

Untersuchungen zur Regulation der Transkription

bei *Methanosarcina mazei*



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

**vorgelegt von
Jens Thomsen**

Kiel 2003

Referent : Prof. Dr. M. Thomm

Korreferent :

Tag der mündlichen Prüfung :

Zum Druck genehmigt : Kiel, den

Der Dekan

*Für
meine Eltern*

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	1
1	Die Regulation der Hitzeschockantwort	2
2	Der archaeele Transkriptionsfaktor TFE.....	5
3	Der Repressor AmtR und die Regulation von <i>glnK</i>	7
II	Material und Methoden	13
1	Material.....	13
1.1	Bakterienstämme und Bacteriophagen.....	13
1.2	Plasmide, genomische DNA und Oligonukleotide	13
1.3	Enzyme und andere Proteine.....	15
1.4	Chemikalien	16
1.5	Nährmedien.....	17
1.6	Puffer und Lösungen.....	18
2	Methoden	25
2.1	Identifizierung und Sequenzierung des <i>tfb</i> Gens von <i>Methanosarcina mazei</i>	25
2.2	Klonierung von <i>Methanosarcina mazei tfb</i> und <i>tfe</i>	26
2.3	Expression und Reinigung von <i>Methanosarcina mazei</i> TFB, TFE und TBP	27
2.4	Sequenzanalyse, Datenbankrecherche, Sequenzvergleiche und Erstellung der phylogenetischen Stammbäume.....	28
2.5	<i>In vitro</i> Transkription im <i>Methanococcus thermolithotrophicus</i> System zum Nachweis der funktionellen Aktivität der rekombinanten <i>Methanosarcina</i> <i>mazei</i> Transkriptionsfaktoren TBP und TFB	29
2.6	Reinigung der RNA-Polymerasen von <i>Methanosarcina mazei</i> und <i>Methanococcus thermolithotrophicus</i>	29
2.7	Konstruktion der Plasmid-Matrizen.....	30
2.8	<i>In vitro</i> Transkription der Hitzeschockgene <i>grpE</i> , <i>dnaK</i> und <i>dnaJ</i>	30
2.9	Affinitätsreinigung von Proteinen mit immobilisierter DNA	30
2.10	Primer Extension zur Bestimmung des Startnukleotids der Transkription.....	31
2.11	5'-Markierung von DNA mit radioaktivem [γ - ³² P]ATP.....	31
2.12	Sequenzier-Reaktionen zur Erstellung eines Sequenzstandards	32
2.13	<i>In vitro</i> Transkription mit TFE.....	32
2.14	Test auf RNase Aktivität der AmtR Charge und Gel-Retardation von RNA	33
2.15	<i>In vitro</i> Transkription mit AmtR.....	34
2.16	<i>In vitro</i> Transkription des <i>glnK</i> Gens mit AmtR nach verschiedenen Vorinkubationen.....	35
2.17	Gel-Retardation mit unterschiedlichen AmtR Mengen	35

2.18	Gel-Retardation mit AmtR nach verschiedenen Vorinkubationen.....	36
2.19	Gel-Retardation mit unterschiedlicher DNA und Nachweis eines DNA-TBP-AmtR Komplexes.....	36
2.20	Native PA-Gelelektrophorese zur Prüfung auf Protein-Protein Interaktion.....	37
III	Ergebnisse	38
1	Identifizierung, Sequenzierung, Klonierung, Expression und Reinigung von <i>Methanosarcina mazei tfb</i> bzw. TFB	38
1.1	Identifizierung und Sequenzierung des <i>tfb</i> Gens von <i>Methanosarcina mazei</i> S-6.....	38
1.2	Herstellung der Sonden-DNA	38
1.3	Markierung der Sonden-DNA	40
1.4	Durchsuchung der λ -Genbank nach positiven Klonen.....	40
1.5	Präparation des Phagemids.....	43
1.6	Sequenzierung des Phagemids.....	43
1.7	Klonierung des <i>tfb</i> Gens von <i>Methanosarcina mazei</i> S-6	44
1.8	Expression von <i>Methanosarcina mazei</i> S-6 TFB in <i>E. coli</i>	45
1.9	Reinigung des rekombinanten TFB von <i>Methanosarcina mazei</i> S-6.....	46
2	Identifizierung, Sequenzierung, Klonierung, Expression und Reinigung von <i>Methanosarcina mazei tbp</i> bzw. TBP.....	49
3	Charakterisierung der <i>tbp</i> (TBP) und <i>tfb</i> (TFB) Sequenz von <i>Methanosarcina mazei</i> S-6	50
4	Nachweis der funktionellen Aktivität des rekombinanten <i>Methanosarcina mazei</i> TBP und TFB in der <i>in vitro</i> Transkription	53
5	<i>In vitro</i> Transkription mit <i>Methanosarcina mazei</i> RNA-Polymerase	55
6	Optimierung der <i>in vitro</i> Transkription mit <i>Methanococcus thermolithotrophicus</i> RNA-Polymerase und <i>Methanosarcina mazei</i> TBP und TFB.....	56
7	<i>In vitro</i> Transkription der Hitzeschockgene <i>grpE</i>, <i>dnaK</i> und <i>dnaJ</i> von <i>Methanosarcina mazei</i>.....	58
8	Vorversuch zur Affinitätsreinigung von Proteinen mit immobilisierter DNA ...	60
9	Bestimmung des Startnukleotids der <i>in vitro</i> Transkription des <i>grpE</i> Gens durch Primer Extension	61
10	Klonierung, Expression und Reinigung von <i>Methanosarcina mazei</i> <i>tfe</i> bzw. TFE	63
11	<i>In vitro</i> Transkription mit <i>Methanosarcina mazei</i> TFE	66
11.1	Wirkung des Transkriptionsfaktors TFE aus <i>Methanosarcina mazei</i> auf die <i>in vitro</i> Transkription	66
11.2	Nachweis der Aktivität des Transkriptionsfaktors TFE.....	67
11.3	Einfluss des Transkriptionsfaktors TFE auf die <i>in vitro</i> Transkription bei suboptimalen TBP Mengen	68
12	<i>In vitro</i> Transkription und Gel-Retardation mit dem potentiellen Repressor AmtR aus <i>Methanosarcina mazei</i>.....	69

12.1	Test auf RNase Aktivität der AmtR Charge und Gel-Retardation von RNA durch AmtR.....	70
12.2	Wirkung des AmtR Proteins auf die <i>in vitro</i> Transkription.....	71
12.3	Einfluss verschiedener Vorinkubationen auf die <i>in vitro</i> Transkription des <i>glnK</i> Gens	73
12.4	Gel-Retardation mit unterschiedlichen AmtR Mengen.....	75
12.5	Einfluss von Vorinkubationen auf die Gel-Retardation mit AmtR.....	76
12.6	Nachweis eines DNA-TBP-AmtR Komplexes und AmtR induzierte Gel-Retardation mit unterschiedlicher DNA	78
12.7	Native PA-Gelelektrophorese zur Prüfung auf Protein-Protein Interaktion zwischen AmtR und TBP	81
IV	Diskussion.....	83
1	Aufbau des <i>in vitro</i> Transkriptionssystems.....	83
2	<i>In vitro</i> Transkription der Hitzeschockgene <i>grpE</i>, <i>dnaK</i> und <i>dnaJ</i>.....	86
3	Stimulierung der <i>in vitro</i> Transkription durch TFE	89
4	Der potentielle Repressor AmtR aus <i>Methanosarcina mazei</i>	91
V	Zusammenfassung	98
VI	Summary	99
VII	Literaturverzeichnis	100
VIII	Abkürzungen.....	109

