP ~1070 psl). Der Motor für TFS-vermitteltes Proofreading ist somit wahrscheinlich das Pausieren und nicht das eigentliche Falscheinbauereignis. Zusammenfassend bleibt aber festzustellen, daß ein Falscheinbau von Nukleotiden durch TFS sowohl präinkorporativ verhindert werden kann als auch postinkorporativ sehr schnell behoben wird.

5 Kann eine archaeelle RNAP DNA-Bausteine als Substrat verwenden?

Polymerasen werden aufgrund ihrer Substratverwertung in verschiedene Klassen unterteilt (Cramer, 2002b). Die Substrate von RNAP sind dementsprechend Ribonukleotide. In einer Zelle stehen der RNAP jedoch auch noch andere Nucleinsäuren zur Verfügung. DNA-Bausteine sind ebenfalls in großen Mengen vorhanden und können potentiell ins katalytische Zentrum einer RNAP gelangen. Untersuchungen zur Substratspezifität von Polymerasen zeigen immer wieder Enzyme, die zusätzlich zum eigentlichen Substrat in der Lage sind, alternative Bausteine in die Nucleinsäurekette zu inkorporieren (Joyce, 1997).

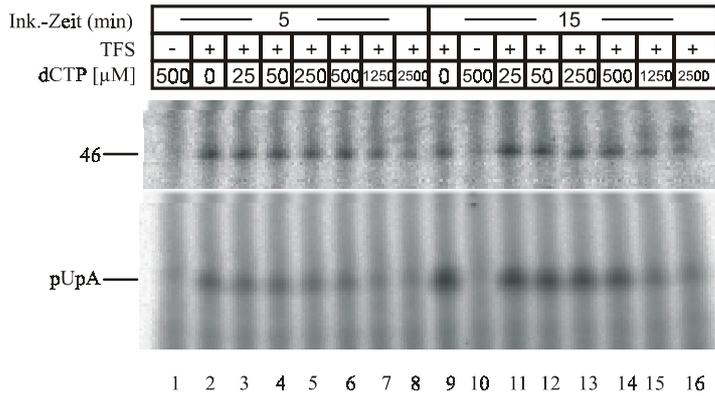
In diesem Abschnitt soll gezeigt werden, ob auch von der *Methanococcus*-RNAP DNA-Bausteine anstelle von RNA-Bausteinen in die RNA eingebaut werden können. Außerdem sollten mögliche Konsequenzen eines solchen Falscheinbaus untersucht werden.

5.1 Der Hydrolyse-Resynthese-Mechanismus hat ein verändertes Hydrolysemuster in Anwesenheit von dCTP

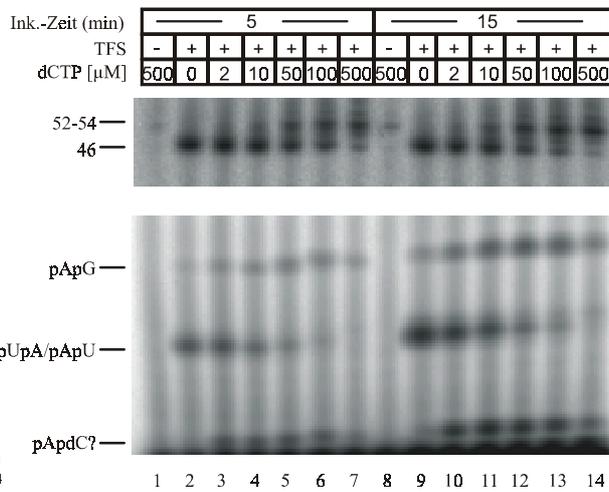
Zunächst sollte am Beispiel der Hydrolyse-Resynthese (III 3) gezeigt werden, ob DNA-Bausteine einen Einfluß auf Ereignisse im Verlauf der Elongation ausüben können.

Es wurde untersucht, ob Desoxynucleotide das Muster TFS-induzierter Hydrolyse-Resynthese an A46 (Abb. 23) verändern. Zunächst wurden unmarkierte, isolierte Komplexe zusammen mit ATP, GTP, radioaktivem UTP und zusätzlichem dCTP in steigenden Konzentrationen inkubiert. Abb. 31 A zeigt, daß ohne dCTP das pUpA-Dinucleotid von Position +45/46 entstand (Spuren 2 und 9; vergl. mit Abb. 23). Steigende dCTP-Konzentrationen führten jedoch zu einer Signalstärkeabnahme, sowohl bei der resultierenden Endmarkierung als auch im Dinucleotidbereich. Bei einer vergleichenden Betrachtung der resultierenden endmarkierten RNA nach 5 und 15minütiger Inkubation war des weiteren, insbesondere bei sehr hohen dCTP-Konzentrationen (Spuren 7, 8 und 15, 16), eine Veränderung im Laufverhalten offensichtlich.

Da die Versuchsbedingungen nur durch Zugabe von dCTP verändert wurden, ist zu vermuten, daß dCMP in die RNA eingebaut wurde und die Komplexe bei hohen dCTP-Konzentrationen und langen Inkubationsdauern, selbst in Anwesenheit von TFS, den Falscheinbau überlassen.



A



B

Abb. 31: TFS-induzierte Hydrolyse-Resynthese an A46 wird durch dCTP beeinflusst. A, ummarkierte A46-Komplexe wurden mit 20 μ M ATP, GTP, 2 μ M [α - 32 P]UTP (370 Bq/pmol), 200 ng TFS und steigenden Konzentrationen dCTP für 5 und 15 min bei 55 °C inkubiert. Ansätze ohne dCTP-Zugabe (Spuren 2 und 9) dienten als Kontrolle. **B** zeigt eine analoge Versuchsdurchführung unter Verwendung von 20 μ M UTP, GTP und 2 μ M [α - 32 P]ATP (370 Bq/pmol). Kontrollen wurden ohne dCTP- bzw. TFS-Zugabe durchgeführt (Spuren 2 und 9 bzw. 1 und 8). Die Analyse der Versuche erfolgte auf 28%igen PA/Harnstoffgelen und anschließender Auswertung auf einem Phosphoimager. Die Sequenz der DNA am codogenen Strang von Position +42 bis +56 ist gezeigt.

Betrachtet man die resultierenden Dinukleotide bei A-markierten Komplexen in Abb. 31 B, war außerdem festzustellen, daß sie heterogener wurden. Wenn der Komplex die C-Positionen mit dCMP besetzt hatte und bis Position \sim +52 oder +54 weiterlas, so resultierten im Verlaufe der Verlängerung der RNA folgende markierte Dinukleotide: pUpA von +45/46, pApdC von +46/47 und pApG von +50/51 (s. Sequenz in Abb. 31). Ein entsprechendes Dinukleotidmuster war im Verlauf der steigenden dCTP-Konzentrationen auch tatsächlich zu erkennen. Eine schwache Markierung entstand auch in den Kontrollansätzen ohne TFS durch das Überlesen der C-Positionen und Einbau von radioaktivem AMP an Position +50 (Spuren 1 und 8). Ob es sich tatsächlich um dCMP-Einbau handelte und nicht um mögliche Kontaminationen der verwendeten Nukleotide mit Spuren von CTP, erforderte einen eindeutigen Nachweis von dCMP-Einbau. Hierfür erfolgte der Einsatz zusätzlicher DNA-Matrizen, mit 1 bis 3 C-Positionen im Anschluß an A46 (s. II 5.1 und Sequenzen in den folgenden Abb.).

5.2 Verifizierung von in die RNA eingebautem dCMP

Bevor weitere Experimente mit dCMP als Substrat der RNAP und eine mögliche Funktion TFS-vermittelter Hydrolyse-Induktion erfolgen konnten, mußte bewiesen werden, daß es sich bei den Beobachtungen tatsächlich um in die RNA inkorporiertes dCMP handelt. Abb. 32 zeigt die indirekte Verifizierung des dCMP-Einbaus unter Einsatz von radioaktivem dCTP (A) und ATP (B). Bei der Inkubation von unmarkierten A46-Komplexen (A, markierte A46-Kontrolle in Spur 1) auf einer „2C-Matrize“ mit radioaktivem dCTP war der Einbau eines radioaktiven Nukleotids anhand einer starken Markierung an Position +47/48 zu erkennen (Spur 2). Eindeutige Hinweise darauf, daß es sich nicht um CMP-Kontaminationen handelte, zeigte, daß dieses Signal nach der Zugabe von TFS und einer 5minütigen Inkubation verschwand (Spur 4), ohne TFS jedoch nicht (Spur 3). Der Einbau von CMP würde viel schneller erfolgen als die Hydrolyse (s. Abschnitt III 4.4). Daher muß es sich bei der 3'-Endmarkierung der RNA um dCMP-Einbau gehandelt haben.

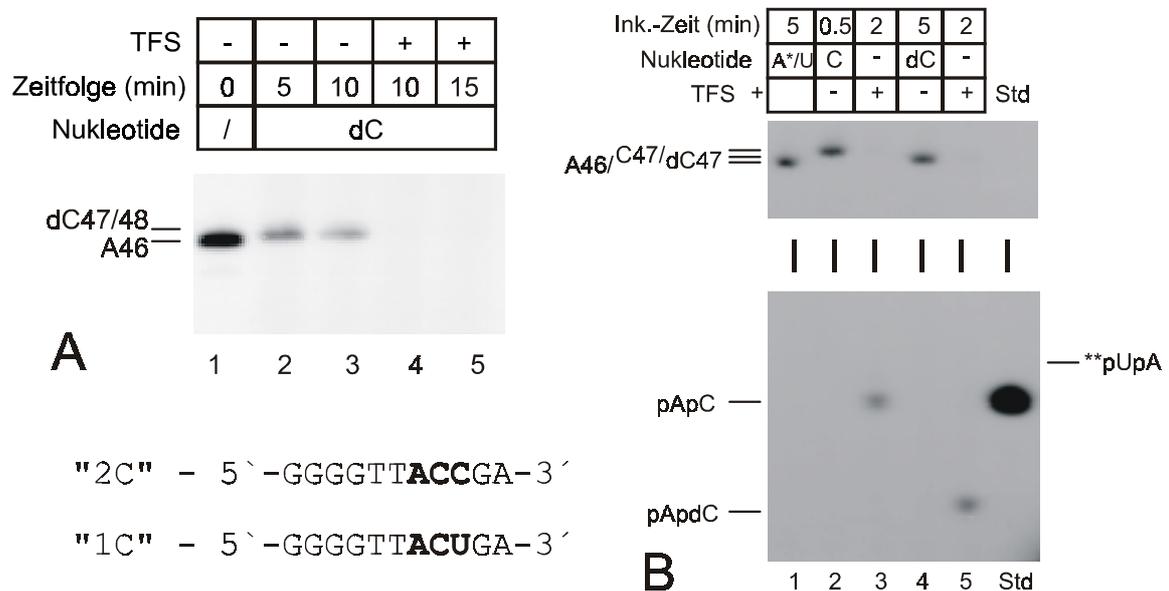


Abb. 32: Indirekter Nachweis von dCMP-Einbau durch *Methanococcus*-RNAP. **A**, isolierte, unmarkierte A46-Komplexe (Spur 1 zeigt einen Kontrollansatz mit markierter RNA) wurden mit 0,8 μM [α - ^{32}P]dCTP (370 Bq/pmol) auf einer "2C"-DNA-Matrize für 5 min bei 55 °C inkubiert. Die resultierenden dC-Komplexe (Spur 2) wurden für weitere 5 bis 10 min ohne und mit 100 ng TFS inkubiert (Spuren 3 bis 5). Die Analyse erfolgte auf einem 15%igen PA/Harnstoffgel. **B**, endmarkierte A46-Komplexe (Spur 1) auf einer DNA-Matrize mit einer folgenden C-Position ("1C") wurden für die angegebenen Zeiten entweder mit CTP (Spur 2) oder dCTP (Spur 3) inkubiert und anschließend mit TFS hydrolysiert (Spuren 3 und 5). Ein pApC Dinukleotidstandard (Std) diente zur Identifizierung der Hydrolyseprodukte. **pUpA zeigt das Laufverhalten von pUpA/pApU. Der Gellauf erfolgte auf einem 28%igen PA/Harnstoffgel. Die Sequenzen der "1C"- und "2C"-DNA-Matrizen von Position +40 bis +50 sind gezeigt.

Zweifelsfrei bestätigt wurde der dCMP-Einbau mit der Hydrolyse eines dC47-Komplexes auf einer DNA-Matrize mit nur einer C-Position nach A46 (s. Sequenz in Abb. 32). Ein endmarkierter A46-Komplex (B, Spur 1) wurde entweder mit CTP oder dCTP inkubiert (Spuren 2 und 4). Die resultierenden C47- und dC47-Komplexe wurden anschließend mit TFS hydrolysiert (Spuren 3 und 5). Beim C47-Komplex erfolgte die Hydrolyse eines pApC von Position +46/47 (Spur 3). Zur Verifizierung wurde ein pApC-Standard (Std) eingesetzt. pApC ist das am schnellsten in einem PA/Harnstoffgel migrierende AMP-beihaltende Dinukleotid. Die Laufgeschwindigkeiten dieser Dinukleotide sind, beginnend mit dem langsamsten: pApG > pApA > pApU > pApC (eigene Ergebnisse; Izbán & Luse, 1993; Bobkova et al., 1997). Das nach Hydrolyse entstandene Dinukleotid bei den dC47-Komplexen (Spur 5) läuft im Gel viel schneller als pApC. Somit zeigt das unterschiedliche Laufverhalten der resultierenden Dinukleotide, daß es sich nicht um CMP-Einbau durch Kontaminationen, sondern tatsächlich um dCMP-Einbau handelte, welches als Substrat der RNAP in die RNA eingebaut wurde.

5.3 Analysen der Auswirkungen von dCMP-Einbau auf die Elongation

5.3.1 dCMP-Falscheinbau führt nicht zum Arrest

Die Ergebnisse der Hydrolyse-Resynthese-Versuche mit dCTP deuten darauf hin, daß mögliche dC47- bzw. dC48-Komplexe nicht arretierten (Abb. 31). Abb. 33 verdeutlicht, daß die RNAP nach Falscheinbau von dCMP tatsächlich ein anderes Verhalten zeigte als nach UMP-Falscheinbau. Isolierte A46-Komplexe (Spur 1) wurden für 5 min mit UTP bzw. dCTP inkubiert (Spuren 2 und 7). Bei einer anschließenden CTP-Zugabe war kein Einbau von CMP zu erkennen (Spuren 3, 4, 8 und 9). Die dC-Komplexe hatten entweder zwei dCMP in Folge inkorporiert (aufgrund der Versuche in III 5.1 zu erwarten) oder aber waren nach Falscheinbau eines dCMP nicht in der Lage, das CMP als Substrat zu verwenden. Bei einer Zugabe von ATP, GTP, UTP und anschließendem TFS war jedoch ein unterschiedliches Verhalten von U- und dC-Komplexen offensichtlich (Spuren 5 und 10). Während der U-Komplex wieder auf A46 gestellt und somit der Falscheinbau behoben wurde, erfolgte beim dC-Komplex die Verlängerung der RNA (Spur 10, bis Position ~+52 oder +54). Wurden die Ansätze mit CTP komplettiert, war bei allen Komplexen die Verlängerung der RNA-Kette zu beobachten (Spuren 6 und 11). Das beweist zum einen, daß der Einbau von dCMP

keine arretierten Komplexe zur Folge hatte. Zum anderen war in Anwesenheit von TFS eine Verlängerung der RNA-Kette um mehr als 6 B über den dCMP-Falscheinbau hinaus nicht möglich (Spur 10).

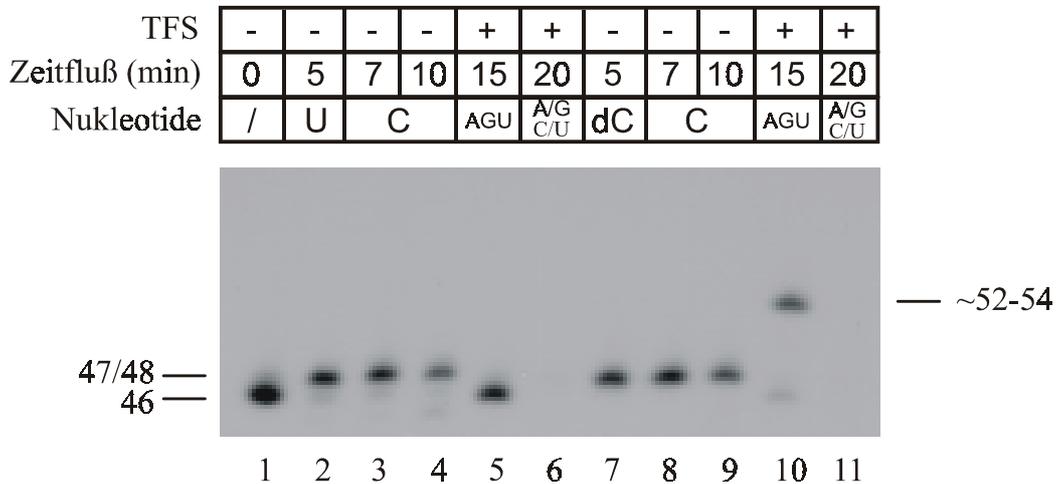


Abb. 33: dCMP-Einbau in die RNA führt nicht zum Arrest der RNAP. Markierte A46-Komplexe (Spur 1) wurden mit 200 μ M UTP oder dCTP (Spuren 2 und 7) zum Falscheinbau gezwungen. Die resultierenden Komplexe wurden anschließend mit 20 μ M CTP bei 55 °C inkubiert (Spuren 3, 4, 8 und 9). Nach einer erneuten Isolierung der Komplexe erfolgte die Zugabe von je 20 μ M ATP, GTP und UTP und 100 ng TFS zu den U47- (Spur 5) und den dC-Komplexen (Spur 10). Nach der Zugabe von zusätzlichen 20 μ M CTP erfolgte eine „run-off“ Transkription (Spuren 6 und 11). Die Analyse erfolgte auf einem 15%igen PA/Harnstoffgel.

5. 3. 2 Der dCMP-Einbau der RNAP von *Methanococcus* ist limitiert auf zwei dCMP in Folge

Bei der vergleichenden Analyse von U47- und dC47/48-Komplexen erfolgte der Einbau von 2 dCMP, gefolgt von einer Verlängerung der RNA. In Anwesenheit von TFS wurde um nicht mehr als 6 B RNA verlängert. Zur Untersuchung, ob die RNAP ohne TFS weiteres dCMP einbauen und somit dCMP als Ersatzbaustein anstelle von CMP verwenden kann, wurden drei DNA-Matrizen mit unterschiedlichen C-Folgen eingesetzt (Abb. 34 A, oben-„C-Positionen“ und 34 B, rechts).

Bei einer Transkription mit der Zugabe von CTP zu isolierten A46-Komplexen war zu erkennen, daß die Komplexe, abhängig von der C-Sequenz, die RNA-Kette von C47 bis C49 verlängerten (Abb. 34 A, Spuren 4 bis 6). Bei der Zugabe von dCTP zu den A46-Komplexen war, zumindest bei den Komplexen mit 2 und 3 C-Folgen, eine sichtbare Verlängerung der RNA zu beobachten (Spuren 8 und 9). Bei der Zugabe von ATP, GTP und UTP war zu erkennen, daß auch die Komplexe auf der

DNA mit nur einer C-Position diese auch mit dCMP besetzt hatten, dieses aber aufgrund des Laufverhaltens nach dC-Einbau (s. Abb. 32 B, Laufverhalten pApdC zu pApC) nicht zu erkennen war. Auffällig war, daß die Komplexe auf der DNA-Matrize mit 3 C-Positionen innerhalb der 5minütigen Inkubation größtenteils nicht über die dritte C-Stelle transkribieren konnten (Spur 12). Hierbei handelte es sich in keinem Fall um arretierte Komplexe, da sie nach Komplementation der Ansätze mit CTP (Spuren 13 bis 15) alle in der Lage waren, ein „run off“-Transkript zu erzeugen. Das deutet darauf hin, daß maximal 2 dCMP innerhalb des RNA-DNA-Hybrids in Folge toleriert werden. Des weiteren erfolgte auch ohne TFS nahezu keine Verlängerung der RNA von mehr als 6 B nach dCMP-Falscheinbau (Ausnahme, schwaches „run off“-Signal in Spur 10 auf der DNA mit nur einer C-Position an +47).

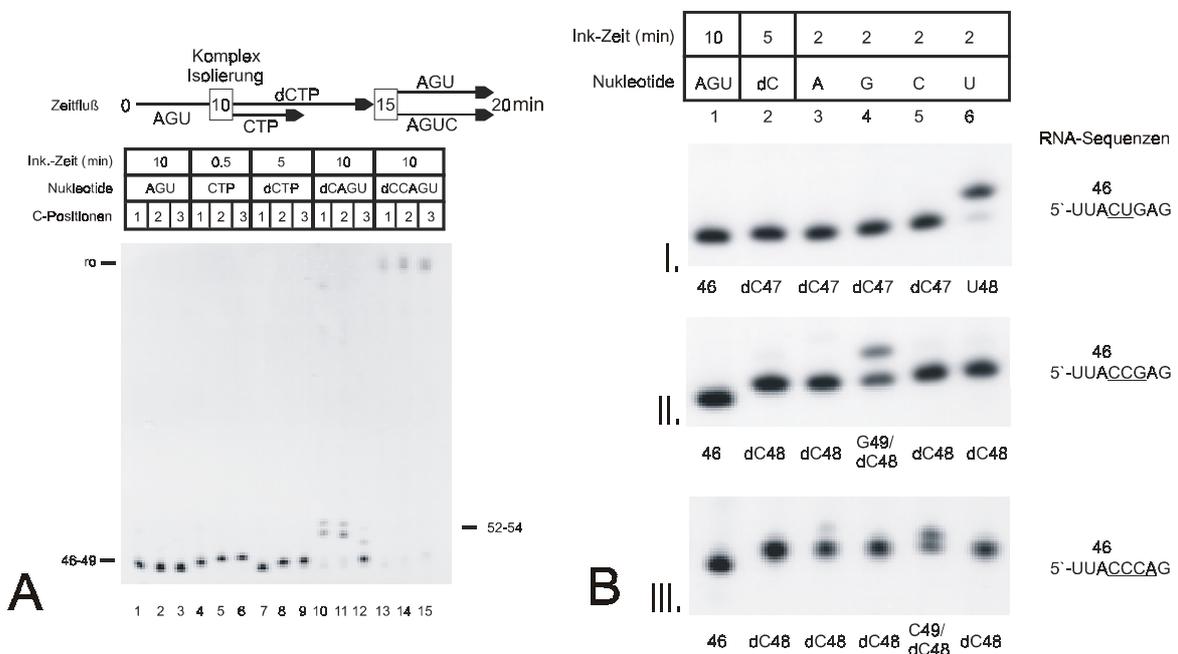


Abb. 34: Die RNAP von *Methanococcus* inkorporiert maximal 2 dCMP in Folge in die RNA-Kette. A, A46-Komplexe wurden auf DNA-Matrizen mit 1 bis 3 folgenden C-Positionen erzeugt (Spuren 1 bis 3). Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 µM CTP bzw. 200 µM dCTP und eine 30 bzw. 300 sec Inkubation bei 55 °C (Spuren 4 bis 6 und 7 bis 9). dC-Komplexe wurden daraufhin mit je 20 µM ATP, GTP und UTP (Spuren 10 bis 12) oder zusätzlichen 20 µM CTP (Spuren 13 bis 15) inkubiert. Ein schematischer Zeitfluß (oben) veranschaulicht den Versuchsablauf. **B,** A46-Komplexe wurden auf DNA-Matrizen mit 1C-(I), 2C-(II) und 3C-(III) Folgen auf dC47/48 gestellt und anschließend mit 20 µM ATP, GTP, CTP oder UTP für 2 min bei 55 °C inkubiert. Ein Ausschnitt der entsprechenden RNA-Sequenzen ist rechts gezeigt. Die Analysen erfolgten auf 15%igen PA/Harnstoffgelen.