I Einleitung

Die archaeelle Transkription stellt eine vereinfachte Version der Transkription des eukaryellen RNA-Polymerase II Systems dar, was sich sowohl durch eine große Sequenzübereinstimmung bei den beteiligten Komponenten als auch durch einen ähnlichen Mechanismus widerspiegelt (THOMM, 1996; BELL & JACKSON, 1998a; SOPPA 1999b). Die archaeellen Promotoren weisen drei charakteristische Sequenzelemente auf. Bei Position – 25 liegt die TATA-Box, die Erkennungssequenz des TBP, die den Startpunkt der Transkription festlegt (THOMM & WICH, 1988; REITER et al., 1990; PALMER & DANIELS, 1995). Direkt stromaufwärts ist das BRE (TFB recognition element) lokalisiert (QURESHI & JACKSON, 1998), und im Startbereich der Transkription ist das Initiatorelement zu finden (HAUSNER et al., 1991; HAIN et al., 1992). Die Archaea besitzen, wie die Bacteria, nur einen einzigen Typ der RNA-Polymerase, die aber mit ihren bis zu zwölf Untereinheiten komplexer aufgebaut ist als das Enzym der Bacteria. Die archaeelle RNA-Polymerase ähnelt in ihrer Struktur eher den eukaryellen RNA-Polymerasen. Die einzelnen Untereinheiten der archaeellen RNA-Polymerase besitzen dabei die größte Übereinstimmung zu den Untereinheiten der eukaryellen RNA-Polymerase II (LANGER et al., 1995). Für eine spezifische Initiation der Transkription sind bei den Archaea die beiden basalen Transkriptionsfaktoren TBP und TFB erforderlich (THOMM, 1996). Diese Proteine sind Orthologe der eukaryellen Transkriptionsfaktoren TFIID, der sich aus TBP und TBP-assoziierten Faktoren zusammensetzt, und TFIIB. Die Eukarya besitzen noch eine Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren, aber in Übereinstimmung mit der archaeellen Transkription ist in einem Minimalsystem eine spezifische Initiation der *in vitro* Transkription mit TFIID, TFIIB und der RNA-Polymerase II möglich (PARVIN & SHARP, 1993). Zur Ausbildung des archaeellen Präinitiationskomplexes bindet zunächst TBP spezifisch an die TATA-Box (GOHL et al., 1995). Diese Bindung wird durch eine Interaktion mit TFB, welches das BRE spezifisch bindet und damit die Polarität der Transkription festlegt (BELL et al., 1999a), stabilisiert (HAUSNER et al., 1996; QURESHI & JACKSON 1998). Durch die Rekrutierung der RNA-Polymerase wird der Präinitiationskomplex vervollständigt (GOHL et al., 1995; BELL et al., 1998). Beim Übergang in die Elongationsphase, mit der Ablösung der RNA-Polymerase von dieser Plattform, spielt nochmals TFB eine Rolle (BELL & JACKSON, 2000a).

Die archaeelle Regulation der Transkription ist weitaus weniger erforscht als die Initiation der Transkription. Einige Regulationsmechanismen konnten allerdings aufgeklärt werden. So ist z. B. bei halophilen Archaea das GvpE Protein beschrieben. Dieses fungiert als Aktivator für die Transkription von Genen, die Proteine der Gasvesikel kodieren. Das Protein besitzt ein Leucin-Zipper-Motiv und bindet an eine palindromische Sequenz ca. 40 bp bis 50 bp stromaufwärts der von ihm regulierten Gene (KRÜGER et al., 1998). Bei *Methanobacterium thermoautotrophicum* ist der vermutliche Aktivator Tfx bekannt. Das Protein besitzt ein Helix-Turn-Helix-Motiv und bindet stromabwärts des Promotors der Gene der Molybdenformylmethanofuran-Dehydrogenase (HOCHHEIMER et al., 1999). Genauere Vorstellungen hat man vom Regulationsmechanismus des MDR1 Proteins aus *Archaeoglobus fulgidus*. MDR1 ist ein Homolog des bakteriellen Repressors DxtR und hemmt die Transkription seines eigenen Gens. Das Protein bindet in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von Metall-Ionen an den Promotor und blockiert die Anlagerung der RNA-Polymerase an den DNA-TBP-TFB Komplex. Die Ausbildung des DNA-TBP-TFB Komplexes wird hingegen nicht behindert (BELL et al., 1999b). Auch die von LrpA, ein Repressor bakteriellen Typs, aus *Pyrococcus furiosus* vermittelte Inhibierung der Transkription seines eigenen Gens beruht auf diesem Mechanismus (DAHLKE & THOMM, 2002). Das homologe Protein Lrs14 von

Sulfolobus solfataricus hemmt ebenfalls die Transkription seines eigenen Gens durch Bindung an den Promotor. Allerdings überlappt die Bindungsstelle von Lrs14 die TATA-Box und das BRE, so dass bereits die Promotorerkennung von TBP und TFB blockiert wird (BELL & JACKSON, 2000b). Auf weitere aufgeklärte Mechanismen der Regulation der Transkription bei Archaea wird in der Einleitung später noch genauer eingegangen.

Die Genomsequenzierung des mesophilen methanogenen Archaeons *Methanosarcina mazei* ergab einige interessante Ergebnisse. *Methanosarcina mazei* besitzt ein außergewöhnlich großes Genom (DEPPENMEIER et al., 2002). Mit über 4.000.000 bp ist es mehr als doppelt so groß, wie die Genome der ebenfalls methanogenen Archaea *Methanococcus jannaschii* und *Methanobacterium thermoautotrophicum* (BULT et al., 1996; SMITH et al., 1997). Es wurden 3371 offene Leseraster identifiziert, von denen bisher allerdings erst 2450 eine Funktion zugewiesen werden konnte. Zu 1043 der offenen Leseraster von *Methanosarcina mazei* weisen Homologe der Bacteria die größte Übereinstimmung auf, und für 544 dieser 1043 offenen Leseraster konnten Homologe nur bei den Bacteria gefunden werden, so z. B. auch für einige Gene, die Proteine der Genregulation oder Stressantwort kodieren. Interessanterweise besitzt *Methanosarcina mazei* sowohl die Hitzeschockgene des archaeellen Thermosoms, als auch die Hitzeschockgene des bakteriellen GroES/GroEL Systems, die bisher bei keinem anderen Archaeon gefunden werden konnten. Die Proteine der Replikations-, Transkriptions- und Translationsmaschinerien von *Methanosarcina mazei* weisen hingegen alle typische archaeelle Merkmale auf. Das Genom von *Methanosarcina mazei* ist durch einen höheren Anteil von Genen bakteriellen Typs gekennzeichnet als die Genome anderer Archaea. Dies ist vermutlich auf ein erhöhtes Auftreten von lateralen Gentransfer zurückzuführen. Der Lebensraum von *Methanosarcina mazei*, anaerobe Gewässer, ist nicht durch extreme Bedingungen gekennzeichnet, wie bei vielen anderen Archaea. Der Organismus ist dementsprechend in stärkerem Ausmaß von Bacteria umgeben als Archaea, die an extremen Standorten leben, wo nur wenige Bacteria vorkommen (DEPPENMEIER et al., 2002).

Aufgrund des komplexen Genoms bietet *Methanosarcina mazei* ein sehr interessantes Feld für Untersuchungen zur Genregulation bei Archaea. Bisher sind die Mechanismen zur Regulation der Transkription bei *Methanosarcina mazei* aber noch nicht erforscht. Für die vorliegende Arbeit wurden drei Aspekte ausgewählt, die *in vitro* näher untersucht werden sollten. Zum einen wurde die *in vitro* Transkription der Hitzeschockgene *grpE*, *dnaK* und *dnaJ* untersucht, da bereits *in vivo* Daten zur differentiellen Genexpression verfügbar waren. Der Bereich der archaeellen Regulation wurde durch die Untersuchung des Einflusses des archaeellen Transkriptionsfaktors TFE auf die *in vitro* Transkription abgedeckt und zur Untersuchung der Regulation der Transkription bakteriellen Typs wurde der potentielle Repressor des *glnK* Gens, das Protein AmtR, erforscht. Im Folgenden wird jeweils kurz in die Thematik der drei untersuchten Bereiche eingeführt.

1 Die Regulation der Hitzeschockantwort

Die Fähigkeit sich schnell an verändernde Umweltbedingungen anzupassen ist für das Überleben aller Organismen essentiell. Die Reaktion auf erhöhte Temperatur und andere Stressfaktoren wird als Hitzeschockantwort bezeichnet, und resultiert in einer umgehenden Überexpression von Hitzeschockproteinen. Die Hitzeschockproteine der Bacteria und Eukarya sind in Struktur und Funktion hochkonserviert, und die Induktion ihrer Gene wird im allgemeinen auf der Ebene der Initiation der Transkription reguliert (MAGER & de KRUIJFF, 1995).

Bei den Bacteria gibt es zur Regulation der Transkription der Hitzeschockgene sowohl eine positive, als auch eine negative Kontrolle. Die Regulation bei *E. coli* beruht auf der Verwendung unterschiedlicher σ -Faktoren, die die RNA-Polymerase zu den von der Standard-Promotorkonsensussequenz abweichenden Promotoren der Hitzeschockgene leiten (BUKAU, 1993). Bei gram-positiven Bacteria kann durch die Bindung eines Repressors an ein regulatorisches Element stromaufwärts der Hitzeschockgene deren Transkription inhibiert werden (HECKER et al., 1996). Zur Feinabstimmung der Hitzeschockantwort haben Bacteria anspruchsvolle Netzwerke entwickelt, bei denen oft auch positive und negative Kontrollmechanismen miteinander kombiniert sind (NARBERHAUS, 1999). Bei den Eukarya ist zur Transkription der Hitzeschockgene eine Aktivierung durch einen Hitzeschockfaktor erforderlich, der an die sogenannten Hitzeschockelemente der DNA bindet. Die monomere Form des Hitzeschockfaktors ist dabei nicht zur Bindung an das Hitzeschockelement fähig, nur als Homotrimer erfolgt die Bindung und Stimulierung der Transkription (MORIMOTO, 1998). Auch bei den Archaea konnten viele Gene der Hitzeschockantwort gefunden werden (TRENT, 1996; MACARIO et al., 1999). Über die Regulation der Hitzeschockantwort bei Archaea ist bisher allerdings erst wenig bekannt. Archaea besitzen weder σ -Faktoren wie die Bacteria noch Homologe der eukaryellen Hitzeschockfaktoren. Außerdem konnten keine Sequenzen gefunden werden, die Ähnlichkeit mit bakteriellen Repressorbindungsstellen oder den eukaryellen Hitzeschockelementen aufweisen.

Für einige Euryarchaeota wurde durch Genomanalysen ein potentiell Hitzeschockregulon, bestehend aus *hsp20*, *aaa⁺ atpase* und dem Gen eines Regulatorproteins, vorhergesagt (GELFAND et al., 2000). Inzwischen konnte bei *Pyrococcus furiosus* gezeigt werden, dass das Regulatorprotein Phr spezifisch die *in vitro* Transkription seines eigenen Gens und des *hsp20* und *aaa⁺ atpase* Gens inhibiert. Phr bindet den Transkriptionsstartpunkt überlappend stromabwärts der TBP-TFB Bindungsstelle direkt an die DNA und verhindert dadurch die Anlagerung der RNA-Polymerase. Im Bereich des Transkriptionsstartpunkts sowie um die Positionen - 10 und + 10 konnten drei konservierte Sequenzmotive entdeckt werden, die für die Bindung von Phr essentiell sind. Nach einem Hitzeschock steigt die mRNA Menge von *hsp20*, *aaa⁺ atpase* und *phr* stark an. Dies zeigt, dass die Transkription dieser Gene, die *in vitro* durch Phr reguliert wird *in vivo* durch einen Hitzeschock beeinflusst wird. Das Protein Phr ist nach einem Hitzeschock allerdings nur in leicht erhöhter Menge in der Zelle nachweisbar, was darauf hindeutet, dass eventuell ein weiteres Regulatorprotein bei der Hitzeschockantwort beteiligt sein könnte (VIERKE et al., 2003). Der grundlegende Mechanismus der Regulation durch Phr bei *Pyrococcus furiosus* ähnelt stark der negativen Kontrolle der Hitzeschockgene bei den gram-positiven Bacteria.

Bei dem halophilen Archaeon *Haloferax volcanii* sind zwei Hitzeschockgene, *cct1* und *cct2* (chaperonin-containing Tcp-1), beschrieben, deren Transkription durch einen Hitzeschock induziert wird (KUO et al., 1997). Für *cct1* wurde durch Mutationsanalysen gezeigt, dass Sequenzbereiche des Kern-Promotors um die TATA-Box für die hitzeinduzierte *in vivo* Transkription erforderlich sind. Es konnte allerdings keine Konsensussequenz einer Bindungsstelle eines potentiellen Regulators identifiziert werden (THOMPSON & DANIELS, 1998). Bei *Haloferax volcanii* wurden außerdem mehrere verschiedene *tbp* und *tfb* Gene entdeckt. Die Transkription eines der sechs verschiedenen *tfb* Gene wird spezifisch nach Hitzeschock induziert, und die Menge des TFB Proteins, das von diesem Gen kodiert wird, steigt in der Zelle nach einem Hitzeschock an (THOMPSON et al., 1999). Auch bei *Pyrococcus furiosus* sind zwei verschiedene *tfb* Gene bekannt, und vor kurzem konnte gezeigt werden, dass eines der zwei verschiedenen *tfb* Gene nach Hitzeschock induziert wird,

während die Expression des anderen Gens konstant bleibt (SHOCKLEY et al., 2003). Es wäre also möglich, dass bei diesen Organismen die Transkription zumindest einiger Hitzeschockgene durch Verwendung eines nach Hitzeschock induzierten TFBs reguliert wird. Dies wäre ein zu den alternativen σ -Faktoren der Bacteria weitgehend analoger Mechanismus.