Um die Beobachtung, daß maximal 2 dCMP in Folge inkorporiert werden können, zu verifizieren (Abb. 34 B), wurden isolierte A46-Komplexe auf den „1-3 C“-DNA-Matrizen (Spur 1) zunächst mit dCTP inkubiert (Spur 2). Die resultierenden dC-Komplexe wurden dann aufgeteilt und mit Einzelnukleotiden für zwei Minuten

verlängert. Es war zu erkennen, daß jeweils nur mit einem Nukleotid eine Verlängerung erfolgte. Entsprechend der DNA-Sequenz baute die RNAP nach Einbau von maximal zwei dCMP, entweder UMP (I, Spur 6), GMP (II, Spur 4) oder CMP (III, Spur 5, +sehr geringer Anteil an AMP in Spur 3), ein.

5.4 Die Verlängerungsrate nach dC-Falscheinbau ist verlangsamt

Betrachtet man noch einmal Abb. 34 B, so fällt auf, daß die Geschwindigkeit des Einbaus nachfolgender Nukleotide anscheinend davon abhängig ist, ob ein oder zwei dCMP in die RNA eingebaut sind. TFIIS-vermitteltes Proofreading erfolgt durch die Verlangsamung der Verlängerung nach Falscheinbau (Thomas et al., 1998). Um eine mögliche Rolle des TFS bei „Desoxynukleotid-Proofreading“ zu ermitteln, mußte bestimmt werden, ob die verzögerte Einbaurrate von Folgenukleotiden ausreichend für eine vorherige Hydrolyse-Induktion ist (Abb. 35). Es wurde untersucht, wie stark die Rate reduziert wird. Isolierte A46-Komplexe wurden bei 30 °C mit CTP oder dCTP inkubiert. Der Einbau von CMP war, wie bereits gezeigt, nach ~3 sec erfolgt. Die Verlängerung der C47- bzw. C48-RNA um ein Nukleotid geschah ebenso schnell (A und B, Spuren 1 bis 3). dC47- und dC48-Komplexe hatten dagegen eine herabgesetzte Verlängerungsgeschwindigkeit. Der Einbau von UMP bei dC47-Komplexen war um das ~15 bis 20fache verlangsamt, bei dC48-Komplexen sogar ungefähr um das ~60 bis 80fache.

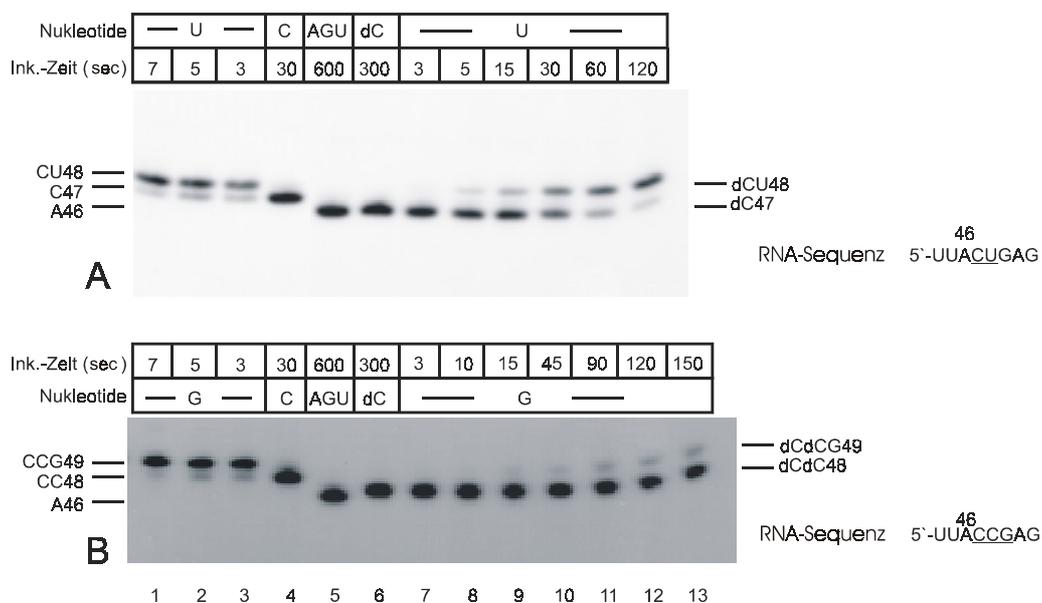


Abb. 35: Ermittlung der Verlangsamung der Transkription nach dCMP-Einbau. Isolierte A46-Komplexe wurden mit 200 μ M dCTP auf dC47 (A) oder dC48 (B) gestellt und anschließend für die angegebenen Zeiten mit 20 μ M UTP (A) oder GTP (B) bei 30 °C inkubiert. Die Spuren 1 bis 4 in A und B zeigen die Einbaugeschwindigkeiten für den CMP- und Folgenukleotid-Einbau zum Vergleich. Die RNA-Sequenzen sind rechts gezeigt. Die Analyse erfolgte auf 15%igen PA/Harnstoffgelen.

5. 4. 1 TFS ist in der Lage, das Überlesen von dCMP-Falscheinbau zu verringern

Zur Beantwortung der Frage, ob die ermittelte Verlangsamung der Transkriptionsgeschwindigkeit nach dC-Falscheinbau ausreicht, um TFS-vermitteltes Proofreading zu ermöglichen, wurden markierte isolierte Komplexe auf einer „2C“-DNA-Matrize mit ATP, GTP, UTP, dCTP, mit und ohne TFS inkubiert. Abb. 36 A zeigt, daß mit TFS wesentlich weniger Komplexe die C-Positionen überlesen und bis Position +52/54 verlängerten. Die Quantifizierung der Signale (A, oben) zeigte, daß die Komplexe in den ersten 2 min nahezu vollständig an A46 verblieben. Der Plot der quantifizierten Werte (Abb. 36 B) verdeutlichte, daß anhand der viel flacher abfallenden Kurve der an A46 verbleibenden Komplexe durch TFS-induzierte Hydrolyse-Resynthese weniger dCMP-Falscheinbau bzw. Verlängerung nach Falscheinbau erfolgte. So hatten z. B. nach 30 sec ohne TFS ~50 % der Komplexe bereits zwei dCMP inkorporiert und verlängert, wobei mit TFS noch mehr als 70 % an A46 verblieben waren. Betrachtet man die resultierenden Hydrolyseprodukte, ist zu erkennen, was beim TFS-vermittelten Proofreading passiert. Bis ~120 sec nach dCTP-Zugabe entstanden fast ausschließlich pUpA (+45/46) und pApdC (+46/47) als Hydrolyseprodukte, wobei der Anteil an pApdC höher war (~ 9fach höhere Aktivität in psl nach 60 bis 90 sec). Erst nach 120 sec waren zusätzliche pApG-Dinukleotide nach dem Überlesen der C-Positionen zu erkennen. Auch das bestätigt die Feststellung, daß TFS das DNA-Proofreading verbessert, wenn auch der Anteil an postinkorporativer RNA-Hydrolyse (pApdC) bei weitem überwiegt.

Gesamtaktivität der „run-off“-Transkripte mit CTP+dCTP festzustellen (bei 3 min um mehr als 10 %). Das deutet auf eine TFS-vermittelte Verbesserung der Genauigkeit der kontinuierlichen Transkription hin.

Auf eine Analyse möglicher entstehender Dinukleotide wurde verzichtet, da es nicht möglich war, den Versuchsrahmen mit radioaktiven Nukleotiden so zu gestalten, daß entstehende Dinukleotide zweifelsfrei nicht aufgrund mangelnder (radioaktiver) Nukleotidkonzentrationen entstanden.

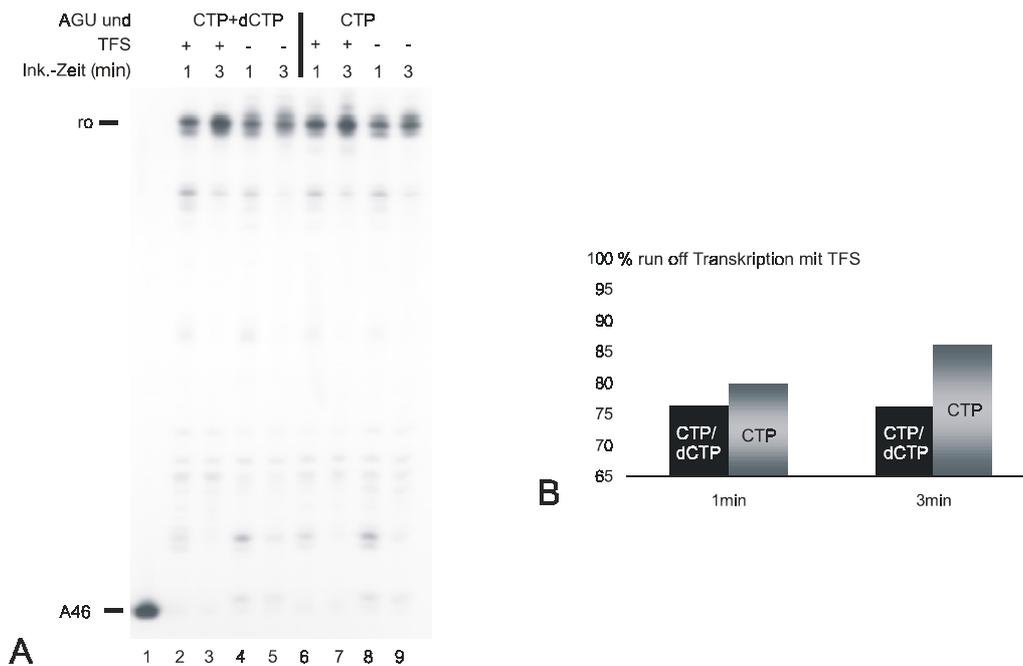


Abb. 37: TFS erhöht die Anzahl an „run off“-Transkripten der RNAP in Anwesenheit von CTP und dCTP. **A**, pausierte A46-Komplexe (Spur 1) wurden mit 40 μ M ATP, GTP, UTP, mit oder ohne TFS und 5 μ M CTP (Spuren 6 bis 9) oder 5 μ M CTP + 300 μ M dCTP (Spuren 2 bis 5) für 1 bis 3 min bei 55 °C inkubiert. Die Gesamtaktivität der einzelnen Spuren wurde quantifiziert, **B** zeigt die quantifizierten Daten von mehrfach reproduzierten Experimenten aus **A**. 100 % "run off" steht für das mit TFS resultierende "run off"-Transkript. Balken zeigen die entsprechenden Mengen an "run off"-Transkripten ohne TFS. Die Gelläufe erfolgten auf 15%igen PA/Harnstoffgelen.

Es bleibt also abschließend festzustellen, daß TFS-vermitteltes DNA-Proofreading, ähnlich dem des TFIIS-vermittelten RNA-Proofreadings, über eine Verlangsamung der Einbaurrate von Folgenukleotiden erfolgen kann. Im Vergleich zum RNA-Proofreading ist die Effizienz der Korrektur aber geringer.

6 Der Weg der RNA durch die RNAP – Interaktionen zwischen RNAP und RNA

Die Ausmaße geschützter RNA beim reifen *Mc. thermolithotrophicus*-Elongationskomplex umfassen einen Bereich von ~11 bis 21 Nukleotiden (Abb. 22), abhängig von der verwendeten RNase. In diesem Bereich kann die RNAP mit der RNA in direktem Kontakt stehen. Insbesondere die Interaktionen im aktiven Zentrum der RNAP, innerhalb des 8 bis 9 Bp RNA-DNA-Hybrids, sind von entscheidender Bedeutung für die Stabilität von ternären Komplexen (Kireeva et al., 2000; Sijbrandi et al., 2002). Aufgrund der hohen strukturellen Konservierung aller RNAP, insbesondere im aktiven Zentrum (Gnatt et al., 2002), ist anzunehmen, daß auch die RNA-Kontaktstellen der RNAP ähnlich sind. Bei der Hefe-RNAP II wurden die Kontaktstellen mittels RNA-Protein-Crosslinkings identifiziert (Gnatt et al., 2001). Es finden unterschiedlich starke Interaktionen der beiden großen Untereinheiten (RPB1 und RPB2) mit der RNA im RNA-DNA-Hybrid statt. Da bei *Methanococcus* die beiden großen Untereinheiten A und B geteilt sind, war nicht eindeutig, ob und wenn ja, welche Veränderungen bei den Interaktionen dadurch entstehen könnten. Um dieses herauszufinden, wurden mittels UV-Crosslinking die Kontakte zwischen RNAP-Untereinheiten und RNA innerhalb der ersten 7 Positionen des RNA-DNA-Hybrids in einem reifen Elongationskomplex ermittelt. Bei den folgenden Versuchen wurde anstelle der *Mc. thermolithotrophicus*-RNAP die von *Mc. jannaschii* verwendet. Da das Genom von *Mc. jannaschii* bereits seit 1996 bekannt ist (Bult et al., 1996), war eine Interpretation der Ergebnisse anhand von Sequenzvergleichen mit eukaryeller oder bakterieller RNAP möglich.

6.1 Im katalytischen Zentrum der RNAP von *Mc. jannaschii* bindet die A'-Untereinheit an das 3'-Ende der RNA

Zur Untersuchung von Interaktionen zwischen RNAP-Untereinheiten und RNA wurde das GTP-Analog 8-Azido-GTP (AzG) verwendet. Es bildet im reaktiven Zustand, d. h. nach UV-Licht-Induktion, eine kovalente Bindung mit Aminosäuren in direkter Umgebung aus (II 7). In Abb. 38 A ist die Aktivierung und die reaktive Gruppe von AzG noch einmal dargestellt. AzG ist chemisch inert (Azidform), erst bei der Aktivierung mit UV-Licht entsteht die hoch reaktive Nitrenform des Stickstoffs, die eine kovalente Bindung zwischen Nukleotid und einer beliebigen Aminosäure ausbildet.

Abbildung 38 A zeigt A46-Elongationskomplexe (Spur 1) die mit radioaktivem CTP und AzG auf Position AzG49 gestellt wurden (Spur 2). Im Gegensatz zu Komplexen, die ein UMP anstelle eines CMP eingebaut haben und dadurch arretierten (III 4.1), war zu erkennen, daß die Komplexe, die das Crosslinkingnukleotid AzG eingebaut hatten, nicht arretierten. Sie konnten alle die Transkription fortsetzen und ein „run-off“-Transkript erzeugen (Spur 3). Abb. 38 B zeigt, daß das 3'-Ende der RNA im aktiven Zentrum mit der A'-Untereinheit in Kontakt war (Spur 1). Sehr schwache Interaktionen bestanden auch mit der A''- und der B'-Untereinheit. Die A'-Untereinheit der *Mc. jannaschii*-RNAP hat ein ungefähres Molekulargewicht von 100 kDa. Der Vergleich des Gellaufverhaltens der gecrosslinkten Untereinheiten nach *Micrococcus*-Nuklease-Behandlung zeigt, daß die vor Hydrolyse geschützten Bereiche (~20 B RNA und 25 bis 30 Bp DNA entsprechen ~10 bis 15 kDa) das Laufverhalten leicht veränderten. Eine Kontrolle von nicht-gecrosslinkten Ansätzen und gecrosslinkten „run off“-Transkriptionen zeigte, daß die Signale spezifisch waren (Spuren 2 und 3).

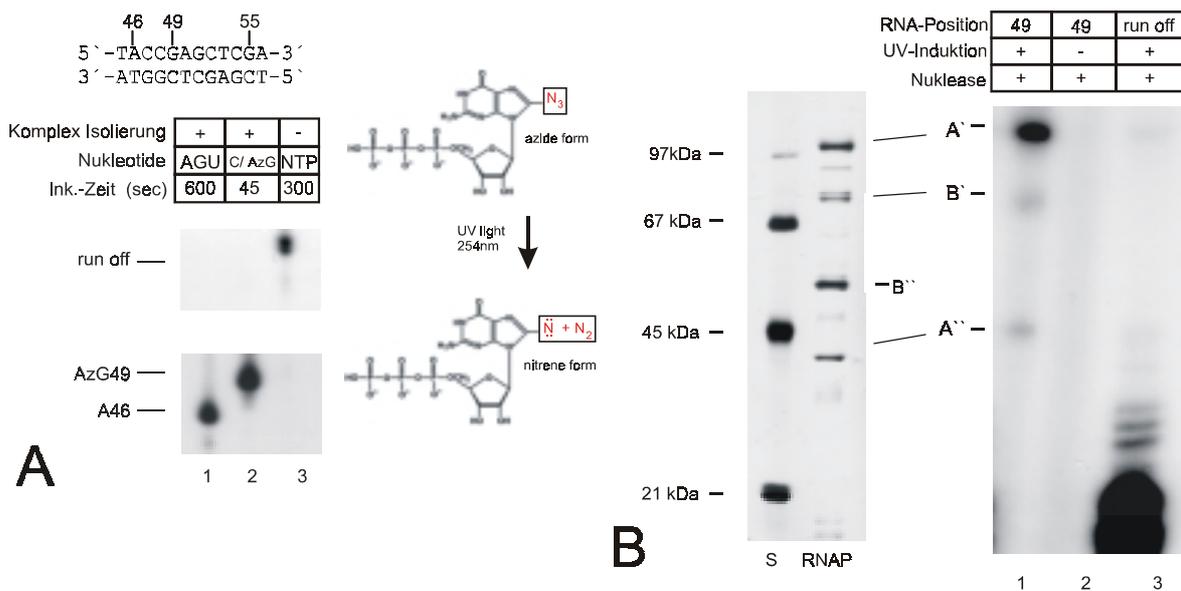


Abb. 38: Das 3'-Ende der RNA im aktiven Zentrum der RNAP interagiert mit der A'-Untereinheit. A, unmarkierte A46-Komplexe (Spur 1 = Kontrolle mit markierter RNA) wurden mit 0,8 μM [α - ^{32}P]CTP (370 Bq/pmol) und 10 μM 8-Azido-GTP für 45 sec bei 55 °C inkubiert. Die resultierenden AzG49-Komplexe (Spur 2) waren quantitativ in der Lage, die Transkription fortzusetzen und mit je 20 μM NTP „run off“-Transkripte zu synthetisieren (Spur 3). Rechts ist das 8-Azido-GTP mit reaktiver Gruppe und Aktivierung schematisch dargestellt. Die DNA-Sequenz von Position +45 bis +56 ist oben gezeigt. B, AzG49-Komplexe bildeten nach einer 1minütigen Aktivierung des Crosslinkingnukleotids bei 254 nm Wellenlänge eine kovalente Bindung mit Aminosäuren der A'-Untereinheit der RNAP (Spur 1). Um zu zeigen, daß die Interaktionen spezifisch waren, wurde ein Ansatz nach dem Einbau des AzG, vor der UV-Induktion, mit 40 μM NTP-Zugabe verlängert (Spur 3) und ein Ansatz nicht UV-aktiviert (Spur 2). Die Entfernung von RNA und DNA erfolgte mit 100 U *Micrococcus*-Nuklease für 20 min bei 37 °C. Die Analyse erfolgte auf einem 10%igen SDS-Proteingel. Links ist ein silbergefärbtes Kontrollgel gezeigt. S = Proteingrößenstandard.

6.2 Innerhalb des RNA-DNA-Hybrids verändern sich sowohl die Kontakte zwischen RNA und RNAP-Untereinheiten als auch die Stärke der Interaktionen

Zur Detektion möglicher Veränderungen der Interaktionen zwischen RNAP-Untereinheiten und RNA innerhalb des RNA-DNA-Hybrids, wurden die AzG49-Komplexe (Abb. 39 C und D, Spuren 2 und 1) schrittweise verlängert. Durch die Zugabe unterschiedlicher Nukleotide und zusätzlicher Isolierungsschritte wurden A50-, G51-, C52- und G55-Komplexe generiert (C, Spuren 3 und 4; D, Spuren 2 und 3).

Innerhalb des RNA-DNA-Hybrids veränderten sich die Bereiche, mit denen die RNAP mit der RNA interagiert. Abb. 39 A und B zeigen, daß ein Wechsel von der A'- zur A''-Untereinheit stattfand. Im Verlauf der ersten zwei Nukleotide war die Interaktion mit A' noch stärker als die mit A'' (A, Spuren 3-4). Ab dem vierten Nukleotid innerhalb des RNA-DNA-Hybrids (C52-Komplexe) war jedoch ein Wechsel festzustellen, nun war der Kontakt zur A''-Untereinheit ausgeprägter (B, Spur 2). Nach sieben Nukleotiden (G55) fand dann keine Interaktion mehr zwischen RNA und A' statt (B, Spur 3). Es erfolgte lediglich noch ein Kontakt zur A''-Untereinheit, der jedoch relativ schwach war. Die Stärke des sehr schwachen Kontaktes zur B'-Untereinheit änderte sich im Verlauf der unterschiedlichen Positionen nur unwesentlich. Abb. 39 C und D zeigen die RNA-Signale der gecrosslinkten Komplexe.

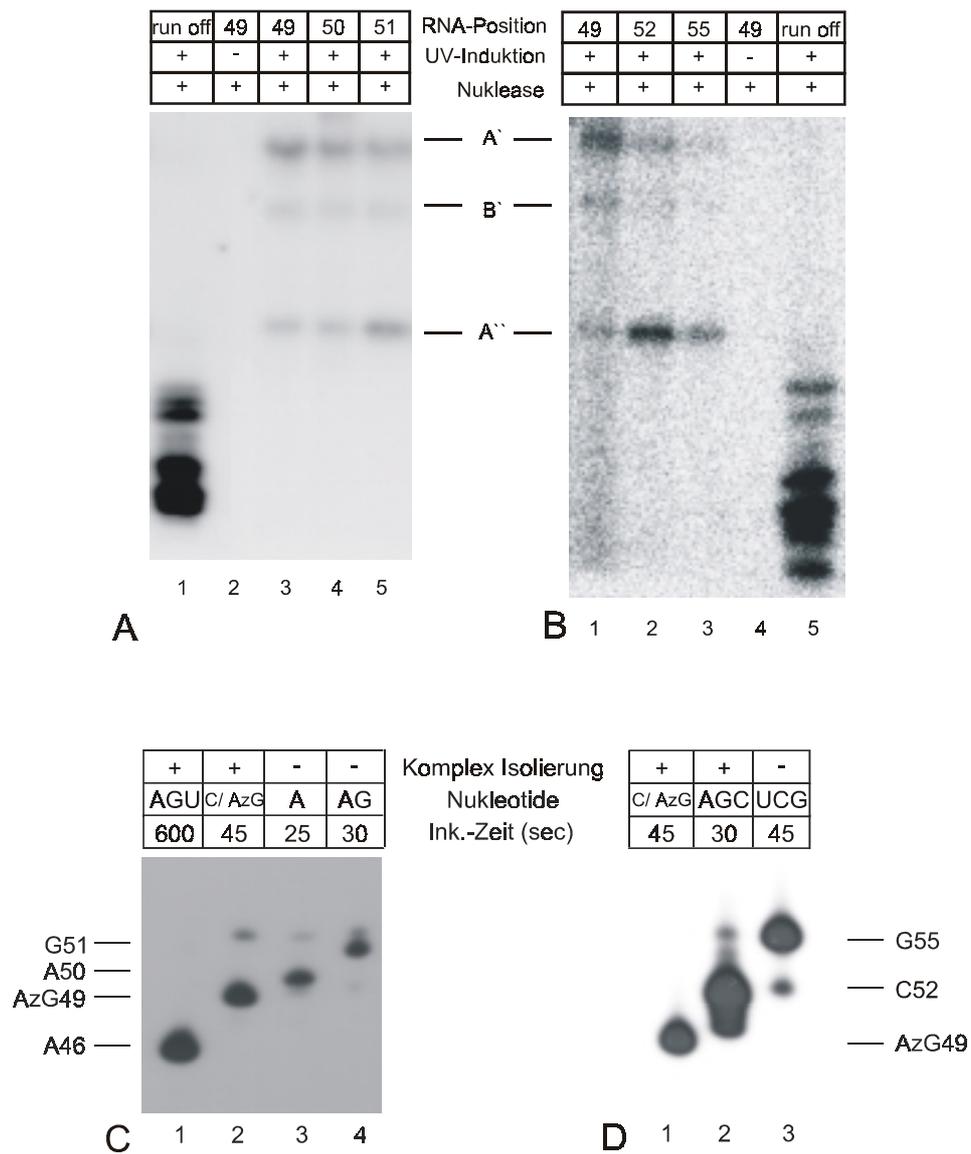


Abb. 39: Die RNA-Protein-Interaktionen verändern sich im Verlauf der ersten sieben Positionen im RNA-DNA-Hybrid. A und B, A46-Komplexe wurden mit 0,8 μM [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]CTP (370 Bq/pmol), 10 μM AzG und angegebenen Nukleotidzugaben, Inkubationszeiten und Isolierungsschritten (C und D) auf 5 Positionen innerhalb der ersten sieben Nukleotide des RNA-DNA-Hybrids gestellt. Das Crosslinking erfolgte wie in Abb. 38 geschildert. C und D zeigen die RNA der untersuchten Elongationskomplexe. Die Gelläufe erfolgten auf 10%igen SDS-Proteingelen, respektive 15%igen PA/Harnstoffgelen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Interaktionen innerhalb des katalytischen Zentrums an den gleichen Regionen der *Methanococcus*-RNAP-Untereinheiten erfolgen wie in RNAP II-Elongationskomplexen (Gnatt et al., 2000). Eine Analyse dieses Ergebnisses wird in der Diskussion präsentiert.

IV Diskussion

Allgemeines

Durch den Einsatz modifizierter DNA-Matrizen und der funktionellen Identifizierung eines Proteins aus *Methanococcus thermolithotrophicus* als ersten archaeellen Elongationsfaktor wurde die Möglichkeit geschaffen, die bis dahin wenig untersuchten Ereignisse im Verlaufe der Elongation der Transkription innerhalb der Archaea genauestens zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Register der Elongation miteinander verglichen, TFS als archaeeller Elongationsfaktor identifiziert und der TFS-vermittelte Proofreading-Mechanismus *in vitro* aufgeklärt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, daß dNTP als Substrat von der RNAP verwendet werden kann, und es konnte der Weg des Transkripts im RNA-Kanal der RNAP verfolgt werden.

IV 1 Identifizierung von TFS als archaeellen Elongationsfaktor und Aufklärung des Mechanismus TFS-induzierter RNA-Hydrolyse

Die Aminosäuresequenz eines dem eukaryellen Elongationsfaktor TFIIS ähnlichen archaeellen Proteins wurde erstmals in *Sulfolobus acidocaldarius* beschrieben (Langer & Zillig, 1993). Insbesondere im C-terminalen Bereich, welcher beim TFIIS für die Hydrolyse-Aktivierung essentiell ist, zeigten sich die größten Übereinstimmungen (Langer & Zillig, 1993; Kaine et al., 1994; Musfeldt, 1997). Aufgrund von zusätzlichen höheren Übereinstimmungen mit kleinen RNAP-Untereinheiten (Kaine et al., 1994; Chédin et al., 1998; Bell & Jackson, 1998a), der Tatsache, daß das archaeelle Protein mit ungefähr 13 kDa erheblich kleiner ist als TFIIS (~35 kDa, Sekimizu et al., 1976) und eher der Größe der kleinen Untereinheiten entspricht und aufgrund der großen evolutionären Verwandtschaft archaeeller und eukaryeller RNAP wurde bis vor kurzem angenommen, daß es eher eine Untereinheit der RNAP darstellt (Jackson & Bell 1998b; Soppa, 1999a).

Es konnte von uns jedoch durch biochemische Analysen gezeigt werden, daß es sich bei diesem Protein nicht um eine Untereinheit der RNAP handelt (Hausner et al., 2000; Lange, 1999). Das eukaryelle Homolog von TFS, TFIIS ermöglicht der transkribierenden RNAP im Verlauf der RNA-Synthese durch Bindung und exonukleolytischer RNA-Hydrolyse-Aktivierung, Blockaden im Verlauf der Transkription zu überwinden (zusammengefaßt in Wind & Reines, 2000). Diese Hydrolyse ist verbunden mit der Freisetzung von Mono-, Di- und Oligo-Ribonukleotiden vom 3'-Ende der synthetisierten RNA (Izban & Luse, 1992,

1993a; Gu et al., 1993; Rudd et al., 1994). Ein physiologischer Sinn dieser Hydrolyseaktivierung liegt in der Möglichkeit eines erneuten Anlaufs zur Transkription über eine Blockade hinweg. Es stellte sich heraus, daß auch TFS die wahrscheinlich bei allen RNAP vorhandene intrinsische Hydrolyseaktivität (Rudd et al., 1994; Orlova et al., 1995) verstärken konnte (Abb. 7). Die Untersuchungen zeigten weiterhin, daß die Hydrolyse über Intermediärprodukte erfolgte und daß, abhängig von der Position der RNAP auf der DNA, bevorzugt die Hydrolyse von 4 oder 10 B stattfand (Abb. 12 und 7). Es war jedoch festzustellen, daß bei den reifen A46-Komplexen nach der Hydrolyse von 10 B teilweise weiter hydrolysiert wurde (Abb. 12). Diese Beobachtung steht im Einklang mit Befunden bei Eukarya und Bacteria. Auch bei TFIIS- und Gre-Faktor-induzierter RNA-Hydrolyse findet eine fortlaufende Hydrolyse vom 3'-Ende der RNA im katalytischen Zentrum der RNAP mit bevorzugten Intermediären statt (Izban & Luse, 1992; Reines, 1992; Wang & Hawley, 1993). Diese Hydrolyse kommt bei frühen Komplexen erst an Position $\sim +10$ zum Stillstand (Komissarova & Kashlev, 1998; Pal et al., 2001). Bei der Verifizierung der Spaltprodukte zeigte sich, daß auch bei der *Mc. thermolithotrophicus*-RNAP die Freisetzung einer 10 B RNA (ohne TFS) und der (Mono-) und Dinukleotide (mit TFS) vom 3'-Ende her erfolgte (Abb. 8 und 9). Vergleiche zwischen mit und ohne TFS-Zugabe entstandenen Produkten zeigten, daß die Freisetzung von Dinukleotiden einzig von TFS vermittelt werden konnte (Abb. 8, 9 und 12). Um einen weiteren Beweis zu erbringen, daß TFS das archaeele TFIIS-Homolog bzw. ein Elongationsfaktor mit ähnlichen Eigenschaften ist, mußten arretierte Komplexe generiert werden. TFIIS ist der einzige eukaryelle Elongationsfaktor, der arretierte Komplexe reaktivieren kann (zusammengefaßt in Wind & Reines, 2000; Conaway et al., 2000). Durch die Reaktivierung werden 7 bis 17 Basen lange Oligo-Ribonukleotide vom 3'-Ende der RNA freigesetzt (Izban & Luse., 1992, 1993b; Rudd et al., 1994; Samkurashvili & Luse, 1996). Eine Arretierung von Elongationskomplexen erfolgt bei Bacteria und Eukarya relativ häufig an sogenannten internen Arrest-Stellen (Reines et al., 1992; Gu et al., 1994) oder bei gestellten Komplexen meistens schon durch verlängerte Inkubationszeiten (Krummel & Chamberlin, 1992; Nudler et al., 1995; Komissarova & Kashlev, 1997a; Samkurashvili & Luse, 1998). Da bei den Archaea bisher keine homologen internen Arrest-Stellen bekannt sind, wurde versucht, einen Arrest der RNAP über die Zeit (Abb. 10 Spuren 4 bis 6, Abb. 11), veränderte Temperaturen und ähnliches zu generieren (Daten nicht gezeigt). Es stellte sich jedoch heraus, daß *Methanococcus*-Elongationskomplexe auf den verwendeten DNA-Matrizen nur zu einem sehr geringen Anteil arretierten (Abb. 10). Bei den reifen Komplexen könnte der Grund hierfür in der Sequenz der verwendeten DNA-Matrizen liegen. So wurde gezeigt, daß die laterale Stabilität von Elongationskomplexen sehr stark durch das RNA-DNA-Hybrid beeinflusst wird; eine Folge von 4 rC-dG-Paarungen im Hybrid verstärkt eine „downstream“-Positionierung eines Elongationskomplexes (Toulmé

et al., 1999) und verhindert dadurch eine Arretierung. Ein ebensolches Hybrid (rG-dC von +40 bis +43) war beim A46-Komplex vorhanden (s. Sequenz in Abb. 11). Der frühe ternäre G25-Komplex besaß eine erhöhte eigene Nukleaseaktivität (Abb. 7 im Vergleich mit Abb. 11; s. auch Abb. 23 B). Dadurch bedingt ist es wahrscheinlich, daß die frühen Komplexe, trotz des UA-reichen RNA-DNA-Hybrids (6 von 8 Bp sind rU/A-dT/A; s. Sequenz in Abb. 7), eher dazu tendierten, RNA zu hydrolysieren und zurückzugleiten, als zu arretieren. Dennoch konnte eindeutig bewiesen werden, daß TFS als archaeller Elongationsfaktor mit TFIIS-ähnlichen Eigenschaften die geringe Zahl arretierter Komplexe, die dennoch an beiden Positionen entstanden, verringerte bzw. quantitativ aufheben konnte (Abb. 10).

Bei den Komplexen aus der Identifizierung von TFS als Elongationsfaktor handelte es sich um arretierte RNAP, wobei nicht definitiv gesagt werden konnte, wodurch es zum Arrest kam und ob sie nur zeitlich oder irreversibel arretiert waren (maximal 6 min Inkubation, Abb. 10). Komplexe nach Falscheinbau (Abschnitt IV 3) waren irreversibel arretiert, da auch bei verlängerter Inkubationsdauer keine Fortsetzung der RNA-Synthese erfolgte (Daten nicht gezeigt).

Bei der Identifizierung von TFS als archaellen Elongationsfaktor wurden die Analysen in Abwesenheit von Nukleotiden durchgeführt, um die Verstärkung der intrinsischen Hydrolyseaktivität darzustellen (Abb. 7). Der Motor für die Nuklease-Induktion war jedoch nicht der Nukleotidmangel, sondern das Pausieren der Transkription bzw. die extreme Verlangsamung der RNA-Synthese (Lange & Hausner, Manuskript in Vorbereitung). In gestellten Komplexen fand in Anwesenheit von Nukleotiden und TFS eine sich wiederholende Abfolge von Hydrolyse- und Resynthese-Ereignissen statt (Abb. 23). Es scheint also, ähnlich wie bei TFIIS-induzierter Hydrolyse (Reines et al., 1993), zur Bindung von TFS an die RNAP, Hydrolyse-Induktion und anschließender Ablösung, gefolgt von einer erneuten Bindung zu kommen. Dafür spricht, daß die Hydrolyse-Aktivität durch steigende Mengen TFS erhöht wird (Abb. 12). Bei einer festen Bindung des Faktors an einen ternären Komplex würde die Aktivität durch steigende TFS-Konzentrationen nicht erhöht werden können. Auch die hohen Übereinstimmungen in der Aminosäure-Sequenz von ~37 % zwischen der Hydrolyse-aktivierenden Domäne III von TFIIS und TFS geben eindeutige Hinweise (Hausner et al., 2000). Insbesondere zwei invariable Aminosäuren, die bei TFIIS für die Hydrolyseaktivierung notwendig sind (Jeon et al., 1994; Yoon et al., 1998), findet man auch in TFS konserviert (Musfeldt, 1997; Hausner et al., 2000). Das weist darauf hin, daß, obwohl bei TFS zwei anstelle eines Zinkfingers vorkommen, die Mechanismen der Hydrolyseaktivierung tatsächlich ähnlich sein könnten. Hierbei hängt das Ausmaß der Hydrolyse-Resynthese zum einen vom Verhältnis RNAP zu TFS (Abb. 12), zum anderen von der Phase der Elongation ab (vergleiche Abb. 23 A und B mit Abb. 24).

Im Gegensatz zum eukaryellen TFIIS (Sijbrandi et al., 2002) war TFS in der Lage, auch schon in frühen abortiven Transkriptionskomplexen die Nukleaseaktivität zu stimulieren (Abb. 24). Hierbei war das Verhältnis von RNA-Transkripten zu entstehenden Hydrolyseprodukten vergleichsweise hoch (zwischen 4:1 bis 20:1; quantifizierte Werte aus Abb. 24 und nicht gezeigte Daten). Der Grund hierfür war, daß bis etwa Position +12/13 noch keine produktive Elongationsphase erreicht war (Holstege et al., 1997) und die gebildete RNA, insbesondere aufgrund des schwachen RNA-DNA-Hybrids (Keene & Luse, 1999) leichter freigesetzt wurde (4 von 6 Bp sind rU/A-dT/A; Schema in Abb. 7). Es ist jedoch bekannt, daß sobald drei Phosphodiesterbindungen geknüpft wurden (sog. „escape commitment“), ein Komplex relativ stabil an die DNA gebunden ist (Kugel & Goodrich, 1998, 2002). Vermutlich war die RNAP auch noch in Kontakt mit den Transkriptionsfaktoren. Dafür spricht, daß z. B. bei *E. coli* die RNAP bis Position +9 nicht den Promotor verläßt (Schikor et al., 1990).

Es handelte sich bei den entstehenden Dinukleotiden nicht um Hydrolyseprodukte von Elongationskomplexen, die Nukleotide falsch eingebaut hatten. Erstens waren keine ternären Komplexe mit verlängerter RNA zu erkennen und zweitens waren entsprechend den zugegebenen Nukleotiden (GpA, radioaktives-UTP und GTP), um Komplexe auf einer DNA-Sequenz 5'-GATTTGAGTAGGGAG-3' an Position +5 oder +6 zu stellen, auch nur die erwarteten Dinukleotide (pUpU von +3/4 und +4/5 und pUpG von +5/6) zu detektieren. Ein möglicherweise durch Überlesen der Position entstehendes pUpA-Dinukleotid an +9/10 (dann erst wieder an Position +17/18) war nicht zu detektieren. Einzig ein Falscheinbau von GMP oder UMP an Position +7 wäre aufgrund der verwendeten Nukleotide (radioaktives-UTP) nicht zu erkennen. Hierbei würden entweder unmarkierte pGpG- oder markierte pGpU-Hydrolyseprodukte resultieren.

Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zum Verhalten der RNAP II. Dort erfolgt die TFIIS-induzierte Hydrolyse erst, wenn die RNA eine Länge von 13 B erreicht hat (Sijbrandi et al., 2002). Des Weiteren ist bis zu dieser Position häufig ein Überlesen von Stoppositionen nach Falscheinbau zu beobachten. Die Hydrolyse-Induktion ab Register 13 erfolgt durch die Bindung von TFIIS an eine Stelle der RNAP II im Bereich, an der die Nukleotide ins katalytische Zentrum gelangen (s. I Einleitung). Ausschlaggebend für die Fähigkeit zu TFIIS-induzierter RNA-Hydrolyse ist hierbei ein DNA-RNA-Hybrid von ungefähr 8 bis 9 Bp Länge, welches auch für die Bildung stabiler und prozessiver RNAP-Elongationskomplexe notwendig ist (Gnatt et al., 2001; Kireeva et al., 2000; Sidorenkov et al., 1998; Komissarova & Kashlev, 1998; Korzheva et al., 1998).

Der TFS-induzierte Mechanismus muß daher in der abortiven Phase ein anderer sein, bei dem kein vollständiges RNA-DNA-Hybrid benötigt wird. Hierbei muß zusätzlich entweder kein 3'-Ende der RNA zugänglich sein oder der von der RNAP gebildete inverse Trichter, in dem der Elongationsfaktor binden soll (Gnatt et al.,

2001; Cramer et al., 2001), hat ein anderes Ausmaß und ermöglicht es dem Faktor, dichter an das katalytische Zentrum der RNAP zu gelangen. Der sogenannte Trichter wird bei der RNAP II von der größten Untereinheit RPB1 (im Bereich von As 663-809) gebildet (Cramer et al., 2001). Die homologe Untereinheit in *Methanococcus* ist geteilt in A' und A'' (Langer et al., 1995; Bult et al., 1996), was eine veränderte Trichter-Konformation möglich macht. Die Regionen zur Trichterbildung bei *Methanococcus* auf der A'-Untereinheit liegen am C-Terminus (Vergleich mit Cramer et al., 2001; Daten nicht gezeigt). Da die Menge an entstehenden Dinuklotiden in der abortiven Phase vergleichsweise gering war (Abb. 24), ist es möglich, daß der Mechanismus TFS-vermittelter Hydrolyseinduktion in der abortiven Phase der Transkription ein anderer ist als in der frühen und fortgeschrittenen Elongation.

Bei der eukaryellen Transkription ist die Notwendigkeit für ein korrektes 5'-Ende der mRNA nicht essentiell, da diese keine wesentlichen Informationen trägt. Im Gegensatz dazu ist das 5'-Ende archaeller RNA Träger der sogenannten Shine-Dalgarno-Sequenz, die 3-10 Nukleotide stromaufwärts des Translationsstartcodons liegt (Dennis, 1997; Bell & Jackson, 1998b). Sie ist komplementär zum 3'-Ende der 16S-rRNA und wichtig für die korrekte Bindung des Ribosoms. Es erscheint daher notwendig, daß ein zusätzlicher Mechanismus existiert, der die Genauigkeit der frühesten Transkription erhöhen kann (s. Abschnitt IV 3 Archaeelles Proofreading).

IV 2 Eigenschaften und Konformationen früher und reifer Elongationskomplexe

Frühe G25- und reife A46-Elongationskomplexe unterscheiden sich sowohl in ihren Eigenschaften als auch insbesondere in ihren Konformationen voneinander. Frühe Elongationskomplexe zeigten eine relativ hohe eigene Hydrolyseaktivität (Abb. 7 und 23 B) und dissoziierten bei Mg^{2+} -Mangel oder während RNase A-Inkubationen sehr schnell von der DNA ab (Abb. 13 und 21). Dagegen besaßen reife Komplexe eine sehr geringe intrinsische Hydrolyseaktivität (Abb. 11), dafür aber auch eine viel geringere Sensitivität bezüglich Mg^{2+} -Mangel oder RNase A-Einfluß (Abb. 13 und 20). Die unterschiedlichen Mg^{2+} -Sensitivitäten können durch die Zusammensetzung der RNA-DNA-Hybride bedingt sein. Beim G25-Komplex waren sechs rU/A-dT/A im Hybrid. Durch die schwächeren Interaktionen wird die Freisetzung der RNAP bzw. die Termination begünstigt (von Hippel, 1998). Wenn des weiteren stabilisierende Mg^{2+} -Ionen entzogen werden, kann es zur Freisetzung kommen (Arndt & Chamberlin, 1991). Die Ursachen für die unterschiedlichen Verhaltensweisen sind zusätzlich durch die Konformationen der Elongationskomplexe bedingt (zusammenfassende Gegenüberstellung in Abb. 22).