Die hochkonservierten Hitzeschockproteine der Hsp70-Chaperon-Maschinerie (Hsp70, Hsp40, GrpE) der Eukarya und der homologen DnaK-Chaperon-Maschinerie (DnaK, DnaJ, GrpE) der Bacteria kommen bei allen Eukarya bzw. Bacteria vor (GUPTA & SINGH, 1992; 1994; RENSING & MAIER, 1994). Dagegen konnten bei den Archaea die entsprechenden Gene nicht bei allen Organismen gefunden werden. Während die Gene im Genom einiger mesophiler und thermophiler methanogener Archaea vorhanden sind, konnten sie bei Crenarchaeota und hyperthermophilen Archaea bisher nicht nachgewiesen werden (GRIBALDO et al., 1999; MACARIO et al., 1999). Bei allen Archaea, die das *dnaK* Gen besitzen, sind aber auch die Gene *grpE* und *dnaJ* vorhanden, und alle Archaea, die *dnaK* nicht aufweisen, besitzen auch die Gene *grpE* und *dnaJ* nicht (MACARIO et al., 1999). Die archaeellen Proteine, vor allem die Hauptkomponente DnaK, ähneln in Sequenz und Struktur am stärksten den Homologen der gram-positiven Bacteria, typische eukaryelle Merkmale konnten nicht festgestellt werden (MACARIO et al., 1991; GUPTA & SINGH, 1992). Die drei Proteine des bakteriellen Chaperons bilden zusammen eine funktionelle Einheit, welche die native Faltung von Proteinen fördert (MARTIN & HARTL, 1997; RASSOW et al., 1997). Über die Funktion der archaeellen Homologe und die Regulation ihrer Genexpression ist bisher wenig bekannt. Bei *Methanosarcina mazei* wurde aber die Expression dieser Gene nach Hitzeschock untersucht.

Das methanogene mesophile Archaeon *Methanosarcina mazei* besitzt die Hitzeschockgene direkt hintereinanderliegend in der Reihenfolge 5'-*grpE-dnaK-dnaJ-3'* (MACARIO et al., 1991; CONWAY de MACARIO et al., 1994). Diese Anordnung der Gene wurde bisher bei allen Archaea, die diese Gene besitzen beobachtet (MACARIO & CONWAY de MACARIO, 1999). Die Promotoren dieser drei Gene von *Methanosarcina mazei* weisen keine für Bacteria typische Sequenzmotive auf, und es konnten auch keine Regulatorelemente der Bacteria entdeckt werden, obwohl die Gene Proteine bakteriellen Typs kodieren. Alle drei Gene weisen archaeelle Promotoren auf, die weitgehend den eukaryellen RNA-Polymerase II Promotoren ähneln (CLARENS et al., 1995; MACARIO & CONWAY de MACARIO, 1997).

Durch Northern Blot Analysen der gesamten RNA aus *Methanosarcina mazei* Zellen konnte für die Gene *dnaK* und *dnaJ* ein monocistronisches Transkript gezeigt werden. Die Promotoren und Terminationssignale der beiden Gene sowie die ermittelten *in vivo* Orte des Starts und der Termination der Transkription weisen ebenfalls auf eine monocistronische Transkription hin. Der Transkriptionsstartpunkt *in vivo* ist dabei jeweils identisch unter optimalen Bedingungen und nach Hitzeschock. Die Gene *dnaK* und *dnaJ* werden in geringem Maße konstitutiv transkribiert, aber nach einem Hitzeschock erfolgt eine deutlich gesteigerte Transkription. Die von *dnaK* beobachtete konstitutive und hitzeschockinduzierte Genexpression ist deutlich stärker als bei *dnaJ*, und auch die Stimulierung nach einem Hitzeschock ist bei *dnaK* stärker. Es konnte nach einem Hitzeschock auch eine erhöhte Menge der Proteine DnaK und DnaJ in der Zelle nachgewiesen werden, wobei deutlich mehr DnaK zu beobachten war (CLARENS et al., 1995). Inzwischen konnte auch bei dem thermophilen Organismus *Methanosarcina thermophila in vivo* die monocistronische Transkription dieser Hitzeschockgene, eine stimulierte Transkription nach Hitzeschock und eine deutlich stärkere Transkription von *dnaK* im Vergleich zu *dnaJ* gezeigt werden (LANGE et al., 1997; HOFMAN-BANG et al., 1999).

Auch für *grpE* von *Methanosarcina mazei* wurde eine geringe konstitutive und eine stimulierte Transkription nach Hitzeschock nachgewiesen. Die Stimulierung der Transkription ist sogar etwas stärker als bei *dnaK*. Der *in vivo* Transkriptionsstartpunkt bei optimaler Temperatur und nach Hitzeschock ist identisch. Die Länge des Transkripts war ebenfalls jeweils ungefähr gleich. Die Länge des durch Northern Blot identifizierten *grpE* Transkripts und die ermittelten *in vivo* Orte des Starts und der Termination der Transkription, die gut mit der Lage des Promotors und eines Terminationssignals korrelieren, weisen auch bei *grpE* auf eine monocistronische Transkription hin (CONWAY de MACARIO et al., 1995). Für eine monocistronische Transkription der drei Hitzeschockgene *grpE*, *dnaK* und *dnaJ* spricht auch die unterschiedlich starke Stimulierung der Transkription, sowohl nach unterschiedlicher Dauer des Hitzeschocks, als auch bei unterschiedlichen Temperaturen (CLARENS et al., 1995; CONWAY de MACARIO et al., 1995; LANGE et al., 1997). Bei den Bacteria ist im Gegensatz dazu eine polycistronische Transkription dieser Hitzeschockgene beschrieben (BARDWELL et al., 1986; GOMES et al., 1990; NARBERHAUS et al., 1992; HOMUTH et al., 1997).

Die Transkription der drei Hitzeschockgene *grpE*, *dnaK* und *dnaJ* von *Methanosarcina mazei* war bisher nur *in vivo* untersucht worden. Mit dem im Laufe dieser Arbeit erstellten *in vitro* Transkriptionssystem mit den rekombinanten Transkriptionsfaktoren TBP und TFB von *Methanosarcina mazei* und gereinigter *Methanococcus thermolithotrophicus* RNA-Polymerase sollte untersucht werden, ob sich diese Gene auch *in vitro* transkribieren lassen. Dies könnte Aufschluss darüber geben, ob zu ihrer Transkription eventuell eine Aktivierung erforderlich ist bzw. es könnte auch, soweit verfügbar, der Einfluss eines Repressors auf die Transkription untersucht werden. Eine weitere Charakterisierung des *in vitro* Transkripts ist durch die Bestimmung des *in vitro* Transkriptionsstartpunkts möglich.

2 Der archaelle Transkriptionsfaktor TFE

Die Initiation der Transkription bei den Archaea gleicht in vielen Aspekten dem eukaryellen RNA-Polymerase II System (LANGER et al., 1995; THOMM, 1996; REEVE et al., 1997; BELL & Jackson, 1998a). In *in vitro* Transkriptionssystemen verschiedener Archaea können viele archaelle Promotoren nur mit den beiden allgemeinen Transkriptionsfaktoren TBP und TFB sowie gereinigter RNA-Polymerase spezifisch transkribiert werden (HAUSNER & THOMM, 1993; HETHKE et al., 1996; QURESHI et al., 1997; BELL et al., 1998; DARCY et al., 1999; BELL & Jackson, 2000a). Durch die Analyse archaeller Genome konnte jedoch ein weiterer Transkriptionsfaktor identifiziert werden. Alle bisher vollständig sequenzierten archaellen Genome kodieren ein Protein mit Sequenzähnlichkeit zur N-terminalen Region der α -Untereinheit des allgemeinen eukaryellen Transkriptionsfaktors TFIIE (BELL & JACKSON, 1998b; ARAVIND & KOONIN, 1999; KYRPIDES & OUZOUNIS, 1999). Eukaryelle TFIIEs enthalten außerdem eine β -Untereinheit (INOSTROZA et al., 1991). Es konnte in den archaellen Genomen allerdings kein Gen gefunden werden, das für ein Homolog der β -Untereinheit kodiert, oder dem C-terminalen Bereich der eukaryellen α -Untereinheit entspricht. Ebenso wurden keine eindeutigen Homologe der allgemeinen eukaryellen Transkriptionsfaktoren TFIIA, TFIIF, TFIIH oder der TBP-assoziierten Faktoren entdeckt (ARAVIND & KOONIN, 1999; KYRPIDES & OUZOUNIS, 1999; SOPPA, 1999b).

Deletionsanalysen von TFIIE α zeigten, dass der C-terminale Bereich des Proteins bei Hefe *in vivo* entbehrlich ist für die Überlebensfähigkeit, während der N-terminale Bereich essentiell

ist (KULDELL & BURATOWSKI, 1997; SAKURAI et al., 1997). Der kleinste Bereich von TFIIIE α , mit dem Hefe noch Wachstum zeigt, entspricht der vollen Länge des archaeellen Homologs TFE (BELL et al., 2001). Für humanes TFIIIE α konnte *in vitro* ebenfalls gezeigt werden, dass nur dieser N-terminale Bereich essentiell ist (OHKUMA et al., 1995). Das archaeelle TFE entspricht also der minimal erforderlichen TFIIIE α Region. Für diese Region von TFIIIE α konnte gezeigt werden, dass sie mit TBP und der RNA-Polymerase II interagieren kann (MAXON et al., 1994; YOKOMORI et al., 1998).

Die Sequenzen der archaeellen TFIIIE Homologe, enthalten N-terminal ein konserviertes Helix-Turn-Helix-Motiv und C-terminal ein konserviertes Zinkfinger-Motiv (BELL et al., 2001). Bei eukaryellen TFIIIE ist der Zinkfinger essentiell für die Funktion des Proteins (MAXON & TJIAN, 1994). Während einige archaeelle TFEs einen potentiellen Zinkfinger mit vier Cystein-Resten besitzen, ist bei *Sulfolobus solfataricus* und *Archaeoglobus fulgidus* der zweite Cystein-Rest gegen einen Asparaginsäure-Rest bzw. Methionin-Rest ausgetauscht. Diese Aminosäure-Reste besitzen aber über eine polare Seitenkette die Fähigkeit zur Koordination eines Metall-Ions, bei den *Pyrococcus* Arten und bei *Methanobacterium thermoautotrophicum* ist an der entsprechenden Position allerdings ein Prolin-Rest bzw. Glycin-Rest, wobei kurz darauf jeweils ein Histidin-Rest folgt. Es ist also möglich, dass nicht alle archaeellen TFEs ein koordiniertes Metall-Ion besitzen (BELL et al., 2001).

Für rekombinantes TFE von *Methanobacterium thermoautotrophicum* konnte gezeigt werden, dass es im *in vitro* Transkriptionssystem dieses Archaeons die Transkription einiger Promotoren von Methan-Genen bis zu 3,5-fach stimuliert. Es werden allerdings nicht alle untersuchten Promotoren, die *in vivo* sehr aktiv sind, aber *in vitro* mit TBP, TFB und RNA-Polymerase nicht oder nur schwach transkribiert werden, durch TFE stimuliert. Die Transkription eines auch ohne TFE effektiv transkribierten Promotors wird durch TFE ebenfalls nicht weiter gesteigert. Für die Aktivität von TFE ist wahrscheinlich die Ausbildung eines Zinkfingers essentiell. Ein Aminosäureaustausch eines Cystein-Restes des Zinkfingers, durch den die Fähigkeit Zink zu binden verloren gehen sollte, führt jedenfalls zum Verlust der Aktivität des Proteins. TFE verschiedener Organismen scheint nicht austauschbar zu sein, da rekombinantes TFE von *Archaeoglobus fulgidus* nicht im *Methanobacterium thermoautotrophicum in vitro* Transkriptionssystem die Transkription der Promotoren stimuliert, die durch TFE von *Methanobacterium thermoautotrophicum* stimuliert werden (HANZELKA et al., 2001).

Protein-Protein Interaktionsstudien mit rekombinanten TFE von *Sulfolobus solfataricus* zeigen, dass das Protein in Abwesenheit von DNA mit gereinigter RNA-Polymerase und rekombinanten TBP dieses Organismus interagieren kann. Mit TFB erfolgt dagegen keine Interaktion. *In vitro* Transkriptionsanalysen zeigen außerdem, dass *Sulfolobus solfataricus* TFE die Transkription einiger untersuchter Promotoren 2-3-fach stimuliert, während die Transkription anderer Promotoren nicht beeinflusst wird. Von einem der für TFE nicht sensitiven Promotoren wurden verschiedene mutierte Versionen der TATA-Box konstruiert. Bei denjenigen Promotoren, die eine geringere Transkription im Vergleich zum Wildtyp aufweisen, erfolgt nun eine Stimulation der Transkription durch TFE. Es konnte auch gezeigt werden, dass ein bei optimaler TBP Konzentration nicht für TFE sensitiver Promotor bei suboptimalen TBP Konzentrationen für TFE sensitiv wird. Eine Veränderung der TFB Konzentration bei optimaler TBP Konzentration zeigt hingegen keinen Einfluss auf die TFE Sensitivität eines Promotors. DNaseI-Footprints eines DNA-TBP-TFB Komplexes bei verschiedenen TBP Konzentrationen mit und ohne TFE zeigen, dass der Schutz der TATA-Box Region bei geringeren TBP Konzentrationen durch TFE verstärkt wird. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass unter Bedingungen, bei denen die TBP-TATA-Box Interaktion nicht

optimal ist, eine Stimulierung der Transkription durch TFE erfolgen kann. Die Wirkungsweise von TFE ist allerdings noch unbekannt. Eine direkte DNA-TFE Interaktion zusätzlich zur TFE-TBP Interaktion scheint unwahrscheinlich, da bei DNaseI-Footprints keine Veränderung des TBP-TFB Footprints bei TFE Anwesenheit beobachtet wurde (BELL et al., 2001). Außerdem ist bei humanem TFIIE α keine direkte Interaktion mit der Promotor-DNA beobachtet worden (KIM et al., 2000). Es wäre aber möglich, dass TFE die Dimerisierung von TBP verhindert, wie es für eukaryelles TFIIA beschrieben ist (COLEMAN et al., 1999), und dadurch die TATA-Box Erkennung von TBP begünstigt wird.