Bei der Betrachtung der Ausmaße der Transkriptionsblasen früher G25- (pers. Mitteilung Hausner) und reifer A46-Komplexe (Abb. 17) war zu erkennen, daß beim reifen Komplex ein kleinerer Bereich der DNA von 13 bis 17 B einzelsträngig war. In seiner Dimension entsprach dieser ungefähr den offenen Komplexen eukaryeller, bakterieller und archaeeller Elongationskomplexe (Zaychikov et al., 1995; Komissarova & Kashlev, 1997b; Spitalny & Thomm, 2003 Manuskript eingereicht). So hat z. B. auch die Transkriptionsblase der *P. furiosus*-RNAP an den Positionen +5 bis +20 ein Ausmaß von 13 bis 17 B (Spitalny & Thomm, 2003 Manuskript eingereicht). Daß frühe Elongationskomplexe von *Methanococcus* eine Transkriptionsblase von ungefähr 19 B besaßen, lag höchstwahrscheinlich an ihren erhöhten Hydrolyseaktivitäten (Abb. 7). So könnte in der sehr kurzen Zeit, in der ternäre Komplexe mit verkürzter RNA vorhanden waren, eine Modifikation erfolgt sein. Dafür spricht auch, daß Kaliumpermanganat-Footprints am offenen Initiationskomplex von *Methanococcus* auf dem tRNA^{Val}-Promotor einen Bereich von ungefähr 11 bis 13 B (Hausner & Thomm, 2001) umfassen, was bei *E. coli* (Yan & Gralla, 1997; Burns et al., 1999) und RNAP II (deHaseth & Helmann, 1995) mit ähnlich großen Transkriptionsblasen am Initiationskomplex auch der Fall ist.

Mit Hilfe von Kristallstrukturen und biochemischen Analysen eukaryeller und bakterieller Elongationskomplexe konnte die Dimension des RNA-DNA-Hybrids innerhalb der RNAP mit 8 bis 9 Bp bestimmt werden (Nudler et al., 1997; Kireeva et al., 2000; Gnatt et al., 2001). Das Muster der unterschiedlich starken Modifizierungen am nicht-codogenen DNA-Strang des reifen A46-Komplexes deutete darauf hin, daß das RNA-DNA-Hybrid bei *Methanococcus*-Elongationskomplexen eine entsprechende Größe von maximal ~8 Bp hat (s. Schema in Abb. 17). Aufgrund der Tatsache, daß von Position +45 bis +39 keine Thymidine in der DNA-Sequenz vorhanden waren, ist dieses jedoch nicht eindeutig bewiesen. Ein eventuelles kleineres Hybrid konnte nicht ausgeschlossen werden. Die starke Modifizierung des Thymidins an Position +38 sprach allerdings eindeutig gegen ein 9 Bp RNA-DNA-Hybrid. Im Gegensatz dazu, war beim frühen Komplex kein eindeutiges RNA-DNA-Hybrid zu erkennen (pers. Mitteilung Hausner). Auch das unterstützt die zuvor getroffene Vermutung der Ereignisse am frühen Komplex. Einschränkend muß aber berücksichtigt werden, daß es immer einige Basen im Hybrid geben kann, die mit KMnO₄ reagieren (Lee & Landick, 1992), was in einer vorschriftsmäßigen A-Form des RNA-DNA-Hybrids nicht möglich sein sollte. Wenn auch schwach, so reagierte auch das terminale T an Position +46 am nicht-codogenen Strang im RNA-DNA-Hybrid des A46-Komplexes mit KMnO₄ (Abb. 17).

Einen Hinweis für den Grund der erhöhten Hydrolyse-Aktivität früher Komplexe und den dadurch möglicherweise veränderten KMnO₄-Footprint-Ergebnissen bot die Gegenüberstellung der mit Hilfe von Exo III ermittelten Konformationen der

RNAP. Hier zeigte der frühe Transkriptions-kompetente Komplex einen Zustand, der einer arretierten RNAP entsprach (Lange, 1999; Abb. 22 B). Der reife Komplex hingegen zeigte das Bild einer „normalen“, Transkriptions-kompetenten RNAP (Abb. 15 und 22 A) (Samkurashvili & Luse, 1996, 1998; Pal et al., 2001). In einem Elongationskomplex mit einer Transkriptions-kompetenten Konformation steht die RNAP sozusagen mittig über dem Nukleotid, welches als letztes eingebaut wurde. Auch Footprintanalysen von frühen bakteriellen und eukaryellen Elongationskomplexen von Position +20 bis +30 zeigen oftmals „arretierte“ Konformationen mit stromaufwärts verlagerten Footprints (Komissarova & Kashlev, 1997; Krummel & Chamberlin, 1992; Nudler et al., 1994; Samkurashvili & Luse, 1998; Pal et al., 2001). Bei ihnen handelt es sich häufig nicht um arretierte Komplexe, sondern um RNAP, die in der Lage sind, die Transkription ohne Hilfe fortzusetzen (Samkurashvili & Luse, 1998; Pal et al., 2001). Das Schicksal dieser frühen Komplexe ist zum Teil durch die Zusammensetzung der transkribierten RNA bedingt. Purin-reiche RNA-Transkripte führen dazu, daß frühe Komplexe arretieren, Pyrimidin-reiche wirken entgegengesetzt (Kireeva et al., 2000; Pal et al., 2001). Es scheint aber eine generelle Eigenschaft früher Elongationskomplexe zu sein, „upstream“-Translokationen durchzuführen. Das Verhältnis von Pyrimidin zu Purin der RNA bei *Methanococcus* G25-Komplexen von Position +1 bis +25 auf pIC31/30PRO-C25 ist 9:16 (Sequenz in Abb. 5). Eigentlich wäre daher ein höherer Anteil an entstehenden arretierten Komplexen zu erwarten gewesen. Es ist aber anzunehmen, daß aufgrund der relativ hohen intrinsischen Hydrolyse-Aktivität früher *Methanococcus*-RNAP (Abb. 7 und 23 B) nur sehr wenig Komplexe arretierten (Abb. 7 und 10).

Der Befund, daß der G25-Komplex eine „arretierte“-Konformation besaß, wurde durch die RNase A- und T1-Footprints bestätigt (Abb. 18 bis 21 und Schema in Abb. 22). *E. coli* RNase-Footprintmuster verändern sich beim Übergang zum arretierten Zustand (Komissarova & Kashlev, 1997a, b), ähnlich dem der DNA-Footprintmuster. Auch bei Eukarya und Bacteria zeigen RNase-Footprints und RNA-Crosslinks Erweiterungen bzw. Veränderungen durch Arrest (Rice et al., 1991; Gu et al., 1996; Markovtsov et al., 1996).

Die frühen *Methanococcus*-Elongationskomplexe hatten, im Vergleich zum reifen Komplex, erweiterte geschützte RNA-Bereiche (Abb. 22 A und B). Betrachtet man insbesondere die RNase T1-Ergebnisse, so zeigte sich, daß beim frühen Komplex ein Bereich von mindestens 24 Basen geschützt war, „G19“ (maximal 5 % der gesamten Radioaktivität) wurde nicht geschnitten, erst „G24“ wurde erkannt (Abb. 19). Der reife A46-Komplex schützte nur 13 bis 21 B RNA, und Elongationskomplexe an Position +49 und +51 schützten maximal 16 bis 18 Basen vor RNase T1-Spaltung (Daten nicht gezeigt). Das veranschaulichte auch auf RNA-Ebene, daß die Konformationen der RNAP in den beiden Transkriptionsregistern unterschiedlich waren. Um die RNase-Daten (aufgrund der

Sequenz-Spezifität der Enzyme, s. II 6.3) eindeutig vergleichbar zu machen, müßten zusätzlich noch DNA-Matrizen mit gleichen Sequenzen hergestellt und eingesetzt werden. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse aller Footprints läßt vermuten, daß die arretierte Konformation der frühen Elongationskomplexe die Eigenschaften beeinflusst. Unterstützt wurde diese Annahme durch die Eigenschaften von G15-Komplexen, welche ein dem G25-Komplex entsprechendes Stromabwärts-Ende besaßen (Abb. 22 C und Lange, 1999). Sie weisen eine Transkriptions-kompetente Konformation auf. Dadurch bedingt war eine geringere Sensitivität gegenüber Mg^{2+} -Mangel (Daten nicht gezeigt).

Die RNase A-Footprints am A46-Komplex zeigten, in Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymmenge, einen minimalen geschützten Bereich von nur ~11 B (Abb. 20). Wie bereits erläutert (s. I Einleitung und IV 1), ist für einen stabilen Elongationskomplex ein ~8 bis 9 Bp RNA-DNA-Hybrid ausreichend. Dennoch war der minimale geschützte RNA-Bereich, im Vergleich zu eukaryellen und bakteriellen Komplexen, relativ klein. Mit RNase A-Schutzexperimenten bei *E. coli* konnte gezeigt werden, daß unter normalen Bedingungen ~14 bis 16 B große geschützte RNA-Bereiche zu detektieren waren, die durch GreB oder Pyrophosphorolyse auf 8 bis 10 B verkürzt wurden (Komissarova & Kashlev, 1998). In aktiven Säugetier-RNAP II-Elongationskomplexen wurde ein Bereich von 17-20 Nukleotiden geschützt (Gu W. et al., 1996).

Vergleicht man die Dimensionen archaeeller, bakterieller und eukaryeller DNA-Footprints miteinander, so ist auch hierbei festzustellen, daß eine archaeelle RNAP geringere Ausmaße an DNA bedeckt. *P. furiosus* RNAP schützt ebenso wie *Mc. thermolithotrophicus*-RNAP ~24 bis 28 Basen vor Exo III-Hydrolyse (Spitalny & Thomm, 2003 Manuskript eingereicht, Abb. 15). ExoIII-Footprints von *S. cerevisiae* Transkriptions-kompetenten RNAP II-Elongationskomplexen haben eine Begrenzung von ~31 bis 32 Bp, d. h. einen ~3 bis 8 Bp größeren Umfang (Kireeva et al., 2000). Somit entsprachen die jeweils kleineren Ausmaße von Exo III- und RNase A-Footprints bei Transkriptions-kompetenten (reifen) *Mc. thermolithotrophicus*-Komplexen einander.

Interessant war das Resultat, daß bei Exo III-Footprints in Anwesenheit von TFS, nach TFS-induzierter RNA-Hydrolyse, jeweils eine Erweiterung des Stromabwärts-Endes geschützter DNA-Bereiche erfolgte (Lange, 1999 und Abb. 16). RNAP II-Kristallstruktur- und TFIIS-Crosslinking-Daten deuten darauf hin, daß TFIIS in einer Pore an das Enzym bindet, in der die Nukleotide ins katalytische Zentrum gelangen und das 3'-Ende der nativen RNA hineinragen kann (Gnatt et al., 2001; Cramer et al., 2001). Wenn ähnliches bei TFS ebenfalls der Fall ist, würde es die Erweiterung der Exo III-Footprints erklären. Auch die Bindung von TFIIS an die RPB6-Untereinheit (entspricht der K-Untereinheit bei *Methanococcus*) ist wahrscheinlich, da sie für Interaktionen von RNAP und TFIIS essentiell ist (Ishiguro et al., 2000). Protein-Protein-Crosslinking von TFS und RNAP könnten

diese wahrscheinlichen Bindungen bestätigen. Eine andere Möglichkeit, die Erweiterung in Stromabwärts-Richtung zu erklären, wäre eine Bindung von TFS an die DNA. Bei TFIIS wurde gezeigt, daß das Protein an das 3'-Ende neusynthetisierter RNA, RNA-DNA-Hybride, ssDNA und dsDNA binden kann (Agarwal et al., 1991; Reines & Mote, 1993; Powell et al., 1996). Hierbei erfolgt die Bindung des C-terminalen Zinkbandes an Nukleinsäure, jedoch nur bei gleichzeitiger Bindung an die RNAP (Powell et al., 1996). Endgültig klären, ob und an welche Nukleinsäuren *Methanococcus* TFS bindet, würden UV-Crosslinking-Experimente mit DNA- und RNA-Bausteinen.

IV 3 Archaeelles Proofreading

Schätzungen von Fehlerraten bei DNA-abhängigen RNAP aus *E. coli* (Libby & Gallant, 1991) deuten darauf hin, daß die Genauigkeit der Transkription in etwa 1000fach über der liegt, die von der erwarteten Knüpfung korrekter oder falscher Basenpaarungen, aufgrund der Unterschiede in der freien Energie, zu erwarten ist. Die Fehlerrate der DNA-Polymerasen ist mit durchschnittlich einem Fehler alle 10^9 - 10^{10} Basen sehr niedrig. Diese Genauigkeit wird durch Basenpaardiskriminierung und exonukleolytisches Proofreading erreicht (Johnson, 1993; Kunkel & Bebenek, 2000). Bei den Bacteria, Eukarya und der viralen T7-RNAP sind einzelne Untersuchungen zum RNAP-Proofreading bereits bekannt (Erie et al., 1993; Jeon & Agarwal, 1996; Thomas et al., 1998; Huang et al., 2000). Bei den Bacteria und Eukarya wurde gezeigt, daß eine Fehlerkorrektur nach Falscheinbauereignissen erfolgen kann (Erie et al., 1993; Jeon & Agarwal, 1996; Thomas et al., 1998). Im Gegensatz dazu beruht das Proofreading bei der viralen T7-RNAP ausschließlich auf der Diskriminierung des Einbaus inkorrekturer Nukleotide und nicht auf deren postinkorporativer Entfernung (Huang et al., 2000). Um die Frage zu beantworten, ob und wie die von TFS verstärkte intrinsische Nuklease-Aktivität der *Mc. thermolithotrophicus*-RNAP in der Lage ist, Proofreading im Verlauf der Transkription zu ermöglichen (Lange & Hausner, Manuskript in Vorbereitung), wurden pausierte A46-Komplexe gezwungen, Falscheinbau durchzuführen (Abb. 25 und 26). Der Falscheinbau von UMP an Position +47 erfolgte um das ~350 bis 500fache langsamer als der Einbau von CMP (Abb. 29). Auch bei der RNAP II ist eine ähnliche Verlangsamung des Einbaus von GMP an einer Position, an der AMP benötigt wurde, zu beobachten (Thomas et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, daß ein effizienter Falscheinbau von RNA-Bausteinen bei *Methanococcus*, in Abhängigkeit vom Substrat, dessen Konzentration und der Temperatur erfolgte (Abb. 25 und 26). Bei Untersuchungen zum Proofreading-Mechanismus der RNAP II (Thomas et al., 1998; Jeon & Agarwal, 1996) wurde gezeigt, daß ein Falscheinbau von UMP anstelle von GMP

bzw. GMP statt AMP effizient erfolgt. Hierbei handelt es sich um den Austausch eines Purins gegen ein Pyrimidin bzw. eines Purins gegen ein Purin. Im Gegensatz dazu war ein effizienter Falscheinbau bei *Methanococcus* nur bei dem Austausch von UMP gegen CMP zu erkennen, d. h. ein Pyrimidin wurde für ein anderes Pyrimidin (Abb. 25) eingebaut. Des Weiteren arretierten die Komplexe bei *Methanococcus* nach Falscheinbau (Abb. 25, 26 und 27 A), wogegen eukaryelle Elongationskomplexe nicht, bzw. nur in einem vernachlässigbar geringen Ausmaß nach Falscheinbau (< 5 %) arretieren (Thomas et al., 1998). Das bedeutet, einzig die Geschwindigkeit des Falscheinbaus von RNAP II und *Methanococcus*-RNAP entsprechen einander. Betrachtet man dagegen Falscheinbau und Proofreading bei *E. coli* (Erie et al., 1993), ist zu beobachten, daß ebenso wie bei *Methanococcus* die Komplexe nach Falscheinbau eines UMP für CMP arretieren.

Man unterscheidet zwischen irreversibler und zeitlicher Arretierung. Der Unterschied hierbei ist, daß bei zeitlicher Arretierung die Komplexe nach einer längeren Inkubation mit Nukleotiden die Transkription ohne Hilfe eines Elongationsfaktors wieder aufzunehmen vermögen (Komissarova & Kashlev, 1997a, b). Hierbei oszilliert die RNAP zwischen einer inaktivierten und einer aktivierten Form in einem dynamischen Gleichgewicht, ohne die RNA zu hydrolysieren oder das korrekte Alignment des RNA-DNA-Hybrids zu verändern. Die arretierte *Methanococcus*-RNAP hingegen benötigte TFS, um die RNA-Synthese nach Falscheinbau fortzusetzen (Abb. 27 A), d. h. es handelte sich um eine irreversible Arretierung. Zur Reaktivierung wurde der TFS-induzierte Hydrolyse-Resynthese Mechanismus aktiviert (Abb. 23), wobei es durch die Hydrolyse eines Dinukleotids von U47 zur Freisetzung des falschen Nukleotids innerhalb des resultierenden pApU-Dinukleotids von Position +46/47 kam (Abb. 27 B). Das bedeutet, daß TFS in der Lage ist, die Genauigkeit der Transkription nach Falscheinbau zu erhöhen, wenn im Anschluß an das Hydrolyse-Ereignis CMP-Einbau an Position +47 erfolgt. Ob der Falscheinbau oder der Stillstand der RNA-Synthese Grund für das Proofreading war, konnte mit diesem Versuch aber noch nicht beantwortet werden. Ein wesentlicher Unterschied zwischen archaeeller und eukaryeller Elongation deutete sich durch dieses Ergebnis jedoch an. Obwohl die Komplexe arretiert waren, wurde bei TFS-induzierter Hydrolyse nur ein Dinukleotid freigesetzt. Somit verblieb das 3'-Ende der RNA im nach Falscheinbau arretierten *Methanococcus*-Komplex im aktiven Zentrum. Vergleicht man dieses mit TFIS- bzw. GreB-induzierten Hydrolyse-Produkten arretierter eukaryeller und bakterieller Komplexe, zeigen sich Unterschiede. Bei Arrest verliert die RNAP das 3'-Ende der RNA, im Verlauf eines Zurückgleitens auf der DNA, aus dem katalytischen Zentrum (zusammengefasst in Nudler, 1999; Erie, 2002; Fish & Kane, 2002). Bei einer Reaktivierung nach Arrest werden immer längere (7 bis 17 B) Oligo-Ribonukleotide freigesetzt (Izban & Luse., 1992, 1993b; Rudd et al., 1994; Samkurashvili & Luse, 1996). Um diesen Unterschied zu

belegen, wurden RNase T1- (Daten nicht gezeigt) und A- (Abb. 28) Footprints durchgeführt. Ein Vergleich von A46-, U47- und C48-Komplexen zeigte eindeutig, daß die vor RNase geschützten RNA-Bereiche nahezu identisch waren. Sie variierten, bedingt durch die fortlaufende Transkription, um jeweils ein Nukleotid. Wäre der U47-Komplex nach dem Falscheinbau durch ein Zurückgleiten und Verlust des 3'-RNA-Endes arretiert, hätte sich der geschützte Bereich verändern müssen, was nicht der Fall war. Im Gegensatz dazu zeigen z. B. RNase-Footprintmuster bei *E. coli*-Komplexen eine Veränderung beim Übergang zum arretierten Zustand (Komissarova & Kashlev, 1997a, b), ähnlich der Veränderung von DNA-Footprintmustern. DNase I- und Exo-III-Footprints an arretierten Komplexen zeigen auch immer einen gehaltenen (stromaufwärts-translozierten) Stromabwärts-Bereich der RNAP (Krummel & Chamberlin, 1992; Nudler et al., 1994, 1995). Auch KMnO₄-Footprints von arretierten U47-Komplexen (Daten nicht gezeigt) deuteten nicht auf ein Zurückgleiten der Transkriptionsblase hin, wie es bei *E. coli* der Fall ist (Komissarova & Kashlev, 1997a, b).

Ein Erklärungsmodell für den überraschenden Befund, daß ein Zurückgleiten bei den arretierten U47-Komplexen von *Methanococcus* nicht stattfand, bietet wiederum ein Vergleich mit *E. coli*-Elongationskomplexen. Eine Pausierung in Bacteria und Eukarya ist bedingt durch die Fähigkeit der RNAP auf der DNA vor und zurück zu gleiten, wobei das ~8 Bp RNA-DNA-Hybrid und die ~17-B DNA-Blase (Reader & Hawley, 1996; Korzheva et al., 1998; Mote & Reines, 1998) erhalten bleiben. Diese Bewegungen können 5 verschiedene Konfigurationen des Elongationskomplexes zur Folge haben. In einer sogenannten „backtracked“-Konformation ragt die RNA in „downstream“-Richtung aus dem aktiven Zentrum heraus. Bei einer „frayed“-Konformation ist das 3'-Ende der RNA von der DNA getrennt. In einer „pretranslocated“-Konformation, blockiert das 3'-RNA-Ende die NTP-Bindungs- oder *i+1*- Stelle. Die aktive Konformation hat das 3'-RNA-Ende in der „priming“- oder *i*-Stelle, wobei die NTP-Bindestelle frei oder von einem Nukleotid besetzt ist. Bei einer „hypertranslocated“-Konformation, ist das 3'-Ende der RNA aus dem katalytischen Zentrum weggezogen (Artsimovitch & Landick, 2000; Gelles & Landick, 1998). Während der schnellen Transkription oszilliert die RNAP zwischen einer „pretranslocated“ und einer aktiven Konformation. Im Modell des „slow intermediate“-Mechanismus (Artsimovitch & Landick, 2000) wechselt die RNAP, wenn sie ein Pausierungs- oder Arrest-Signal erreicht, von der schnellen Transkription in die langsamere Konformation, in der das 3'-Ende der RNA von der DNA wegragt („frayed“). Hierbei verändert sich die Konformation nur unwesentlich. Weitere wesentliche konformationelle Änderungen können dann zu einem arretierten („backtracked“) Komplex führen. Dieses „slow intermediate“-Modell wird von Crosslinking-Daten und Kristallstrukturvergleichen unterstützt (Markovtsov et al., 1996; Doublet et al., 1998; Zhang et al., 1999).