Bei der Analyse der Daten der Genomsequenzierung von *Methanosarcina mazei* Goe1 konnte ein potentiell *tfe* Gen identifiziert werden (DEPPENMEIER et al., 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *tfe* Gen von *Methanosarcina mazei* S-6 in *E. coli* kloniert und exprimiert. Anschließend wurde das rekombinante Protein gereinigt. Mittels *in vitro* Transkriptionsexperimenten sollte der Einfluss des Proteins auf die Transkription untersucht werden. Dies erfolgte sowohl bei optimaler TBP Konzentration, als auch bei verschiedenen suboptimalen TBP Konzentrationen um zu testen, ob sich unter diesen Bedingungen die Sensitivität des Systems für TFE erhöht.

3 Der Repressor AmtR und die Regulation von *glnK*

Der Mechanismus zur Regulation der Transkription der Gene des Stickstoffmetabolismus ist sehr unterschiedlich. Bei den Proteobakterien wird die Transkription der Gene des Stickstoffmetabolismus z. B. durch das zwei Komponenten NtrB-NtrC Aktivator System gesteuert (MERRICK & EDWARDS, 1995). Bei *Bacillus subtilis* aktivieren oder hemmen zwei homologe Regulatoren, TnrA und GlnR, je nach den Stickstoffverhältnissen der Zelle (FISHER, 1999), und das gram-positive Bakterium *Corynebacterium glutamicum* besitzt den globalen Repressor AmtR zur Regulation (JAKOBY et al., 2000).

Bei methanogenen Archaea konnte zur Regulation der Transkription von Genen des Stickstoffmetabolismus im Genom von *Methanococcus* und *Methanobacterium* Arten eine Sequenz für eine Repressor Bindungsstelle gefunden werden. Diese Sequenz [GGAA-N₆-TTCC] liegt bei *Methanococcus maripaludis* in der Nähe des Transkriptionsstartpunkts des *glnA* Gens (Glutamin Synthetase) und zweimal vor dem *nif* Operon, konnte aber auch vor einigen anderen Genen des Stickstoffmetabolismus gefunden werden, so z. B. bei *Methanobacterium thermoautotrophicum* auch vor einem *amtB/glnB* Operon (BULT et al., 1996; SMITH et al., 1997; LIE & LEIGH, 2002). Bei *Methanosarcina mazei* konnte diese Sequenz einer Repressor Bindungsstelle jedoch weder vor dem *nif* Operon noch vor dem *glnK/amtB* Operon gefunden werden (EHLERS et al., 2002a). Im Bereich des Transkriptionsstartpunkts vor dem *nifH* Gen von *Methanosarcina mazei* liegt aber eine andere palindromische Sequenz, die eine Funktion bei der Regulation der Transkription des *nif* Operons haben könnte (EHLERS et al., 2002b).

Vor kurzem konnte bei *Methanococcus maripaludis* das Regulatorprotein NrpR identifiziert werden, das an die für methanogene Archaea postulierte Repressor Bindungsstelle vor Genen des Stickstoffmetabolismus bindet. Die Deletion des *nrpR* Gens führt *in vivo* zur Aufhebung der Hemmung der Genexpression des *glnA* Gens und der *nif* Gene. Die Menge des NrpR Proteins selbst scheint nicht kontrolliert zu sein. Daher ist vermutlich die Bindungsaffinität von NrpR an die Repressor Bindungsstelle über einen bisher unbekanntem Mechanismus reguliert. Das Protein enthält N-terminal ein Helix-Turn-Helix-Motiv und außerdem zwei weitere zueinander homologe Domänen mit unbekannter Funktion. Es konnten nur bei

einigen Euryarchaeota zu NrpR homologe Proteine gefunden werden, und bei manchen Homologen sind auch nicht alle drei Proteindomänen vorhanden, so z. B. bei *Methanosarcina mazei* (LIE & LEIGH, 2003).

Die Gene *glnK* und *amtB* kommen in allen drei Domänen des Lebens vor. Bei den Bacteria und Archaea sind diese Gene in einem Operon angeordnet. Das *amtB* Gen kodiert ein integrales Membranprotein, welches als Ammoniumtransporter fungiert, und das *glnK* Gen kodiert ein Mitglied der Familie der P_{II} Signalübertragungsproteine, welche Enzymaktivitäten und die Genexpression in Bezug auf die intrazellulären Stickstoffverhältnisse regulieren (COUTTS et al., 2002).

E. coli und andere Proteobakterien besitzen zwei P_{II} Signalübertragungsproteine: GlnB und sein Paralog GlnK. Im Gegensatz zum *glnB* Gen steht das *glnK* Gen unter der Kontrolle des allgemeinen Stickstoffregulationssystems und wird deshalb nur bei Stickstoffmangel exprimiert (ARCONDÉGUY et al., 2001). GlnB und GlnK werden aber beide in Abhängigkeit von den intrazellulären Stickstoffverhältnissen von einer Uridylyltransferase, kodiert von *glnD*, kovalent modifiziert. Der interne Glutamin Pool der Zelle dient dabei als primäres Signal für die Stickstoffverhältnisse in der Zelle, und moduliert über die Bindung an GlnD die Aktivität dieses Proteins, welches dann GlnB uridylyliert oder deuridylyliert. Die nicht modifizierte Form von GlnB dient als Signal für Stickstoffüberschuss und die uridylylierte Form von GlnB dient als Signal für Stickstoffmangel. Je nach Form von GlnB reguliert dieses dann die Phosphorylierung des Stickstoffregulatorproteins NtrC durch die Histidin-Kinase NtrB und die Adenylylierung der Glutamin-Synthetase durch eine Adenylyltransferase (MERRICK & EDWARDS, 1995).

Bei *E. coli* und *Azotobacter vinelandii* wurde nachgewiesen, dass GlnK in Abhängigkeit von AmtB an die Membran binden kann und als negativer Regulator für die Transportaktivität von AmtB fungiert. Dabei hat die nicht uridylylierte Form von GlnK, die ausreichend Stickstoff in der Zelle anzeigt, eine höhere Affinität zu AmtB als die uridylylierte Form. Die Transkription des *glnK/amtB* Operons steht zwar unter der Kontrolle des Stickstoffregulationssystems NtrB/NtrC, so dass AmtB nur bei Stickstoffmangel gebildet wird, aber der zusammen mit AmtB exprimierte Regulator GlnK steht sofort zur Verfügung und kann die Feinregulation von AmtB übernehmen. Da die Regulation von AmtB nicht nur auf der Ebene der Transkription stattfindet, sondern auch über Protein-Protein Wechselwirkungen, kann die Zelle schneller auf Schwankungen im Stickstoffangebot reagieren (COUTTS et al., 2002).

Das GlnK Protein aus *Methanosarcina mazei* weist zu den meisten bakteriellen GlnK Stickstoffregulatorproteinen einige Unterschiede auf. Es bildet keine Heterotrimere mit bakteriellen GlnK Proteinen aus, was auf unterschiedliche Strukturen der bakteriellen und archaeellen Proteine schließen lässt. Es wird auch nicht von der *E. coli* Uridylyltransferase erkannt und bei Stickstoffmangel kovalent modifiziert, obwohl der konservierte Tyrosin-Rest an Position 51 vorhanden ist, an dem die Modifikation bei *E. coli* erfolgt. Es ist aber wahrscheinlich, dass eine Uridylylierung von *Methanosarcina mazei* GlnK für seine regulatorische Funktion nicht nötig ist, da eine *E. coli* *glnK* Mutante funktional durch *Methanosarcina mazei* GlnK komplementiert wird. Dieses Ergebnis weist stark darauf hin, dass das Signalprotein GlnK bei der Stickstoffregulation bei *Methanosarcina mazei* beteiligt ist (EHLERS et al., 2002a).

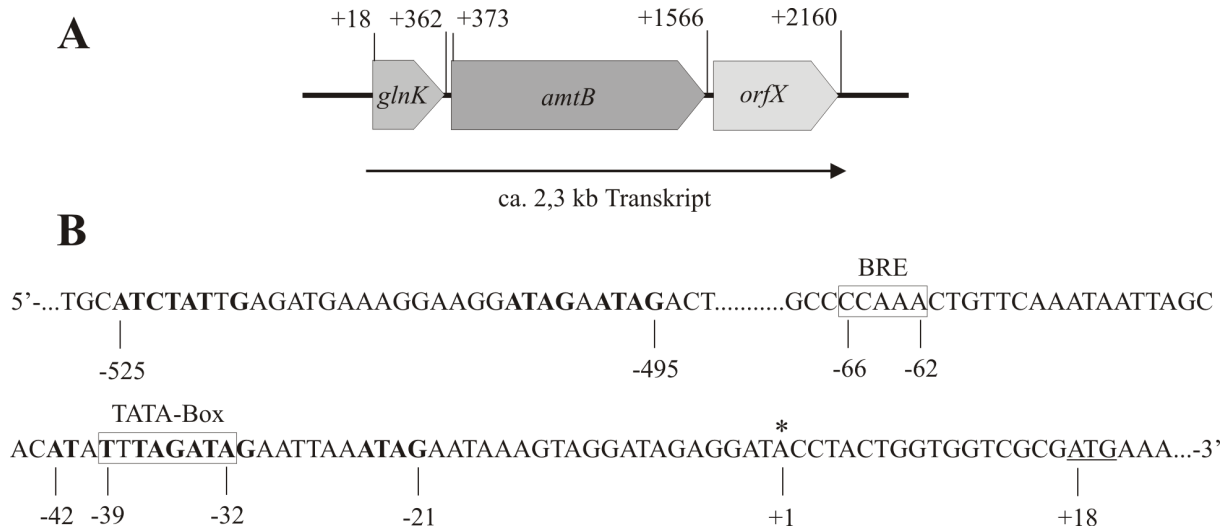


Abb. 1A: Organisation des *Methanosarcina mazei glnK/amtB* Operons (EHLERS et al., 2002a)

Es sind die drei offenen Leseraster und das bei Stickstoffmangel beobachtete Transkript angegeben. Die Nummerierung erfolgt relativ zum Transkriptionsstart.

Abb. 1B: Sequenz der Promotorregion stromaufwärts des *glnK* Gens von *Methanosarcina mazei* (modifiziert nach EHLERS et al., 2002a)

Das vermutliche Startcodon der Translation ist unterstrichen. Der experimentell bestimmte Startpunkt der Transkription ist mit einem Stern gekennzeichnet. Die Positionen des BRE (TFB-Recognition-Element) und der TATA-Box sind eingrahmt. Nukleotide, die mit der Konsensussequenz der AmtR Bindungsstelle aus *Corynebacterium glutamicum* übereinstimmen sind fett gedruckt. Die Nummerierung erfolgt relativ zum Transkriptionsstart.

Das Genom von *Methanosarcina mazei* enthält zwei *glnK/amtB* Operone. Aber nur das eine GlnK Protein wird unterschiedlich exprimiert in Abhängigkeit von der Stickstoffverfügbarkeit. Weiterhin wird nur auf das *glnK/amtB* Operon eingegangen, das dieses unterschiedlich exprimierte GlnK Protein kodiert. Die Transkription dieses *glnK/amtB* Operons ist bei Ammoniumanwesenheit fast vollständig reprimiert, bei N-Limitierung hingegen wird das Operon stark induziert. Es wird dann ein einziges ca. 2,3 kb großes Transkript gebildet, welches das offene Leseraster von *glnK*, *amtB* und eines unbekanntes Gens stromabwärts von *amtB* beinhaltet (Abb. 1A). Der Transkriptionsstart liegt 17 bp stromaufwärts des vermutlichen Translationsstarts von *glnK*. Es gibt 66 bp bis 32 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts von *glnK* einen potentiellen Promotor mit BRE (TFB-Recognition-Element) und TATA-Box. Vor dem *amtB* Gen konnten keine weiteren Promotorsequenzen gefunden werden (EHLERS et al., 2002a). Bei der weiteren Analyse des *glnK/amtB* Operons aus *Methanosarcina mazei* wurde 495 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts eine Sequenz gefunden, die große Ähnlichkeit mit der Konsensussequenz des Bindungsmotivs von AmtR aus *Corynebacterium glutamicum* aufweist (SCHMITZ-STREIT, nicht publiziert). Außerdem konnte eine weitere potentielle Bindungsstelle für AmtR im Bereich der TATA-Box vor dem *glnK/amtB* Operon entdeckt werden (Abb. 1B und Tab. 1).

Das nicht pathogene gram-positive Bakterium *Corynebacterium glutamicum* besitzt weder das NtrB/NtrC System aus *E. coli* noch ein vergleichbares System wie *Bacillus subtilis*, sondern den globalen Repressor AmtR für die Regulation der Gene des Stickstoffmetabolismus (BURKOVSKI, 2003). Die Sequenz des Repressors AmtR konnte auch im Genom von *Corynebacterium efficiens* und *Mycobacterium bovis* gefunden werden. Die Aminosäuresequenz von AmtR besitzt eine geringe, aber signifikante Ähnlichkeit mit den