Nach einem Falscheinbauereignis ist das 3'-Ende eines RNA-DNA-Hybrids verzerrt (Nudler et al., 1997), was auch in *Methanococcus* U47-Komplexen der Fall sein wird. Übertragen auf das „slow intermediate“-Modell, würde es einer „frayed“-Konformation entsprechen, da auch sie ein Zurückgleiten der Komplexe favorisiert. Da das starke RNA-DNA-Hybrid eine gegenläufige „downstream“-Konformation begünstigt (Toulmé et al., 1999), gleiten U47-Komplexe nicht zurück. Eindeutige Hinweise für die Gültigkeit dieser Hypothese bieten auch Analysen von Pausierungssignalen in Eukarya und Bacteria, in denen immer schwache Hybride eine zusätzliche Voraussetzung für ein Zurückgleiten sind. Es gibt 2 Klassen von Pausierungssignalen; ein Zurückgleiten („backtracking“) bewirkendes sind Klasse II-Signale, die relativ viele rU-dA-Paarungen im RNA-DNA-Hybrid der RNAP enthalten (Landick, 2001; Korzheva et al., 1998, 2000; Kireeva et al., 2000; Gnatt et al., 2001). Außerdem wurde gezeigt, daß ein Zurückgleiten der RNAP durch ein relativ schwaches RNA-DNA-Hybrid in der aktiven Konformation sowie ein relativ stärkeres Hybrid nach „backtracking“ ermöglicht wird (Reines et al., 1989; Nudler et al., 1995; Guajardo & Sousa, 1997; Komissarova & Kashlev, 1997a, b). Wie bereits dargelegt wurde (Abschnitt IV 1), verstärkt das 4 x rG-dC-Hybrid im A46- und U47-Komplex die „downstream“-Konformation der RNAP.

Um zu klären, ob das Falscheinbauereignis oder das Pausieren die treibende Kraft archaeellen RNA-Proofreadings ist, wurden die Geschwindigkeit des Falscheinbaus (Abb. 29) und eine ungefähre Hydrolyse-Induktionsrate ermittelt. Bei Betrachtung der Geschwindigkeit des TFS-induzierten Zurücklaufens der G25- und A46-Komplexe (Abb. 7 und 12) und des Verhältnisses von entstandener 46 B RNA zu Dinukleotiden im Verlauf der Hydrolyse-Resynthese (Abb. 23 A) ergab sich eine ungefähre Hydrolyse-Induktionsrate von 30 Sekunden, bei einem Verhältnis TFS zu RNAP von ~8:1. Das physiologische Verhältnis von TFS zu RNAP in *Mc. thermolithotrophicus* ist ~2:1 (Daten nicht gezeigt). Gegenüberstellend wurde dann ermittelt, wie die Geschwindigkeiten von korrektem Einbau und Falscheinbau von CMP und UMP waren (Abb. 29). Hier war zu erkennen, daß ein Falscheinbau etwa 350 bis 500 mal langsamer erfolgte. Das bedeutet zusammenfassend, daß, obwohl ein Hydrolyseereignis nur etwa alle 30 sec erfolgte, durch den verlangsamten Einbau eines falschen Nukleotids durchaus genug Zeit für eine vorzeitige Hydrolyseinduktion war. Diese Art des Proofreadings vor einem Falscheinbau erfolgte auch tatsächlich, wobei steigende UTP-Konzentrationen das postinkorporative Proofreading verstärkten (Abb. 30). Verglich man jedoch die nahezu identischen Gesamtmengen der resultierenden Dinukleotide in Abhängigkeit von der Konzentration der eingesetzten UTP-Menge (2 µM bis 200 µM), so war festzustellen, daß Proofreading bei *Methanococcus* durch ein Pausieren und nicht durch ein Erkennen des Falscheinbaus erfolgt. Ähnlich verhält sich auch die RNAP II. Bei der Darstellung der Verwendung, bzw. des Einbaus von

falschen Nukleotiden bei laufender Transkription mit TFIIS, wurde das GTP-Analog ITP verwendet. Dieses verlangsamt die Verlängerung der RNA nach Falscheinbau um das ~400fache (vergleichbar mit UMP-Einbau bei *Methanococcus*, Abb. 29). Mit TFIIS wurde in Anwesenheit von 1 mM ITP und 2,5 μ M GTP während kontinuierlicher RNA-Synthese, ein um das 30 bis 40fach verringerter IMP-Einbau festgestellt. Eine vergleichende Betrachtung der Untersuchungen zum präinkorporativen Proofreading (Abb. 30, Dinukleotide) gibt eindeutige Hinweise darauf, daß es bei *Methanococcus* bei einer fortlaufenden RNA-Synthese zu entsprechenden Resultaten gekommen wäre.

Zur Veranschaulichung des TFS-vermittelten archaeellen RNA-Proofreadings zeigt die Abb. 40 ein zusammenfassendes Modell.

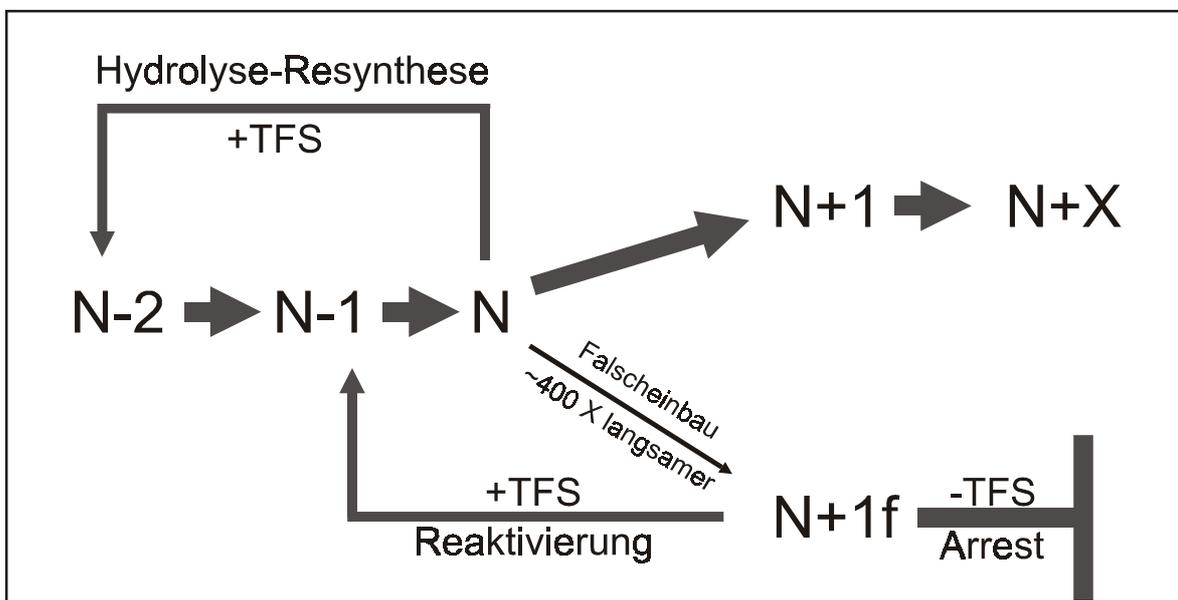


Abb. 40: Kombiniertes Modell für Hydrolyse-Resynthese, RNA-Falscheinbau und TFS-vermitteltes Proofreading bei *Mc. thermolithotrophicus*. Gestellte Elongationskomplexe (N) bauen falsche Nukleotide nur sehr langsam ein (N+1f), während der Einbau und die Verlängerung von richtigen Nukleotiden sehr schnell erfolgt (N+1 und N+X). Das Schicksal der RNAP nach Falscheinbau hängt von der Anwesenheit TFS ab. Ohne TFS resultieren arretierte Komplexe, mit TFS erfolgt eine schnelle Reaktivierung, vermittelt durch RNA-Hydrolyse-Resynthese. Hierbei wird das falsch eingebaute Nukleotid postinkorporativ entfernt (N-1). Die RNAP ist in der Lage, über den Hydrolyse-Resynthese-Mechanismus den Falscheinbau von Nukleotiden schon präinkorporativ zu unterbinden, hierbei resultieren N-2-Komplexe. Die unterschiedlichen Pfeilstärken kennzeichnen die Geschwindigkeiten der Einbau- bzw. Hydrolyse-Ereignisse

Das Modell veranschaulicht, daß archaeelles Proofreading in erster Linie aufgrund einer extremen Verlangsamung der Synthesegeschwindigkeit erfolgt und nicht zusätzlich, wie teilweise für die RNAP II beschrieben wurde, aufgrund einer in Abhängigkeit des falsch eingebauten Nukleotids möglichen 2 bis 7fach erhöhten Hydrolyserate (Jeon & Agarwal, 1996).

Die *Methanococcus*-RNAP ist also nicht in der Lage, selbständig zwischen richtig und falsch zu unterscheiden. Dies ist aber auch bei anderen Enzymen der Fall, so differenziert z. B. auch die DNA-Polymerase I bei der Aktivierung der 3'-5'-Exonukleaseaktivität nicht zwischen „korrekt“ und „falsch“, sondern aufgrund der Verlangsamung der Synthesegeschwindigkeit nach Falscheinbau (Kuchta et al., 1988).

Vergleicht man abschließend archaeelles mit eukaryellem und bakteriellem RNA-Proofreading, so ist festzustellen, daß der archaeelle Mechanismus, aufgrund der bisher bekannten Daten, eher dem bakteriellen Proofreading entspricht, da erstens Pyrimidine bevorzugt durch Purine falsch eingebaut werden und zweitens Falscheinbau von Ribonukleotiden zum Arrest führt (Erie et al., 1993). Beim Proofreading vor Falscheinbau (Abb. 30), bzw. einer in Anwesenheit zusätzlicher richtiger Nukleotide erfolgenden „Diskriminierung“ von falschen Nukleotiden (bei RNAP II, GMP- statt IMP-Einbau), zeigen sich aber auch Parallelen zum eukaryellen Proofreading (Thomas et al., 1998).

IV 4 DNA-Bausteine als Substrat der RNAP

Ein Mechanismus ähnlich dem des RNAP II-Proofreadings existiert auch in DNA-Polymerasen, bei denen Falscheinbau nicht zum Arrest führt, sondern die Geschwindigkeit des Einbaus des Folgenukleotids herabsetzt und somit eine exonukleolytische Entfernung ermöglicht (Donlin et al., 1991; Goodman et al., 1993). Bei den meisten DNA-Polymerasen ist der Einbau von RNA-Bausteinen in die DNA sterisch verhindert (Kiefer et al., 1998; Cheetham & Steitz, 1999). So hat z. B. die DNA-Polymerase I einen invariablen Glutamarest (Glu⁷¹⁰), welcher den Einlaß und Einbau von NTP sterisch blockiert (Astatke et al., 1998; Joyce, 1997). Die Kristallstruktur der reversen Transkriptase des moloney murine leukemia virus (MMLV) zeigt, daß eine aromatische Aminosäure (Phe¹⁵⁵) durch Interaktionen mit der 2'-OH-Gruppe eines rNTP einen Einlaß ins aktive Zentrum verhindert (Georgiadis, et al., 1995). Wird diese Aminosäure ersetzt (durch Val), so ist das Enzym in der Lage, Ribonukleotide als Substrat in die Produkte einzubauen (Gao et al., 1997). Ein solcher Mechanismus zur sterischen Diskriminierung von DNA-Bausteinen ist aufgrund der Tatsache, daß rNTP „größer“ sind als dNTP, für die RNAP nicht möglich.

Der Ersatz von CTP durch dCTP als Substrat für reife A46-Elongationskomplexe zeigte überraschenderweise, daß *Methanococcus*-RNAP in der Lage war, DNA-Bausteine als Substrat zu verwenden (Abb. 31 bis 34). Bisher ist nur bei mutierten T7-RNAP eine Verwendung von dNTP anstelle von rNTP beschrieben worden (Sousa & Padilla, 1995). Es handelt sich hierbei aber um eine RNAP mit einer

Mutation einer einzigen Aminosäure, die im katalytischen Zentrum für die Substratspezifität zuständig ist (Tyrosin). Auch bei der RNAP II wird aufgrund von Strukturmodellen angenommen, daß eine einzige Aminosäure für die Substratspezifität verantwortlich sein könnte (Gnatt et al., 2001; Cramer et al., 2002). Hierbei soll es sich um ein Asparagin (Asn⁴⁷⁹) im katalytischen Zentrum handeln. Biochemische Befunde sind bisher jedoch noch nicht erbracht worden, des weiteren ist die Entfernung der Aminosäureseitenkette von Asn⁴⁷⁹ (5 Å) für eine spezifische Interaktion mit hereinkommenden Nukleotiden sehr groß. Interessanterweise ist diese Aminosäure auch im katalytischen Zentrum der RNAP von *Methanococcus* konserviert (Abb. 41). Aufgrund der Tatsache, daß die *Methanococcus*-Elongationskomplexe dennoch in der Lage waren, dCMP-Moleküle in die RNA zu inkorporieren (Abb. 31), mußte dies zunächst zweifelsfrei bewiesen werden. Der Einsatz von radioaktivem dCTP mit einer anschließenden Markierung der RNA zeigte indirekt, aufgrund der Tatsache, daß TFS in der Lage war, die Markierung zu entfernen (obwohl radioaktives-dCTP im Ansatz war), daß dCMP eingebaut wurde (Abb. 32 A). Eindeutig bestätigt wurde der dCMP-Einbau wiederum indirekt mit einer vergleichenden Analyse von pApC-Hydrolyseprodukten und pApdC-Hydrolyseprodukten durch das unterschiedliche Laufverhalten im PA/Harnstoffgel und dem zusätzlichen Einsatz eines pApC-Dinukleotidstandards (Abb. 32 B). Auch der Befund, daß dC-Komplexe auf den Matrizen mit drei C-Positionen bei dCTP-Zugaben in höheren Konzentrationen lediglich zwei C-Positionen besetzten, deutete darauf hin, daß es sich tatsächlich um dCMP-Einbau handeln mußte (Abb. 34). Bei einem Einbau von CMP wären alle drei Positionen besetzt worden (Abb. 34 A, Spur 6). Das bedeutet, daß bei *Methanococcus* eine Diskriminierung von dNTP-Einbau nicht einzig durch eine Aminosäure im katalytischen Zentrum der RNAP erfolgen kann.

Die Ergebnisse zeigten aber auch einen fundamentalen Unterschied bezüglich NMP-Falscheinbau und dNMP-Einbau. Während die Komplexe nach UMP-Falscheinbau arretierten, waren dC-Komplexe in der Lage, die Transkription fortzusetzen (Abb. 33). Es wurden jedoch nicht mehr als zwei dCMP in Folge toleriert. *Methanococcus*-Elongationskomplexe zeigten also bezüglich dNMP-Falscheinbau ein dem RNAP II NMP-Falscheinbau analoges Verhalten (Thomas et al., 1998; Jeon & Agarwal, 1996), indem sie nicht arretierten. Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses von TFS bei dNMP-Proofreading, mußte zunächst ermittelt werden, ob die Verlängerung der RNA nach dCMP-Einbau langsamer war als nach CMP-Einbau. Ein Vergleich der Ergebnisse zeigte, daß nach dem Einbau eines dCMP (Abb. 35 A) eine Herabsetzung der Verlängerungsrate erfolgte (um ~15 bis 20fach), welche nach dem Einbau eines zweiten dCMP (Abb. 35 B und nicht gezeigte Daten) nochmals (um das ~4fache) herabgesetzt wurde. Diese Raten sind denen der RNAP II sehr ähnlich, hier ist die Verlängerung nach Falscheinbau

eines GMP für AMP bei RNAP II, abhängig von flankierenden Sequenzen, um das 15 bis 20fache reduziert (Thomas et al., 1998).

Das Verhältnis der Geschwindigkeiten von Hydrolyse-Induktion zu Verlängerung nach dem dCMP-Falscheinbauereignis bestimmt die Effizienz des Proofreadings (Abb. 36 und 37). Hierbei war deutlich zu erkennen, daß im Unterschied zum TFS-vermittelten RNA-Proofreading das DNA-Proofreading nicht so effizient, sondern in einem wesentlich geringeren Umfang erfolgte. Ursächlich hierfür war die, im Vergleich zum UMP-Einbau, um das 5 bis 7fach geringere Herabsetzung der Einbaugeschwindigkeit des Folgenukleotids nach dCMP-Einbau. Mit TFS vermittelt erfolgten aber dennoch weniger Verlängerungsereignisse nach dCMP-Inkorporation als ohne TFS (Abb. 36). Falsch eingebaute Nukleotide werden im eukaryellen System schnell entfernt. Zusätzlich erfolgt eine TFIS-abhängige Diskriminierung von IMP-Einbau (Thomas et al., 1998; Sijbrandi et al., 2002). Hinweise darauf, daß die Hydrolyseaktivierung nach Falscheinbau während kontinuierlicher RNA-Synthese auch bei *Methanococcus* entsprechend schnell erfolgen könnte zeigte die Quantifizierung der „run off“-Transkripte mit und ohne TFS und +/- dCTP (Abb. 37 B). Ob die TFS-vermittelte Erhöhung der Gesamtmenge entstehender „run off“-Transkripte durch eine Diskriminierung oder Entfernung eines Falscheinbaus erfolgt, bleibt zu klären. Eine Untersuchung von möglicherweise entstandenen dCMP-beinhaltenden Hydrolyseprodukten im Verlauf kontinuierlicher RNA-Synthese könnte diese Vermutung bestätigen.

IV 5 RNA-RNAP-Interaktionen

Zur Darstellung des Weges der RNA durch den RNA-Kanal der *Methanococcus jannaschii*-RNAP wurde die Methode des UV-Crosslinkings genutzt (II 7). Bei dem verwendeten Crosslinking-Nukleotid handelte es sich um 8-Azido-GTP. Es wird von einer viralen RNAP, mit einem K_M -Wert von $\sim 94 \mu\text{M}$ (Asano et al., 1995), ungefähr 10fach langsamer eingebaut als normales GTP. Azido-GTP wurde eingesetzt, da es im Gegensatz zu vielen anderen 0-Å-Proben, wie z. B. Azido-ATP, nach Einbau nicht die Ausbildung arretierter Komplexe verursachte (Abb. 38; Asano et al., 1995; Costas et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, daß das 3'-Ende der RNA im katalytischen Zentrum der *Mc. jannaschii*-Elongationskomplexe mit der A'-Untereinheit in direktem (0 Å) Kontakt stand (Abb. 38 und 39). Diese Interaktion veränderte sich im Verlauf der schrittweisen Verlängerung der RNA dahingehend, daß die engen Kontakte mit der A'-Untereinheit im katalytischen Zentrum (Abb. 38, AzG49) und im Verlauf der ersten drei Positionen innerhalb des RNA-DNA-Hybrids schließlich eine stärkere Interaktion mit der A''-Untereinheit aufwiesen (Abb. 39, C52). Drei Positionen weiter (Abb. 39, G55) fanden nahezu

ausschließlich Interaktionen zwischen der A''-Untereinheit und dem RNA-DNA-Hybrid statt. Diese waren jedoch, im Vergleich zu der Stärke der Interaktionen am 3'-Ende der RNA, sehr schwach. Zwei Positionen weiter, an A57, waren keine direkten Interaktionen mehr zu detektieren (Daten nicht gezeigt). Direkte Kontakte zur geteilten zweitgrößten Untereinheit B'/B'' bestanden nur in einem vergleichsweise geringen Umfang.

Aufgrund der bisher fehlenden detaillierten Beschreibung von biochemischen und strukturellen Besonderheiten der archaeellen Elongationsmaschinerie wird im folgenden Abschnitt im wesentlichen vergleichend auf eukaryelle Daten eingegangen.

RNAP sind Enzyme, die die Bildung von 3'-5'-Phosphodiesterbrücken zwischen Ribonukleosidtriphosphaten katalysieren. Aufgrund dieser universellen Ereignisse im Verlaufe der Transkription ist eine hohe Übereinstimmung, sowohl in struktureller als auch funktioneller Natur, bei den RNAP-Untereinheiten zwischen den Domänen zu finden (Langer et al. 1995). Hierbei ist anzumerken, daß die Übereinstimmungen bei den großen Untereinheiten zwischen Eukarya und Archaea am größten sind (Huet et al. 1983; Schnabel et al., 1983).

Die bis dato einzigen Untersuchungen von DNA- oder RNA- RNAP-Interaktionsanalysen archaeeller RNAP mittels UV-Crosslinking wurden an *P. furiosus*-Initiationskomplexen durchgeführt (Bartlett et al., 2000). In der *Pyrococcus*-RNAP ist die größte Untereinheit A, ebenso wie bei *Methanococcus*, aufgeteilt in A' und A''. Diese sind homolog zu den N-terminalen zwei Dritteln und dem C-terminalen Drittel der eukaryellen RPB1 und der größten bakteriellen Untereinheit β' (Langer et al., 1995). DNA-Protein-Crosslinks von *Pyrococcus* Initiationskomplexen ergaben, ebenso wie bei den präsentierten RNA-Protein-Crosslinks am reifen *Methanococcus*-Elongationskomplex, einen Wechsel bei der Interaktion von der A'- zur A''-Untereinheit an unterschiedlichen DNA-Positionen und eine zusätzliche Interaktion mit der B-Untereinheit (jedoch wesentlich stärker). Bei *Pyrococcus* zeigte sich ein DNA-Protein-Crosslink an Position -1 vor dem Transkriptionsstart (entspricht Position A50 mit dem Crosslinkingnukleotid an AzG49) mit gleichem Resultat bezüglich der Stärke der Verteilung an A'- und A''-Untereinheiten. Fehlende stärkere Interaktionen mit der B-Untereinheit (bei *Methanococcus*, im Gegensatz zu *Pyrococcus*, gespalten in B' und B'') könnten durch die Wahl des Crosslinkingnukleotids bedingt sein. Das bei *Pyrococcus* verwendete Nukleotid, AB-dUTP (=5-[N'-(p-azidobenzoyl)-3-aminoallyl]), hat einen größeren Abstand der reaktiven Gruppe im Nukleotid. Beim Azido-GTP muß für ein erfolgreiches Crosslinking der Bereich der Untereinheit im direkten Kontakt mit der Probe sein (0 Å Probe, Crosslinking-Gruppe ist direkt an der Nukleotid Base). Es wurde aber z. B. bei RNAP II-DNA-Crosslinks gezeigt, daß RPB1 mit nur einem DNA-Strang und RPB2 mit dem anderen Strang interagiert (Kim et al., 1997). Das heißt, bei der Verwendung eines Crosslinking-Nukleotids

mit einem größeren Abstand der reaktiven Gruppe, z. B. Azido-UTP als ~ 8 Å Probe (Nudler et al., 1998) oder 8-APAS-ATP als 10 bis 13 Å Probe (Costas et al., 2000), ist es wahrscheinlich, daß auch mögliche Interaktionen zwischen den B-Untereinheiten und dem RNA-Transkript zu erkennen sein werden. Weitere Ergebnisse von DNA-Protein Interaktionen mit *Mc. jannaschii*-Komplexen an A46 (Hausner, pers. Mitteilung) ergaben vergleichbare Resultate. Hier wurde AB-dUTP an Position +37 (entspricht -10 bzw. G55 mit AzG49 im RNA-Kanal) und Position +46 (entspricht -1 bzw. A50) gecrosslinkt. Starke Interaktionen zwischen der A'-Untereinheit und der DNA finden nur an Position +46 statt, an Position +37 existieren weder Interaktionen mit A'- noch mit A''-Untereinheiten (entspricht RNA-Protein-Interaktionen). Aufgrund dieser Befunde ist bezüglich der Orientierung von A' und A'' anzunehmen, daß analog zum Präinitiationskomplex von *Pyrococcus* (Bartlett et al., 2000) A' stromaufwärts von A'' liegt (Hausner, pers. Mitteilung). Bei einem Strukturvergleich mit der *Thermus aquaticus*-Core-RNAP (Zhang et al., 1999) konnte die Übereinstimmung auch in der Konformation verdeutlicht werden (Bartlett et al., 2000).

Bei Elongationskomplexen von *S. cerevisiae* wurden bei den beiden 3'-terminalen RNA-Bausteinen im aktiven Zentrum der RNAP II Interaktionen mit vier Aminosäuren in der RPB1-Untereinheit (Aspartat^{481,483,485}, Arginin⁴⁴⁶) mit einem maximal 4 Å großen Abstand detektiert (Gnatt et al., 2001). Ebenso wurde eine aufgrund der Kristallstruktur für die Substratspezifität vermutlich mitverantwortliche Aminosäure im katalytischen Zentrum (Asparagin⁴⁷⁹) ermittelt (s. auch IV 4). Alle fünf Aminosäuren befinden sich im N-terminalen Bereich der RPB1-Untereinheit, welche bei *Mc. jannaschii* Regionen auf der A'-Untereinheit entsprechen. Die intensivsten Crosslinking-Signale an den beiden 3'-terminalen RNA-Positionen fanden sich bei ternären *Mc. jannaschii*-Komplexen in der A'-Untereinheit (Abb. 38 und 39). Eine vergleichende Analyse der präsentierten Ergebnisse (mit LALIGN, nach Huang & Miller, 1991) mit den RNAP II-Daten zeigt, daß die Bereiche, in denen das 3'-Ende der RNA im katalytischen Zentrum mit der RNAP II in direktem Kontakt steht, auch in *Methanococcus* konserviert sind (Abb. 41). Ausgehend von der Struktur der RPB1-Untereinheit aus *S. cerevisiae* ist anzunehmen, daß beim Austritt der RNA aus dem RNA-Kanal eine Interaktion mit der A''-Untereinheit stattfinden wird. Der Austritt erfolgt dort durch eine Rinne, die in *Methanococcus* von der A''-Untereinheit gebildet wird (Langer et al., 1995; Cramer et al., 2001). Der sichtbare Wechsel der Interaktionen von der A'- zur A''-Untereinheit (Abb. 39) deutet auch dies an.

```

      380      390      400      410      420
S.c.  KTLTYPEVVTYPYNIDRLTQLVRNGPNEHPGAKYVIRDSGDR-----IDLRYSKRAGDI-
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
M.j.  KELTVPEKVTKYNIERIRQLLRNGSEKHPGVNYVIRKMIGRDGTQEYKVKITESNKDFW
      350      360      370      380      390      400

      430      440      450      460      470      480
S.c.  --QLQYGWKVERHIMDNDPVLFNRP448PSLHKMSMAHRVKVIPYSTFRLNLSVTS481PYNADF485
      . . . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
M.j.  AENIREGDIVERHLM448DGDIVLYN448R448PSLHRMSIM448AHRV448RVL448PYRTFRHNLC--PPYNADF485
      410      420      430      440      450      460

      490      500      510      520      530      540
S.c.  478DG481DEMNLHV483PQSEETRAELSQLCAVPLQIVSPQSNKPCMGIVQDTL485CGIRKLT485LRD485TFIE
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
M.j.  478DG481DEMNLHV483PQSEEARAEAEALMLVEKHILSPRFGGPIIGAIHDFISGAYLLT--SNYFT485
      470      480      490      500      510      520

      550      560      570      580      590
S.c.  LDQVLNMLYWVPDWDGVIPTPAIIKPKPLWSGKQILSVAIPNGIHLQ-----RFDEGT
      : . . : : : . . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
M.j.  KDEATLILRSGGIKDELWEPDKVENGVPLYSGKKIFSKALPKGLNLR581YKAKIC583CRKCDVCK585
      530      540      550      560      570      580

```

Abb. 41: Alignment der N-terminalen Region von RPB1 aus *S. cerevisiae* mit der A'-Untereinheit von *Mc. jannaschii*. Dargestellt sind die Regionen, die das katalytische Zentrum bilden. *S.c.* = *S. cerevisiae*, *M.j.* = *Mc. jannaschii*. Identische Aminosäuren sind mit : gekennzeichnet, Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften sind mit . gezeigt. In *S. cerevisiae* mit der RNA in Kontakt stehende und auch in *Mc. jannaschii* konservierte Aminosäuren sind dunkelgrau hinterlegt. Die Aminosäure, die aufgrund von Kristallstrukturanalysen für die Substratspezifität mitverantwortlich sein soll, ist in hellgrau hervorgehoben.

Des Weiteren ist festzustellen, daß ein Bereich von 60 Basen (~440-500 in *S. cerevisiae*) zwischen beiden Untereinheiten hoch konserviert ist. Innerhalb dieses Abschnitts findet sich auch das in allen RNAP konservierte NADFDGD-Motiv im katalytischen Zentrum. Bei den drei Aspartatresten innerhalb dieses Motivs (D^{481,483,485}) handelt es sich um die im RNAP II-Elongationskomplex mit der RNA interagierenden Aminosäuren. Sie binden das Mg²⁺-Ion im katalytischen Zentrum aller RNAP (Zaychikov et al., 1996; Zhang et al., 1999; Cramer et al., 2000; Cramer et al., 2001). Daher bestätigen die gezeigten Crosslinks sowie das präsentierte Alignment die postulierte Anordnung von A'- und A''-Untereinheiten in archaeellen RNAP und die Konservierung der Struktur der katalytischen Untereinheiten aller RNAP.

IV 6 Ausblick

Die präsentierten Ergebnisse haben einen ersten Einblick in verschiedene Bereiche der archaeellen Elongation geschaffen. Dennoch war es im Rahmen dieser Arbeiten selbstverständlich nicht möglich, alle Fragen zur archaeellen Elongation zu beantworten. In Verbindung mit dem Einsatz des Elongationsfaktors TFS können weitere Aspekte der archaeellen Elongation, z. B. Ereignisse beim „Promoter-escape“ oder dem Überlesen von Hindernissen auf der DNA, untersucht werden.

Dennoch sind auch im direkten Anschluß an diese Arbeiten noch viele interessante Fragen zu klären, von denen einige hier gestellt werden sollen.

Wo ist die RNAP-Kontaktstelle bei der Hydrolyse-Aktivierung durch TFS, bzw. bindet TFS bei der Aktivierung an Nukleinsäuren? Mit Hilfe von Protein-Protein- bzw. RNA/DNA-Protein-Crosslinking-Analysen sollte diese Frage beantwortet werden können.

Wie wird das Signal zur Hydrolyse-Induktion übertragen? Bei der RNAP II vermittelt die RPB9-Untereinheit das Signal von TFIIIS an das katalytische Zentrum. Diese Untereinheit fehlt archaeellen RNAP. TFS besitzt ebenso wie die RPB9-Untereinheit zwei Zinkfinger motive. Daher ist es spannend herauszufinden, ob TFS bei der Signalübertragung sozusagen eine „Doppelfunktion“ ausübt oder mit einer anderen Untereinheit als Partner interagiert. Diese Frage könnte mit einer Kombination von Mutationsanalysen (insbesondere der essentiellen D- und E-Reste, s. I Einleitung) und Protein-Protein-Crosslinking beantwortet werden.

Erfolgt ein Arrest von *Methanococcus*-Elongationskomplexen immer unabhängig von einem Zurückgleiten auf der DNA? Diese Frage sollte durch die Verwendung von DNA-Matrizen mit unterschiedlichen Sequenzen beantwortet werden. Bezogen auf Vergleiche eukaryeller und bakterieller Systeme sollten UA-reiche Sequenzfolgen ein Zurückgleiten bedingen und bei reifen Komplexen, aufgrund der verminderten intrinsischen Hydrolyse-Aktivität, zum Arrest führen.

Welche Dimension hat das RNA-DNA-Hybrid in reifen ternären Komplexen tatsächlich? Bei der Präsentation der RNA-RNAP-Interaktionen (III 6) wurden Elongationskomplexe gezeigt, die schrittweise verlängert wurden. Wenn man diese Komplexe mit KMnO_4 analysiert, sollte man die genaue Größe bestimmen können. Führt der Falscheinbau von RNA-Bausteinen immer zum Arrest? Die Untersuchungen zum Mechanismus des archaeellen Proofreadings zeigten, daß Falscheinbau von UMP bei reifen Komplexen immer einen Arrest zur Folge hatte. Das Verhalten der Komplexe nach dCMP-Einbau läßt vermuten, daß ein Falscheinbau von Ribonukleotiden eventuell auch ohne einen anschließenden Arrest erfolgen könnte. Durch die Analyse von Falscheinbau anderer Nukleotide an unterschiedlichen Positionen oder die Verwendung anderer DNA-Matrizen, sollte zweifelsfrei bestätigt werden können, ob Komplexe nach Ribonukleotid-Falscheinbau immer arretieren.

Welche Interaktionen bestehen zwischen den Untereinheiten B', B'' und der RNA? Durch den Einsatz von Crosslinking-Nukleotiden mit größeren Abständen der reaktiven Gruppen sollten auch die Interaktionen zwischen der RNA und den B-Untereinheiten dargestellt werden können. Des weiteren sollte es möglich sein, durch eine Kombination chemischer, sequenzspezifischer Spaltungen von isolierten RNAP-Untereinheiten die interagierenden Aminosäuren zu identifizieren. Bei der isolierten nicht-markierten A'-Untereinheit von *Mc*.

jannaschii ist die sequenzspezifische Spaltung schon erfolgreich durchgeführt worden (Daten nicht gezeigt).

Anschließend an diese Arbeiten zur Elongation bei Archaea eröffnet sich eine weitere interessante Frage: welche Aufgaben übernehmen andere archaeele Elongationsfaktoren? Im Genom von *Mc. jannaschii* sind zwei weitere potentielle Elongationsfaktoren identifiziert worden. Hierbei handelt es sich um Proteine die homolog zu den bakteriellen Elongationsfaktoren NusA und NusG (Kyrpides et al., 1996) sind. Diese Proteine liegen mittlerweile in rekombinanter Form vor. Erste Arbeiten mit diesen Faktoren (Schmeling, 2002) deuten ähnliche Funktionen in der archaeele Elongation an. Durch den Einsatz in die immobilisierte *in vitro*-Transkription und Anwendung der von uns etablierten Techniken, sollten auch die Funktionen dieser Proteine identifiziert bzw. charakterisiert werden können.

Die archaeele Transkriptionsmaschinerie ähnelt mit ihren drei Promotorelementen, den Transkriptionsfaktoren α TBP und TFB und einer RNAP mit 10-12 Untereinheiten, einer basalen Ausführung des RNAP II-Systems. Da im Gegensatz zur Initiation die Elongation der Transkription und potentielle Elongationsfaktoren bisher noch nicht untersucht sind, wurden in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe eines *in vitro*-Transkriptionssystems für *Methanococcus thermolithotrophicus* und der Methode der immobilisierten Transkription entsprechende Untersuchungen zur Elongation der Transkription durchgeführt. Im einzelnen wurde ein dem Elongationsfaktor TFIIS in der Aminosäuresequenz ähnliches Protein als archaeele Elongationsfaktor charakterisiert, Unterschiede bei frühen und reifen Elongationskomplexen dargestellt und RNA-Protein-Interaktionen innerhalb des RNA-Kanals eines reifen Elongationskomplexes untersucht. Zusätzlich wurde die Funktion des Elongationsfaktors in bezug auf archaeeles Proofreading analysiert. Hierbei wurde auch untersucht, ob die RNAP von *Mc. thermolithotrophicus* DNA-Bausteine als Substrat verwerten konnte.

Im Verlaufe immobilisierter *in vitro*-Transkriptionen konnte gezeigt werden, daß das TFIIS-homologe Protein in pausierten *Methanococcus*-Elongationskomplexen eine intrinsische Nukleaseaktivität der RNAP verstärkte. Nach einer Entfernung von Nukleotiden war eine fortlaufende Hydrolyse von Dinukleotiden, verbunden mit dem Zurückgleiten der RNAP, zu beobachten. Des weiteren wurden arretierte Komplexe in Anwesenheit des Elongationsfaktors reaktiviert. Aufgrund der vorhandenen Sequenzhomologie zum TFIIS und der ähnlichen biochemischen Eigenschaften des Proteins, wurde es von uns als archaeele Transkriptionsfaktor S (TFS) bezeichnet.

In Anwesenheit von Nukleotiden vermittelt TFS einen Hydrolyse-Resynthese-Mechanismus in gestellten Komplexen. Dieser besteht aus der Hydrolyse eines Dinukleotids vom 3'-Ende der RNA im katalytischen Zentrum, gefolgt von einer schnellen Resynthese verkürzter RNA. Eine Hydrolyseinduktion erfolgte ungefähr alle 30 Sekunden. Im Gegensatz zu TFIIS war TFS in der Lage, in der abortiven Phase der Transkription an Position +4/5 nach dem Transkriptionsstart die intrinsische Nukleaseaktivität der RNAP zu induzieren. Der Mechanismus der TFS-vermittelten RNA-Hydrolyse ist damit potentiell ein anderer, da kein vollständiges RNA-DNA-Hybrid und keine 13 B lange RNA benötigt wurden.

Archaeeles Proofreading erfolgte mit Hilfe des TFS-induzierten Hydrolyse-Resynthese-Mechanismus, sowohl präinkorporativ als auch postinkorporativ. Falscheinbau von Ribonukleotiden durch reife Elongationskomplexe erfolgte in Abhängigkeit von der Temperatur, der Inkubationsdauer, dem Nukleotid und seiner Konzentration. *Methanococcus*-RNAP baute UMP quantitativ anstelle von CMP in die RNA-Kette ein. Der UMP-Einbau erfolgte circa 350-500fach langsamer. Durch den Falscheinbau kam es zum Arrest der Komplexe. RNase-Footprinting zeigte, daß die RNAP, im Gegensatz zur RNAP II, bei diesem Arrest nicht auf der DNA

zurücklief. TFS war in der Lage, die Komplexe zu reaktivieren und dabei das falsch eingebaute Nukleotid innerhalb eines Dinukleotid-Hydrolyseproduktes zu entfernen. Das bedeutete, daß der arretierte Komplex auch nicht das 3'-Ende der RNA aus dem katalytischen Zentrum verlor.

Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß DNA-Bausteine als Substrat genutzt wurden. Nach dCMP-Einbau anstelle von CMP, erfolgte kein Arrest. Die Verlängerungsrate wurde jedoch um das ~15 bis 20fache (nach dem Einbau eines dCMP) bis ~60 bis 80fache (nach dem Einbau von zwei dCMP in Folge) herabgesetzt. TFS war in der Lage, das Ausmaß verlängerter RNA nach zwei dCMP-Einbauereignissen zu verringern.

Mit Hilfe von Exo III-, KMnO₄-, RNase A- und T1-Footprinting konnten Unterschiede zwischen früher und reifer Elongation anhand einer vergleichenden Charakterisierung früher und reifer Komplexe ermittelt werden. Im Gegensatz zu reifen Komplexen hatten frühe Komplexe stromaufwärts-translozierte Exo III-Begrenzungen, obwohl sie Transkriptions-kompetent waren. Des weiteren besaßen sie erweiterte RNase A- und T1-Schutzmuster, eine erhöhte intrinsische Hydrolyseaktivität und wurden bei Mg²⁺-Mangel leichter freigesetzt. Erweitert wurden die Stromabwärts-Begrenzungen früher und reifer Komplexe in Anwesenheit von TFS nach erfolgter RNA-Hydrolyse vermutlich durch die Bindung an die DNA.

In reifen, Transkriptions-kompetenten *Mc. jannaschii*-Elongationskomplexen wurden mit Hilfe von UV-Crosslinking die Interaktionen zwischen RNA und RNAP-Untereinheiten der ersten 5 bis 7 B RNA innerhalb des RNA-DNA-Hybrids analysiert. Dieses umfasst maximal 8 Bp, wie mit Hilfe von KMnO₄-Footprinting gezeigt wurde. Die Interaktionen wechselten im Verlauf der schrittweisen Verlängerung der RNA von der A'- zur A''-Untereinheit. In pausierten RNAP II-Komplexen sind 4 Kontaktstellen an der RPB1-Untereinheit innerhalb der ersten zwei 3'-terminalen RNA-Positionen identifiziert worden. Ein Alignment zwischen der A'-Untereinheit und der RPB1-Untereinheit zeigte, daß diese Aminosäuren auch in der RNAP von *Mc. jannaschii* konserviert sind und unterstreicht die evolutionäre und strukturelle Konservierung der katalytischen Zentren aller RNAP.

The archaeal transcription machinery resembles a primitive version of the RNAP II system with its three promoter elements, the transcription factors aTBP and TFB, and a 10-12 subunit RNAP. In contrast to initiation, only little is known about elongation of transcription or potential elongation factors. In this thesis appropriate investigations were done, using a cell-free transcription system for *Methanococcus thermolithotrophicus* and employing the method of immobilised transcription. In particular, a TFIIS homologue protein was characterised as an archaeal elongation factor, differences between early and mature elongation complexes were presented, and RNA-protein interactions within the RNA channel of a mature complex were investigated. Additionally, the analysis of the function of the elongation factor in transcriptional proofreading was analysed. During this work it was also investigated whether the RNAP of *Mc. thermolithotrophicus* was able to incorporate DNA-monomers as a substrate for transcription.

Employing immobilised *in vitro* transcription, we demonstrated that the TFIIS homologue protein stimulated the intrinsic nuclease activity in paused *Methanococcus* elongation complexes. After removal of nucleotides, a constant release of dinucleotide hydrolysis products was observed, combined with backsliding of the RNAP on the DNA. Additionally, arrested complexes were reactivated in the presence of this protein. Due to the sequence homology to TFIIS and its similar biochemical properties, the protein was named transcription factor S, TFS.

TFS induces a hydrolysis-resynthesis mechanism in halted complexes with the release of a dinucleotide from the 3'-end of the nascent RNA, followed by fast resynthesis of the shortened transcript. Hydrolysis induction occurred about every 30 seconds. In contrast to TFIIS, TFS was also able to stimulate the intrinsic nuclease activity of the RNAP in the abortive phase of transcription at registers 4 or 5. This led to the conclusion that TFS-mediated RNA hydrolysis may be different, because neither a complete RNA-DNA hybrid nor a 13 nt RNA were needed.

Archaeal proofreading occurred in a pre- and postincorporation manner, due to TFS-induced hydrolysis-resynthesis. Misincorporation of ribonucleotides was dependent on the chosen nucleotide, its concentration, temperature, and incubation time. *Methanococcus* RNAP quantitatively incorporated a false UMP instead of CMP, with a slowed incorporation rate of about 350 to 500 times. After misincorporation occurred, these complexes arrested. RNase-footprinting of arrested complexes showed that, in contrast to RNAP II, they were not backtracked. TFS was able to reactivate these complexes, accompanied by the release of the misincorporated nucleotide within a dinucleotide hydrolysis product. This led to the conclusion that the 3'-end of the nascent RNA remained in the catalytic centre of the RNAP.

In the course of these investigations we could demonstrate that DNA-monomers were used as substrate for transcription. Following dCMP- instead of CMP-incorporation, complexes did not arrest. Instead, the rate of extension was slowed down by ~15 to 20 times (when one dCMP was incorporated) to ~60 to 80 times (when two dCMP were incorporated in a series). TFS was able to minimize the amount of extended RNA when two dCMP were incorporated.

Using Exo III-, KMnO_4 -, RNase A-, and T1-footprinting differences in early and mature elongation or elongation complexes could be determined. In contrast to mature complexes, the early complexes had upstream-translocated Exo III-boundaries even though they were transcriptionally competent. They also had expanded RNase A- and T1-protection patterns, an increased intrinsic nuclease activity and were more sensitive to the lack of Mg^{2+} . Following TFS-induced cleavage and backsliding, the Exo III-downstream boundaries were enlarged. This was most probably due to DNA binding of TFS.

Using the technique of UV-crosslinking, the interactions between RNAP subunits and the first 5 to 7 nt RNA within the RNA-DNA-hybrid were determined in halted *Mc. jannaschii* complexes. KMnO_4 -footprints revealed that the hybrid consisted of maximal 8 bp. Within the gradual transcription, the interactions between the RNA and RNAP subunits shifted from A'- to A''-subunit. In halted RNAP II complexes four positions in the RPB1-subunit, which were in close contact with the two 3'-terminal RNA-positions, were determined. An alignment with the A'- and RPB1-subunit revealed that the contact amino acids were conserved in *Mc. jannaschii*. This underlines the evolutionary and structural conservation of the catalytic centres of all RNAP.

VII Literaturverzeichnis

Agarwal K., Baek K.H., Jeon C.J., Miyamoto O., Uemo A. & Yoon H.S. (1991), Stimulation of transcript elongation requires both the zincfinger and RNA polymerase II binding domains of human TFIIS. *Biochemistry* **30**: 7842-7851.

Aravind L. & Koonin E. (1999), DNA-binding proteins and evolution of transcription regulation in the archaea. *Nucl. Acids Res.* **27**: 4658-4670.

Arndt K.M. & Chamberlin M.J. (1990), RNA chain elongation by *Escherichia coli* RNA polymerase. Factors affecting the stability of elongating ternary complexes. *J. Mol. Biol.* **213**: 79-103.

Artsimovitch I. & Landick R. (2000), Pausing by bacterial RNA polymerase is mediated by mechanistically distinct classes of signals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 7090-7095.

Asano Y., Mizumoto K., Maruyama T. & Ishihama A. (1995), Photoaffinity labeling of influenza virus RNA polymerase PB1 subunit with 8-AzG. *J. Biochem.* **117**: 677-682.

Aso T., Conaway J.W. & Conaway R.C. (1995), The RNA Polymerase II elongation complex. *FASEB J.* **9**: 1419-1428.

Astatke M., Ng K., Grindley N.D.F. & Joyce C.M. (1998), A single side chain prevents *Escherichia coli* DNA polymerase I (Klenow fragment) from incorporating ribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 3402-3407.

Awrey D.E., Shimasaki N., Koth C., Weilbaecher R., Olmstedt V., Kazanis S., Shan X., Arellano J., Arrowsmith C.H., Kane C.M. & Edwards A.M. (1998), Yeast transcript elongation factor (TFIIS), structure and function. *J. Biol. Chem.* **35**: 22595-22605.

Awrey D.E., Weilbaecher R.G., Hemming S.A., Orlicky S.M., Kane C.M. & Edwards A.M. (1997), Transcription elongation through arrest sites. *J. Biol. Chem.* **23**: 14747-14754.

Barns S.M., Fundyga R.E., Jeffries M.W. & Pace N.R. (1994), Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 1609-1613.

Barns S.M., Delwiche C.F., Palmers J.D. & Pace N.R. (1996), Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 9188-9193.

Bartlett M.S., Thomm M. & Geiduschek E.P. (2000), The orientation of DNA in an archaeal transcription initiation complex. *Nature Struct. Biol.* **7**: 782-785.

Bell S.D., Kosa P.L., Sigler P.B. & Jackson S.P. (1999), Orientation of the transcription complex in archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 13662-13667.

Bell S.D. & Jackson S.P. (1998a), Transcription in Archaea. *Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology* **LXIII**: 41-51.

Bell S.D. & Jackson S.P. (1998b), Transcription and translation in Archaea: a mosaic of eukaryal and bacterial features. *Trends. Microbiol.* **6**: 222-228.

Bell S.D. & Jackson S.P. (2000), Charting a course through RNA polymerase. *Nature Struct. Biol.* **9**: 703-705.

Böhlke K., Pisani F.M., Rossi M. & Antranikian G. (2002), Archaeal DNA replication: spotlight on a rapidly moving field. *Extremophiles* **6**: 1-14.

Bobkova E.V. & Hall B.D. (1997), Substrate specificity of the RNase activity of yeast RNA polymerase III. *J. Biol. Chem.* **272**: 22832-22839.

Borukov S., Polyakov A., Nikiforov V. & Goldfarb A. (1992), Gre a protein: a transcription elongation factor from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 8899-8902.

Borukov S., Sagitov V. & Goldfarb A. (1993), Transcript cleavage from *E. Coli*. *Cell* **72**: 459-466.

Bradsher J.N., Jackson K.W., Conaway R.C. & Conaway J.W. (1993), RNA polymerase II transcription factor SIII. I. Identification, purification, and properties. *J. Biol. Chem* **34**: 25587-25593.

Briand J.F., Navarro F., Rematier P., Boschiero C., Labarre S., Werner M., Shpakovski G.V. & Thuriaux P. (2001), Partners of Rpb8p, a small subunit shared by yeast RNA polymerases I, II and III. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 6056-6065.

Brinkmann A.B., Dahlke I., Tuininga J.E., Lammers T., Dumay V., De Heus E., Lebbink J.H.G., Thomm M. & De Vos W.M. (2000), An Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus* is negatively autoregulated. *J. Biol. Chem.* **275**: 38160-38169.

Brown J. & Doolittle W. (1997), Archaea and the Prokaryote-to-Eucaryote Transition. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 456-502.

Bult C.J., White O., Olsen G.J., Zhou L., Fleischmann R.D., Sutton G.G., Blake J.A., Fitzgerald L.M., Clayton R.A., Gocayne J.D. *et al.* (1996), Complete genome sequence of the methanogenic archaeon *Methanococcus jannaschii*. *Science* **272**: 1058-1073.

Burns H.D., Ishihama A. & Minchin S.D. (1999), Open complex formation during transcription initiation at the *Escherichia Coli galP1* promoter: the role of the RNA polymerase α subunit at promoters lacking up-element. *Nucleic Acids Res.* **27**: 2051-2056.

Cai H. & Luse D.S. (1987), Variations in template protection by the RNA polymerase II transcription complex during the initiation complex. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 3371-3379.

Campbell E.A., Korzheva N., Mustaeiev A, Murakami K., Nair S., Goldfarb A. & Darst S.A. (2001), Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell* **104**: 901-912.

Chamberlin M.J. (1995), *Harvey Lectures* **88**: 1-21.

Chédin S., Riva M., Schultz P., Sentenac A. & Carles C. (1998), The RNA cleavage activity of RNA polymerase III is mediated by an essential TFIIS-like subunit and is important for transcription termination. *Genes & Development* **12**: 3857-3871.

Cheetham G.M.T. & Steitz T.A. (1999), Structure of a transcribing T7 RNA polymerase initiation complex. *Science* **286**: 2305-2309.

Ciprés-Palacin G. & Kane C.M. (1995), Alanine-scanning mutagenesis of human transcript elongation factor TFIIS. *Biochemistry* **34**: 15375-15380.

- Conaway J.W., Shilatifard A., Dvir A. & Conaway R.C. (2000), Control of elongation by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 375-380.
- Coppola J.A. & Luse D.S. (1984), Purification and characterization of ternary complexes containing accurately initiated RNA polymerase II and less than 20 nucleotides of RNA. *J. Mol. Biol.* **15**: 415-437.
- Costas C., Yuriev E., Meyer K.L., Guion T.S. & Hanna M.M. (2000), RNA-protein crosslinking to AMP residues at internal positions in RNA with a new photocrosslinking ATP analog. *Nucleic Acids Res.* **28**: 1849-1858.
- Cramer P., Bushnell D.A., Fu J., Gnatt A.L., Maier-Davis B., Thompson N.E., Burgess R.R., Edwards A.M., David P.R. & Kornberg R.D. (2000), Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science* **288**: 640-649.
- Cramer P., Bushnell D.A. & Kornberg R.D. (2001), Structural basis of transcription: RNA polymerase at 2.8 Å resolution. *Science* **292**: 1863-1876.
- Cramer P. (2002), Multisubunit RNA polymerases. *Current opinion in struc. Biol.* **12**: 89-97.
- Dahlke I. & Thomm M. (2001), A *Pyrococcus* homologue of the leucine responsive regulatory protein, LrpA, inhibits transcription by abrogating RNA polymerase recruitment. *Nucl. Acids Res.* **30**: 701-710.
- Darcy T.J., Hausner W., Awery D.E., Edwards A.M., Thomm M. & Reeve J. (1999), *Methanobacterium thermoautotrophicum* RNA polymerase and transcription *in vitro*. *J. Bacteriol.* **181**: 4424-4429.
- Darst S.A., Kubalek E.W. & Kornberg R.D. (1989), Three-dimensional structure of *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme determined by electron crystallography. *Nature* **340**: 730-732.
- deHaseth P.L. & Helmann J.D. (1995), Open complex formation by *Escherichia coli* RNA polymerase: the mechanism of polymerase-induced strand separation of double helical DNA. *Mol. Microbiol.* **16**: 817-824.
- De Long E.F., Wu K.Y., Prezelin B.B. & Jovine R.V.M. (1994), High abundance of Archaea in antarctic marine picoplankton. *Nature* **371**: 695.
- Dennis P.P. (1997), Ancient ciphers: translation in Archaea. *Cell* **89**: 1007-1010.
- Donlin M.J., Patel S.S. & Johnson K.A. (1991), Kinetic partitioning between the exonuclease and polymerase sites in DNA error correction. *Biochemistry* **30**: 538-546.
- Donlin M.J. & Johnson K.A. (1994), Mutants affecting nucleotide recognition by T7 DNA polymerase. *Biochemistry* **33**: 14908-14917.
- Doublie S., Tabor S., Long A.M., Richardson C.C. & Ellenberger T. (1998), Crystal structure of a bacteriophage T7 DNA replication complex at 2,2 Å resolution. *Nature* **391**: 251-258.
- Drake J.W. (1991), A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 7160-7164.

- Dvir A. (2002), Promotor escape by RNA polymerase II. *Biochim. Biophys. Acta* **1577**: 208-223.
- Erie D.A., Hajiseyedjavadi O., Young M.C. & von Hippel P.H. (1993), Multiple RNA polymerase conformations and GreA: control of the fidelity of transcription. *Science* **262**: 867-73.
- Fiedler U. & Timmers H.T.M (2001), Analysis of the open region of RNA polymerase II transcription complexes in the early phase of elongation. *Nucleic Acids Res.* **29**: 2706-2714.
- Fish R.N. & Kane C.M. (2002), Promoting elongation with transcript stimulatory factors. *Biochim. Biophys. Acta* **1577**: 287-307.
- Forterre P., Brochier C. & Phillipe H. (2002), Evolution of the Archaea. *Theor. Popul. Biol.* **61**: 409-422.
- Frey G., Thomm M., Brudigam B., Gohl H.P. & Hausner W. (1990), An archaebacterial cell-free transcription system. The expression of tRNA genes from *Methanococcus vannielii* is mediated by a transcription factor. *Nucl. Acids. Res.* **18**: 1361-1377.
- Fu J., Gnatt A.L., Bushnell D.A., Jensen G.J., Thompson N.E., Burgess R.R., David P.R & Kornberg R.D. (1999), Yeast RNA polymerase II at 5 Å resolution. *Cell* **98**: 799-810.
- Galagan J.E., Nusbaum C., Roy A., Endrizzi M.G. MacDonald P., FitzHugh W., Calvo S. & *et al.* (2002), The genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. *Genome Res.* **12**: 532-542.
- Gambacorta D., Tricone F., Nicolaus G.H. & DeRosa R. (1993), Unique features of lipids of Archaea. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**: 18-27.
- Gao G., Orlova M., Georgiadis M.M., Hendrickson W.A. & Goff S.P. (1997), Conferring RNA polymerase activity to a DNA polymerase: a single residue in reverse transcriptase controls substrate selection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 407-411.
- Garcia-Vallve S., Romeu A. & Palau J. (2000), Horizontal gene transfer in bacterial archaeal complete genomes. *Genome Res.* **10**: 1719-1725.
- Gelles J., and Landick R. (1998), RNA polymerase as a molecular motor. *Cell* **93**: 13-16.
- Georgiadis M.M., Jessen S.M., Ogata C.M., Telesnitsky A., Goff S.P. & Hendrickson W.A. (1995), Mechanistic implications from the structure of a catalytic fragment of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *Structure* **3**: 879-892.
- Giulio M.D. (2003), The universal ancestor was a thermophile or a hyperthermophile: tests and further evidence. *J. Theor. Biol.* **221**: 425-436.
- Gnatt A.L., Cramer P., Fu J., Bushnell D.A. & Kornberg R.D. (2001), Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science* **292**: 1876-1882.
- Gnatt A. (2002), Elongation by RNA polymerase II: structure-function relationship. *Biochim. Biophys. Acta* **1577**: 175-190.

Gohl H.P., Gröndahl B., & Thomm M. (1995), Promotor recognition in archaea is mediated by transcription factors: identification of transcription factor aTFB from *Methanococcus thermolithotrophicus* as archaeal TATA-binding protein. *Nucl. Acids. Res.* **19**: 3837-3841.

Gohl H.P., Hausner W. & Thomm M. (1992), Cell-free transcription of the *nifHI* gene of *Methanococcus thermolithotrophicus* indicates that promoters of archaeal *nif* genes share basic features with the methanogen consensus promoter. *Mol. Gen. Genet.* **231**: 286-295.

Goodman M.F., Creighton S., Bloom L.B., and Petruska J. (1993), Biochemical basis of DNA replication fidelity. *Critc. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**: 83-126.

Graham D., Overbeek R., Olsen G & Woese C.R. (2000), An archaeal genomic signature. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 3304-3308.

Gu W., Powell W., Mote Jr. J. & Reines D. (1993), Nascent RNA cleavage by arrested RNA polymerase II does not require upstream translocation of the elongation complex on DNA. *J. Biol. Chem.* **34**: 25604-25616.

Gu W., Wind M. & Reines D. (1996), Increased accomodation of nascent RNA in a product site on RNA polymerase II during arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 6935-6940.

Guajardo R & Sousa R (1997), A model for mechanism of polymerase translocation. *J. Mol. Biol.* **265**: 8-19.

Hanzelka B.L., Darcy T.J. & Reeve J.N. (2001), TFE, an archaeal transcription factor in *Methanobacterium thermoautotrophicum* related to eukaryal transcription factor TFIIIE α . *J. Bacteriol.* **183**: 1813-1818.

Harrison B. & Zimmerman S.B. (1986), T4 polynucleotid kinase: macromolecular crowding increases the efficiency of reaction at DNA termini. *EMBO J.* **4**: 2695-2703.

Hausner W., Frey G. & Thomm M. (1991), Control regions of an archaeal gene. A TATA box and an initiator element promote cell-free transcription of the tRNA(Val) gene of *Methanococcus vannielii*. *J. Mol. Biol.* **3**: 495-508.

Hausner W. & Thomm M. (1993), Purification and characterization of a general transcription factor, aTFB, from the archaeon *Methanococcus thermolithotrophicus*. *J. Biol. Chem.* **268**: 24047-24052.

Hausner W. & 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* transcription factor B. *J. Biol. Chem.* **270**: 17649-17651.

Hausner W., Wettach J., Hethke C. & 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.

Hausner W., Lange U. & Musfeld M. (2000), Transcription factor S, a cleavage induction factor of the archaeal RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **275**: 12393-12399.

Hausner W. & Thomm M. (2001), Events during initiation of archaeal transcription: open complex formation and DNA-protein interactions. *J. Bacteriol.* **183**: 3025-3031.

Hemming S.A., Jansma D.B., MacGregor P.F., Goryachev A., Friesen J.D. & Edwards A.M. (2000), RNA polymerase II subunit Rpb9 regulates transcription elongation *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **275**: 35506-35511.

Hethke C., Geerling A.C., Hausner W., de Vos W.M. & Thomm M. (1996), A cell-free transcription system for the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Nucl. Acids Res.* **24**: 2369-2376.

Heukeshoven J. & Dernick R. (1988), Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* **9**: 28-32.

Hohn M.J., Hedlund B.P. & Huber H. (2002), "Nanoarchaeota": indication for a wide distribution in high temperature biotopes. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**: 551-554.

Holstege F.C.P., Fiedler U. & Timmers H.T.M. (1997), Three transitions in the RNA polymerase II-transcription complex during initiation. *EMBO J.* **16**: 7468-7480.

Huang H.S., Buxton D., Burrells C., Anderson I.E. & Miller H.R. (1991), Immune response of the ovine lymph node to *Chlamydia psittaci*. A cellular study of popliteal efferent lymph. *J. Comp. Pathol.* **105**: 191-202.

Huang J., Brieba L.G. & Sousa R. (2000), Misincorporation by wild-type and mutant T7 RNA polymerases: identification of interactions that reduce misincorporation rates by stabilizing the catalytically incompetent open conformation. *Biochemistry* **38**: 11571-11580.

Huber H., Thomm M., König J., Thies G. & Stetter K.O. (1982), *Methanococcus thermolithotrophicus*, a novel thermophilic lithotrophic methanogen. *Arch. Microbiol.* **1332**: 47-50.

Huber H., Hohn M.J., Rachel R., Fuchs T., Wimmer V.C. & Stetter K.O. (2002), A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**: 63-67.

Hüdepohl U., Reiter W.D. & Zillig W. (1990), *In vitro* transcription of two rRNA genes of the archaebacterium *Sulfolobus* sp. B12 indicates a factor requirement for specific initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 5851-5855.

Huet J., Schnabel R., Sentenac A. & Zillig W. (1983), Archaeobacteria and eukaryotes possess DNA-dependent RNA polymerases of a common type. *EMBO J.* **2**: 1291-1294.

Ide H., Yagi R., Yamaoka T., & Kimura Y. (1993), Misincorporation of nucleotides by DNA polymerase during *in vitro* replication. *Nucl. Acids Symp Ser.* **29**: 133-134.

Imbalzano A.N., Kwon H., Green M.R. & Kingston R.E. (1994), Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA. *Nature* **370**: 417-418.

Innis M.A., Myambo D.H., Gelfand D.H. & Brown A.D. (1988), DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction amplified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**: 9436-9440.

- Ishiguro A., Nogi Y., Hisatake K., Muramatsu M. & Ishihama A. (2000), The RPB6 subunit of fission yeast RNA polymerase II is a contact target of the transcription elongation factor TFIIS. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 1263-1270.
- Izban M. & Luse D.S. (1992), Factor stimulated RNA polymerase II transcribes at physiological elongation rates on naked DNA but very poorly on chromatin templates. : 13647-13655.
- Izban M. & Luse D.S. (1993a), SII-facilitated transcript cleavage in RNA polymerase II complexes stalled early after initiation occurs in primarily dinucleotide increments. *J. Biol. Chem.* **268**: 12864-12873.
- Izban M. & Luse D.S. (1993b), The increment of SII-facilitated transcript cleavage varies dramatically between elongation competent and incompetent RNA polymerase II ternary complexes. *J. Biol. Chem.* **268**: 12874-12885.
- Jain R., Rivera M. & Lake J. (1999), Horizontal gene transfer among genomes: The complexity hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 3801-3806.
- Jeon C.J. & Agarwal K. (1996), Fidelity of RNA polymerase II transcription controlled by elongation factor TFIIS. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 13677-13682.
- Jeon C.J., Yoon H.S. & Agarwal K. (1994), The transcription factor TFIIS zinc ribbon dipeptide Asp-Glu is critical for stimulation of elongation and RNA cleavage by RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 9106-9110.
- Jiang Y. & Gralla J.D. (1995), Nucleotide requirements for activated RNA polymerase II open complex formation *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **270**: 1277-1281.
- Johnson K.A. (1993), Conformational coupling in DNA polymerase fidelity. *Annu. Rev. Biochem.* **62**: 685-713.
- Jones W.J., Leigh J.A., Mayr F., Woese C.R. & Wolfe R.S (1984), *Methanococcus jannaschii* sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. *Arch. Microbiol.* **136**: 254-261.
- Joyce C.M. (1997), Choosing the right sugar: how polymerases select a nucleotide substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 1619-1622.
- Kaine B.P., Mehr I.J. & Woese C.R. (1994), The sequence, and its evolutionary implications, of a *Thermococcus celer* protein associated with transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 3854-56.
- Kandler O. & König H. (1998), Cell wall polymers in Archaea. *Cell Mol. Life Sci.* **54** : 305-308
- Karner M.B., DeLong E.F. & Karl D.M. (2001), Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* **409** : 507-509.
- Keene R.G. & Luse D.S. (1999), Initially transcribed sequences strongly effect the extent of abortive initiation by RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* **274**: 11526-11534.
- Kerppola T.K. & Kane C.M. (1991), RNA polymerase: regulation of transcript elongation and termination. *FASEB J.* **5**: 2833-2842.
- Kiefer J.R., Mao C., Bramann J.C. & Beese L.S. (1998), Visualizing DNA replication in a catalytically active *Bacillus* DNA polymerase crystal. *Nature* **391**: 304-307.

Kim T.K., Lagrange T., Wang Y.H., Griffith J.D., Reinberg D. & Ebright R.H. (1997), Trajectory of DNA in the RNA polymerase II transcription preinitiation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 12268-12273.

Kireeva M.L., Komissarova N, Waugh D.S. & Kashlev M. (2000), The 8-nucleotide-long RNA :DNA Hybrid is a primary stability determinant of the RNA polymerase II elongation complex. *J. Biol. Chem.* **275**: 6530-6536.

Klenk H.-P., Renner O., Schwass V. & Zillig W. (1992), Nucleotide sequence of the genes encoding the subunits H, B, A' and A'' of the DNA-dependent RNA polymerase and the initiation tRNA from *Thermoplasma acidophilum*. *Nucl. Acids. Res.* **20**: 5226.

Komissarova N. & Kashlev M. (1997a), Transcriptional arrest: *Escherichia coli* RNA polymerase translocates backward, leaving the 3' end of RNA intact and extruded. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 1755-1760.

Komissarova N. & Kashlev M. (1997b), RNA polymerase switches between inactivated and activated states translocating back and forth along the DNA and the RNA. *J. Biol. Chem.* **272**: 15329-15338.

Komissarova N. & Kashlev M. (1998), Functional topography of nascent RNA in elongation intermediates of RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 14699-14704.

Korzheva N., Mustaev A., Nudler E., Nikiforov V. & Goldfarb A. (1998), Mechanistic model of the elongation complex of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **63**: 337-345.

Korzheva N., Mustaev A., Kozlov M., Malhotra A., Nikiforov V., Goldfarb A. & Darst S.A. (2000), A structural model of transcription elongation. *Science* **289**: 619-625.

Korzheva N. & Mustaev A. (2001), Transcription elongation complex: structure and function. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**:119-125.

Krummel B. & Chamberlin M.J. (1992), Structural analysis of ternary complexes of *Escherichia coli* RNA polymerase-deoxyribonuclease-I footprinting of defined complexes. *J. Mol. Biol.* **225**: 239-250.

Kuchta R.D., Benkovic P. & Benkovic S.J. (1988), Kinetic mechanisms whereby DNA polymerase I (Klenow) replicates DNA with high fidelity. *Biochemistry* **27**: 6716-6725.

Kugel J.F. & Goodrich J.A. (1998), Promoter escape limits the rate of RNA polymerase II transcription and is enhanced by TFIIE, TFIIH, and ATP on negatively supercoiled DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 9232-9237.

Kugel J.F. & Goodrich J.A. (2002), Translocation after four-nucleotide RNA commits RNA polymerase II to promoter escape. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 762-773.

Kumar S.A. & Krakow J.S. (1975), Studies on the product binding sites of *Azotobacter vinelandii* ribonucleic acid polymerase. *J. Biol. Chem.* **250**: 2878-2884.

Kunkel T.A. & Bebenek K (2000), DNA replication fidelity. *Annu. Rev. Biochem.* **69**: 497-529.

- Kwon H., Imbalzano A.N., Khavari P.A., Kingston R.E. & Green M.R. (1994), Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SW1/SNF complex. *Nature* **370**: 477-481.
- Kyrpides N.C. & Ouzounis C.A. (1999), Transcription in Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 8545-8550.
- Laemmli U.K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Landick R. (1997), RNA polymerase slides home: pause and termination site recognition. *Cell* **88**: 741-744.
- Landick R. (2001), RNA polymerase clamps down. *Cell* **105**: 567-570.
- Lange U. (1999), Untersuchungen von DNA-Proteinen- und Protein-Protein-Wechselwirkungen archaeller Transkriptionskomponenten. *Diplomarbeit*, Universität Kiel.
- Lange U. & Hausner W. (2003), Transcriptional fidelity and proofreading in Archaea and implications of the mechanism of TFS induced cleavage. *Manuskript wird eingereicht*.
- Langer D. & Zillig W. (1993), Putative tflIs gene of *Sulfolobus acidocaldarius* encoding an archaeal transcription elongation factor is situated directly downstream of the gene encoding for a small subunit of DNA-dependent RNA polymerase. *Nucl. Acids. Res.* **21**: 2251.
- Langer D., Hain J., Thuriaux P. & Zillig W. (1995), Transcription in archaea: similarity to that in eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 5768-5772.
- Laskowski M Sr. (1967), DNases and their use in studies of primary structure of nucleic acids. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **29**:165-220.
- Lee D.N. & Landick R. (1992), Structure of RNA and DNA chains in paused transcription complexes containing *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **228**: 759-777.
- Leffers H., Gropp F., Lottspeich F., Zillig W. & Garrett R.A. (1989), Sequence organization, transcription and evolution of RNA polymerase subunit genes from the archaebacterial extreme halophiles *Halobacterium halobium* and *Halococcus morrhuae*. *J. Mol. Biol.* **206**: 1-17.
- Libby R.T. & Gallant J.A. (1991), The role of RNA polymerase in transcriptional fidelity. *Mol. Microbiol.* **5**: 999-1004.
- Littlefield O., Yorkin Y. & Sigler P.B. (1999), The structural basis for the oriented assembly of a TBP/TFB promoter complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 13668-13673.
- Markovtsov V., Mustaev A. & Goldfarb A. (1996), Protein-RNA interactions in the active center of transcription elongation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 3221-3226.
- Marshall N.F. & Price D.H. (1995), Purification of P-TEFb, a transcription factor required for the transition into productive elongation. *J. Biol. Chem.* **270**: 12335-12338.

Mendelman R.V., Boosalis M.S., Petruska J., and Goodman M.F. (1989), Nearest neighbor influences on DNA polymerase insertion fidelity. *J. Biol. Chem.* **264**: 14415-14423.

Morin D.E., Awrey D.E., Edwards A.M. & Arrowsmith C.H. (1996), Elongation factor TFIIS contains three structural domains: solution structure of domain II. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 10604-10608.

Mote J. Jr. & Reines D. (1998), Recognition of a human arrest site is conserved between RNA polymerase II and procaryotic RNA polymerases. *J. Biol. Chem.* **273**: 16843-16852.

Murray V. (1989), Improved double-stranded DNA sequencing using linear polymerase chain reaction. *Nucl. Acids. Res.* **17**: 8889.

Musfeldt M. (1997), Charakterisierung, Sequenzierung und Expression des potentiellen Elongationsfaktors TFIIS in Archaea. *Diplomarbeit*, Universität Kiel.

Nudler E., Goldfarb A. & Kashlev M. (1994), Discontinuous mechanism of transcription elongation. *Science* **265**: 793-796.

Nudler E., Kashlev M., Nikiforov V. & Goldfarb A. (1995), Coupling between transcription termination and RNA polymerase inchworming. *Cell* **81**: 351-357.

Nudler E., Avetisova E., Markovtsov V. & Goldfarb A. (1996), Transcription processivity: protein-DNA interactions holding together the elongation complex. *Science* **273**: 211-216.

Nudler E., Mustaev A., Lukhtanov M. & Goldfarb A. (1997), The RNA-DNA hybrid maintains the register of transcription by preventing backtracking of RNA polymerase. *Cell* **89**: 33-41.

Nudler E., Gusarov E., Avetisova E., Kozlov A. & Goldfarb A. (1998), Spatial organization of transcription elongation complex in *Escherichia coli*. *Science* **281**: 424-428.

Nudler E. (1999), Transcription elongation: structural basis and mechanisms. *J.Mol.Biol.* **288**: 1-12.

Olmstedt V.K., Awrey D.E., Koth C., Shan X., Morin P.E., Kazanis S., Edwards A.D. & Arrowsmith C.H. (1998), Yeast transcript elongation factor, structure and function. *J. Biol. Chem.* **35**: 22589-22594.

Olsen G.J. & Woese C.R. (1997), Archaeal genomics: An overview. *Cell* **89**: 991.

Orlova M., Newlands J., Das A., Goldfarb A. & Borukhov S. (1995), Intrinsic transcript cleavage activity of RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 4596-4600.

Pace N.R. (1997), A molecular view of microbial diversity in the biosphere. *Science* **276**: 734-740.

Pal M., McKean D. & Luse D.S. (2001), Promoter clearance by RNA polymerase II is an extended multistep process strongly effected by sequence. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 5815-5825.

Park J.S., Marr M.T. & Roberts J.W. (2002), *E. coli* transcription repair coupling factor (Mfd protein) rescues arrested complexes by promoting forward translocation. *Cell* **109**: 757-767.

- Polyakov A., Severinova E. & Darst S.A. (1995), Three-dimensional structure of *E. coli* core RNA polymerase: promoter binding and elongation conformations of the enzyme. *Cell* **83**: 365-373.
- Powell W., Bartholomew B. & Reines D. (1996), Elongation factor SII contacts the 3'-end of RNA in the RNA Polymerase II elongation complex. *J. Biol. Chem.* **37**: 22301 - 22304.
- Price D.H., Sluder A.E. & Greenleaf A.L. (1989), Dynamic interaction between a *Drosophila* transcription factor and RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 1465-1475.
- Puhler G., Leffers H., Gropp F., Palm P., Klenk H.-P., Lottspeich F., Garrett R. & Zillig W. (1989), Archaeobacterial DNA-dependent RNA polymerases testify to the evolution of the eukaryotic nuclear genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 4569-4573.
- Qian X., Jeon C.J., Yoon H.S., Agarwal K. & Weiss M.A. (1993), Structure of a new nucleic-acid-binding motif in eukaryotic transcription factor TFIIS. *Nature* **265**: 277-279.
- Quereshi S.A., Bell S.D. & Jackson J.P. (1997), Factor requirements for transcription in the Archaeon *Sulfolobus shibatae*. *EMBO J.* **16**: 2927-2936.
- Quereshi S.A. & Jackson J.P. (1998), Sequence-specific DNA binding by the *S. shibatae* TFIIB homolog, TFB, and its effect on promoter strength. *Mol. Cell* **1**: 389-400.
- Reeder T.C. & Hawley D.K. (1996), Promoter proximal sequences modulate RNA polymerase II elongation by a novel mechanism. *Cell* **87**: 767-777.
- Reines D., Chamberlin M.J. & Kane C.M. (1989), Transcription elongation factor SII (TFIIS) enables RNA polymerase II to elongate through a block to transcription in a human gene *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **264**: 10799-10809.
- Reines D., Ghanouni P., Gu W., Mote J.Jr. & Powell W (1993), Transcription elongation by RNA polymerase II: mechanism of SII activation. *Cell. Mol. Biol. Res.* **39**: 331-338.
- Reines D. (1994), Transcription: Mechanisms and regulation. *Conaway R.C. and Conaway J.C.*, eds., pp. 263-278, Raven Press.
- Reines D., Conaway J.C. & Conaway R.C. (1996), The RNA polymerase II general elongation factors. *TIBS* **21**: 351-355.
- Reines D. (1992), Elongation factor-dependent transcript shortening by template-engaged RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* **267**: 3795-3800.
- Reines D., Ghanouni P., Li Q. & Mote J. Jr (1992), The RNA polymerase II elongation complex: Factor dependent transcription-elongation involves nascent RNA cleavage. *J. Biol. Chem.* **267**: 15516-15522.
- Reines D. & Mote J. Jr. (1993), Elongation factor SII-dependent transcription by RNA polymerase II through a sequence-specific DNA-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 1917-1921.
- Reiter W.-D., Palm P. & Zillig W. (1988a), Analysis of transcription in the archaeobacterium *Sulfolobus* indicates that archaeobacterial promoters are homologous to eukaryotic pol II promoters. *Nucl. Acids Res.* **16**: 1-19.

Reiter W.D., Hüdepohl U. & Zillig W. (1990), Mutational analysis of an archaeobacterial promoter: Essential role of a TATA box for transcription efficiency and start site selection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 9509-9513.

Rice G.A., Kane C.M. & Chamberlin M.J. (1991), Footprinting analysis of mammalian RNA polymerase II along its transcript: an alternative view of transcription elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 4245-4249.

Rice G.A., Chamberlin M.J. & Kane C.M. (1993), Contacts between mammalian RNA polymerase II and the template DNA in a ternary elongation complex. *Nucl. Acids Res.* **21**: 113-118.

Richards F.M. & Wyckoff H.W. (1971), Bovine pancreatic ribonuclease. *In The Enzymes*, Vol. IV (P.D. Boyer ed.) pp. 647-806. Academic press, San Diego.

Rogers S.G. & Weiss B. (1980), Cloning of the exonuclease III gene of *Escherichia coli*. *Gene* **11**: 187-195.

Rudd D.M., Izban M.G. & Luse D.S. (1994), The active site of RNA polymerase II participates in transcript cleavage within arrested ternary complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 8057-8061.

Saiki R.K., Scharf S.J., Faloona F.A., Mullis K.B., Horn G.T., Ehrlich H.A. & Arnheim N. (1985), Enzymatic amplification of β -Globin genomic sequences and restriction sites analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B. & Ehrlich H.A. (1988), Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 489-491.

Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. (1989), Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbour, New York*.

Samkurashvili I. & Luse D.S. (1998), Structural changes in the RNA polymerase II transcription complex during transition from initiation to elongation. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 5343-5354.

Samkurashvili I. & Luse D.S. (1996), Translocation and transcriptional arrest during transcript elongation by RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* **38**: 23495-23505.

Sanger F.S., Nicklen S. & Coulson A.R. (1977), Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site from the DNA of bacteriophage ϕ d. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 5463-5468.

Schikor P., Metzger W., Warel W., Lederer H. & Heumann H. (1990), Topography of intermediates in transcription initiation of *E. coli*. *EMBO J.* **9**: 2215-2220.

Schmeling G (2002), Untersuchungen zur Funktion der NusA- und NusG-Homologa in *Archaea*. *Diplomarbeit*, Universität Kiel.

Schnabel R., Thomm M., Gerardy-Schahn R., Zillig W., Stetter K.O. & Huet J. (1983), Structural homology between different archaeobacterial DNA-dependent RNA polymerases analyzed by immunological comparison of their components. *EMBO J.* **2**: 751-755.

Sekimizu K., Kobayashi N., Mizuno D. & Natori S. (1976), Purification of a factor from Ehrlich ascites tumor cells specifically stimulating RNA polymerase II. *Biochemistry* **15**: 5064-5070.

Severinov K., Mustaev A., Severinova E., Kozlov M. & Darst S.A. & Goldfarb A. (1995), The β subunit Rif-cluster I is only angstroms away from the active center of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **270**: 29428-29432.

Shilatifard A., Lane W.S., Jackson K.W., Conaway R.C. & Conaway J.W. (1996), An RNA polymerase II elongation factor encoded by the human ELL gene. *Science* **271**: 1873-1876.

Shalloway D., Kleinberger T. & Livingstone D.M., (1980), Mapping of SV40 DNA replication origin region binding sites for the SV40 T antigen by protection against exonuclease III digestion. *Cell* **20**: 411-422.

Shimasaki N.B. & Kane C.M. (2000), Structural basis for species-specific activity of TFIIS. *J. Biol. Chem.* **275**: 36541-36548.

Sijbrandi R., Fiedler U. & Timmers H.T.M. (2002), RNA polymerase II complexes in the very early phase of transcription are not susceptible to TFIIS-induced exonucleolytic cleavage. *Nucleic Acids Res.* **30**: 2290-2298.

Sidorenkov I., Komissarova N. & Kashlev M. (1998), Crucial role of the RNA:DNA hybrid in the processivity of transcription. *Mol. Cell* **2**: 55-64.

Soppa J. (1999a). Transcription initiation in Archaea: facts factors and future aspects. *Mol. Microbiol.* **31**: 1295-1305.

Soppa J. (1999b), Normalized nucleotide frequencies allow the definition of archaeal promoter elements for different archaeal groups and reveal base-specific TFB contacts upstream of the TATA box. *Mol. Microbiol.* **31**: 1589-1601.

Sousa R. & Padilla R. (1995), A mutant T7 RNA polymerase as a DNA polymerase. *EMBO J.* **14**: 4609-4621.

Spitalny P. & 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.* Manuskript eingereicht, 04/2003.

Sweetser D., Nonet M. & Young R.A. (1987), Prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases have homologous core subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**: 1192-1196.

Thomas J.T., Platas A.A. & Hawley D.K. (1998), Transcriptional fidelity and proofreading by RNA polymerase II. *Cell* **93**: 639-648.

Thomm M. & Wich G. (1988), An archaeobacterial promoter element for stable RNA genes with homology to the TATA box of higher eukaryotes. *Nucl. Acids Res.* **16**: 151-163.

Thomm M., Wich G., Brown J. W., Frey G., Sherf B. A. & Beckler G. S. (1989), An archaeobacterial promoter sequence assigned by RNA polymerase binding experiments. *Can. J. Microbiol.* **35**: 30-35.

Thomm M., Hausner W. & Hethke C. (1994), Transcription factors and termination of transcription in *Methanococcus*. *System. Appl. Microbiol.* **16**: 648-655.

Thomm M. (1996), Archaeal transcription factors and their role in transcription initiation. *FEMS Microbiol. Rev.* **18**: 159-171.

Thomm M. (2000), Die Transkriptionsmaschinerie der Archaea. *Biospektrum* **3/2000**: 179-185.

Todone F., Brinck P., Werner F., Weinzierl R. & Onesti S. (2000), Structure of an archaeal homologue of the eukaryotic RNA polymerase II RPB4/RPB7 complex. *Mol. Cell* **8**: 1137-1143.

Toulmé F., Guérin M., Robichon N., Leng M., & Rahmouni A.R. (1999), *In vivo* evidence for back and forth oscillations of the transcription elongation complex. *EMBO J.* **18**: 5052-5060.

Uchida T. & Egami F. (1971), Microbial ribonucleases with special reference to RNases T1, T2, N1 and U2. *In The Enzymes*, Vol. IV (P.D. Boyer, ed.) pp.205-250. Academic Press, San Diego.

Uptain S.M., Kane C.M. & Chamberlin M.J. (1997), Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 117-172.

Vierke G. & Thomm M. (2003), A novel archaeal transcriptional regulator of heat shock response. *J. Biol. Chem.* **278**: 18-26.

Werner F. & Weinzierl R.O.J. (2002), A recombinant RNA polymerase II-like enzyme capable of promoter-specific transcription. *Mol. Cell* **10**: 635-646.

Wettach J., Gohl H.P., Tschochner H. & Thomm M. (1995), Functional interaction of yeast and human TATA-binding proteins with an archaeal RNA polymerase and promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 472-476.

Wind M, & Reines D. (2000), Transcription elongation factor SII. *Bioessays* **22**: 327-336.

Woese C.R. & Fox G.E. (1977), Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdom. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 5088-5090.

Woese C.R., Kandler O. & Wheelis M.L. (1990), Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 4576-4579.

Woese C.R. (2000), Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 8392-8396.

Woese C.R. (2002), On the evolution of cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**: 8742-8747.

Woychik N.A., Lane W.S. & Young R.A. (1991), Yeast RNA polymerase II Subunit RPB9 is essential for growth at temperature extremes. *J. Biol. Chem.* **266**: 19053-19055.

Yan M., & Gralla J.D. (1997), Multiple ATP-dependent steps in RNA polymerase II promoter melting and initiation. *EMBO J.* **16**: 7457-7467.

Yanisch-Peron, C., Vieira, J. & Messing J. (1985), Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.

Yoon H., Sitikov A.S., Jeon C.J., & Agarwal K. (1998), Preferential interaction of the mRNA proofreading factor TFIIS zinc ribbon with rU•dA base pairs correlates with its function. *Biochemistry* **37**: 12104-12112.

Zaychikov E., Denissova L., & Heumann H. (1995), Translocation of the *Escherichia coli* transcription complex observed in the registers 11 to 20: „jumping” of RNA polymerase and asymmetric expansion and contraction of the „transcription bubble”. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 1739-1743.

Zaychikov E., Martin E., Denissova L., Kozlov M., Markovtsov V., Kashlev M., Heumann H., Nikiforov V., Goldfarb A., & Mustaev A. (1996), Mapping of catalytic residues in the RNA polymerase active center. *Science* **273**: 107-109.

Zhang G., Campbell E.A., Minakhin L., Richter C., Severinov K. & Darst S.A. (1999), Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell* **98**: 811-824.

Zawel L., Kumar K.P. & Reinberg D. (1995), Recycling of the general transcription factors during RNA polymerase II transcription. *Genes Dev.* **9**: 1479-1490.

Zillig W., Stetter K.O. & Janekovic D. (1979), DNA-dependent RNA polymerase from the archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Eur. J. Biochem.* **96**: 597-604.

VIII Anhang

1 Abkürzungen

| | |
|---------------------------------|---|
| APS | Ammoniumperoxidisulfat |
| aTBP | archaeelles TATA-Bindeprotein |
| aTFA | archaeeller Transkriptionsfaktor A |
| aTFB | archaeeller Transkriptionsfaktor B |
| AzG | 8-Azido-GTP |
| B | Basen |
| Bp | Basenpaare |
| Bq | Becquerel |
| BRE | TFIIB bzw. TFB Erkennungs Element |
| BSA | Bovine serum albumin |
| ddNTP | Di-Desoxynukleotidtriphosphat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| DSM | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen |
| DTT | Dithiothreitol |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendinitrilotetraessigsäure |
| ELL | Eleven-nineteen lysine-rich leukemia |
| Exo III | Exonuklease III |
| FPLC | Fast performance liquid chromatography |
| h | Stunden |
| kB | Kilobasen |
| kBp | Kilobasenpaare |
| kDa | kiloDalton |
| KMnO ₄ | Kaliumpermanganat |
| mA | Miliampere |
| mBp | mega Basenpaare |
| <i>Mc. jannaschii</i> | <i>Methanococcus jannaschii</i> |
| <i>Mc. thermolithotrophicus</i> | <i>Methanococcus thermolithotrophicus</i> |
| MPS | Magnetpartikel Separator |
| mRNA | messanger RNA |
| mM | milliMolar |
| NTP | Nukleotidtriphosphat |
| PCR | Polymerase Ketten Reaktion |
| pH | negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration |
| poly[d(AT)] | Poly-desoxy-Adenin-desoxy-Thymin |
| p-TEFB | potentieller Transkriptions-Elongations-Faktor B |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| RPB | RNA Polymerase II-Untereinheit |

| | |
|----------------------|--|
| rpm | rounds per minute |
| rRNA | ribosomale Ribonukleinsäure |
| RNAP | RNA Polymerase |
| RT | Raumtemperatur |
| S | Svedberg-Sedimentationseinheit |
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sec | Sekunde |
| <i>Taq</i> | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| TBP | TATA-Bindeprotein |
| TE | Tris-EDTA |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethyldiamin |
| TFB | Transkriptionsfaktor B |
| TFIIB | Transkriptionsfaktor B der RNA Polymerase II |
| TFIID | Transkriptionsfaktor D der RNA Polymerase II |
| TFIIE | Transkriptionsfaktor D der RNA Polymerase II |
| TFIIS | Transkriptionsfaktor IIS |
| TFE | Transkriptionsfaktor E |
| TFS | Transkriptionsfaktor S |
| tRNA | transfer-Ribonukleinsäure für die Aminosäure Valin |
| U | Unit |
| UV | Ultraviolett |

Symbole für den Nukleinsäurecode:

| | |
|---|----------------|
| A | Desoxyadenosin |
| C | Desoxycytidin |
| G | Desoxyguanosin |
| T | Desoxythymidin |

Symbole für die 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 | W | Trp | Tryptophan |
| | | | Y | Tyr | Tyrosin |

2 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Winfried Hausner dafür, daß er mir die Bearbeitung des interessanten Themas ermöglichte. Sein Interesse und seine Diskussionsbereitschaft waren mir eine große Hilfe und führten zu konstruktiven Ideen.

Herrn Prof. Dr. Michael Thomm möchte ich ebenfalls für sein großes Interesse am Gelingen meiner Arbeit danken.

Insbesondere bei Frau Jutta Kock und Dagmar Haacks möchte ich mich für die ständige Unterstützung zur Lösung von Problemen des Laboralltages bedanken.

Auch an Isabell Dahlke, Patrizia Spitalny und Gudrun Vierke geht mein besonderer Dank. Zusätzlich zu konstruktiven Diskussionen gestaltete sich durch sie auch die Zeit zwischen den Versuchen interessant.

Außerdem möchte ich allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Institutes für Allgemeine Mikrobiologie danken, die mich in irgendeiner Weise im Verlauf der Arbeit unterstützt haben, insbesondere Bernd Goede und Jens Thomsen.

3 Lebenslauf

Persönliche Daten

| | |
|---------------------|-----------------------------|
| Name | Udo Lange |
| Adresse | Gneisenastr. 15, 24105 Kiel |
| Geburtstag | 26.02.1969 |
| Geburtsort | Schleswig |
| Staatsangehörigkeit | deutsch |
| Familienstand | ledig |

Berufstätigkeit

| | |
|-------------|--|
| 06/90-06/92 | Soldat auf Zeit, bei der Marine |
| 09/99-04/03 | Wissenschaftlicher Angestellter an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (Promotion) |

Berufsausbildung

| | |
|-------------|--|
| 10/92-03/93 | Studium der Mineralogie an der Universität Hannover |
| 10/93-05/99 | Studium der Biologie an der Christian- Albrechts-Universität zu Kiel (Diplom) |

Schulbildung

| | |
|-------------|--|
| 07/75-06/79 | Grundschule, Dannewerkschule in Schleswig |
| 07/79-06/90 | Gymnasium, Domschule in Schleswig |

4 Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig 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 oder werden zur Veröffentlichung eingereicht:

Hausner, W., Lange, U. & Musfeldt, M. (2000), Transcription factor S, a cleavage induction factor of the archaeal RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 275: 12393-12399.

Lange, U. & Hausner, W. (2003), Transcriptional fidelity and proofreading in Archaea and implications of the mechanism of TFS induced cleavage. Manuskript wird eingereicht.