Transkriptionsregulatoren der TetR/ArcR Familie, vor allem im Bereich des typischen Helix-Turn-Helix-Motivs (JAKOBY et al., 2000). Die Transkription des *amtB/glnK/glnD* Operons, *amt/ocd/soxA* Operons, *gltB/gltD* Operons und des *glnA* Gens stehen bei *Corynebacterium glutamicum* unter der Kontrolle von AmtR und werden in Abhängigkeit vom Stickstoffangebot reguliert (JAKOBY et al., 2000; BURKOVSKI, 2003; BECKERS et al., 2001; NOLDEN et al., 2001a). Die Deletion des Gens *amtR*, welches den Repressor AmtR kodiert, führt zur Deregulation der Transkription des Gens *amt*, welches ein Paralog von *amtB* kodiert. Gel-Retardationsexperimente zeigten, dass rekombinantes AmtR stromaufwärts der von ihm regulierten Gene bindet. Durch Deletionsanalysen konnte das Sequenzmotiv 5'-ATCTATAG-N₄ATAG-3' für die Bindung von AmtR ermittelt werden. Es konnte auch die *in vivo* Bindung von AmtR an dieses Sequenzmotiv in *Saccharomyces cerevisiae* mit Hilfe eines „One-Hybrid Systems“ gezeigt werden (JAKOBY et al., 2000). Die Stringenz der von AmtR vermittelten Hemmung wird durch eine Verdopplung oder Verkürzung des Bindungsmotivs reguliert. Während vor dem strikt regulierten *amt* Gen zwei komplette Bindungsmotive vorhanden sind, ist vor dem schwach gehemmten *glnA* Gen nur die verkürzte Form ATCTAT des Bindungsmotivs vorhanden (BURKOVSKI, 2003). Der Zwischenraum zwischen dem 5'- (ATCTATAG) und 3'-Anteil (ATAG) des Bindungsmotivs ist bei den verschiedenen Bindungsstellen variabel. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl ein Zwischenraum von einem Nukleotid, als auch von 10 Nukleotiden zur Bindung von AmtR führt (JAKOBY et al., 2000). Vor dem *amtB* Gen liegt eine Konsensussequenz des Bindungsmotivs auf dem zum Gen komplementären Strang. Es konnte aber gezeigt werden, dass auch die Regulation des *amtB* Gens in Abhängigkeit vom Stickstoffangebot durch AmtR erfolgt (JAKOBY et al., 2000). Beim *gltB/gltD* Operon liegt eine verkürzte Version des Bindungsmotivs, mit der Sequenz ATCTATAG, auf dem gegenüberliegenden Strang stromaufwärts des Operons. Auch die Transkription des *gltB/gltD* Operons wird stickstoffabhängig von AmtR reguliert (BECKERS et al., 2001). Stromaufwärts von *amtR* liegt die Sequenz ATCGATAC-N₃ATAG, bei der zwei Nukleotide im Vergleich zur Konsensussequenz des Bindungsmotivs ausgetauscht sind. An diese Sequenz bindet AmtR nicht, es findet also keine Autoregulation der Transkription des *amtR* Gens durch den Repressor statt. Das *amtR* Gen wird konstitutiv exprimiert (JAKOBY et al., 2000).

Nukleotidsequenz	Stringenz der Hemmung	Gen	Organismus
ATCTATAG-AACG-ATAG	++	<i>amt₁</i>	<i>C. glutamicum</i>
ATCTATAG-GCGG-ATAG	++	<i>amt₂</i>	<i>C. glutamicum</i>
ATCTATAG-A-ATAG	++	<i>amtB</i>	<i>C. glutamicum</i>
ATCTATAG	++	<i>gltB</i>	<i>C. glutamicum</i>
ATCTAT	+	<i>glnA</i>	<i>C. glutamicum</i>
ATCGATAC-CAA-ATAG	-	<i>amtR</i>	<i>C. glutamicum</i>
ATCTATTG-AGATGAAAGGAAGG-ATAGAATAG	?	<i>glnK₁</i>	<i>M. mazei</i>
ATATTTAG-ATAG-AATTAA-ATAG	?	<i>glnK₂</i>	<i>M. mazei</i>

Tab. 1: Nukleotidsequenz der AmtR Bindungsstelle (Quelle für *Corynebacterium glutamicum*: siehe obiger Text, *Methanosarcina mazei*: nicht publiziert)

In der ersten Spalte wird die Nukleotidsequenz der AmtR Bindungsstelle bzw. vermuteten AmtR Bindungsstelle angegeben. In der zweiten Spalte wird die Stringenz der durch die Bindung von AmtR an die Bindungsstelle bewirkten Transkriptionshemmung angezeigt. In der dritten Spalte wird das Gen genannt, vor dem die Bindungsstellen-Sequenz stromaufwärts liegt. Die Sequenzen vor dem *amtB* und *gltB* Gen liegen auf dem zum Gen komplementären Strang. In der vierten Spalte ist der betreffende Organismus erwähnt. Die Nukleotide der vermuteten Konsensussequenz sind fett gedruckt.

Das Signal, das die Freisetzung von AmtR von der Bindungsstelle vor den regulierten Genen vermittelt ist bisher nicht genau bekannt. GlnK ist aber bei *Corynebacterium glutamicum* essentiell für die Kontrolle der Gene des Stickstoffmetabolismus (NOLDEN et al., 2001b). *Corynebacterium glutamicum* besitzt im Gegensatz zu *E. coli* nur ein P_{II} Signalübertragungsprotein (JAKOBY et al., 1999). Bei einer *glnK* Mutante wird bei Stickstoffmangel kein Transkript von den Genen *amt*, *amtB* und *glnD* gebildet. Damit diese Gene transkribiert werden, ist außerdem eine Uridylylierung von GlnK am Tyrosin-Rest 51 nötig. Bei einem Aminosäureaustausch an Position 51 von GlnK werden die Gene *amt*, *amtB*, *glnK* und *glnD* nicht mehr transkribiert. Die Signalübertragung auf GlnK erfolgt durch eine Uridylyltransferase, welche von *glnD* kodiert wird. Bei einer *glnD* Mutante kann ebenfalls kein Transkript von *amt*, *amtB* und *glnK* detektiert werden, da die Uridylylierung von GlnK nicht mehr stattfinden kann. Eine Überexpression von *glnD* führt dagegen zu einer geschwächten AmtR Hemmung der Transkription von *amt*, sogar bei einem ausreichenden Stickstoffangebot wird dann das *amt* Gen transkribiert (NOLDEN et al., 2001b). Auch für die Aufhebung der Hemmung der Transkription von *glnA* konnte inzwischen gezeigt werden, dass GlnK und die Uridylyltransferase essentiell sind (NOLDEN et al., 2001a).

Die Anordnung der Gene *amtB*, *glnK* und *glnD* in einem Operon führt zu einer Autoregulation der Uridylyltransferase Synthese. Bei Stickstoffmangel wird die Expression von *glnK* und *glnD* gesteigert, die Anzahl der GlnK und Uridylyltransferase Moleküle steigt und die Uridylylierung von GlnK führt zu einer verstärkten Transkription des *amtB/glnK/glnD* Operons. Im Gegensatz zu *E. coli* wird die Expression des *glnD* Gens bei *Corynebacterium glutamicum* bei Stickstoffmangel heraufreguliert, da es im *amtB/glnK/glnD* Operon angeordnet ist. Dies, und das die interne Ammoniummenge und nicht die Glutaminmenge bei *Corynebacterium glutamicum* das primäre Signal für Stickstoffmangel zu sein scheint, deutet darauf hin, dass GlnD nicht der primäre Sensor der Stickstoffverhältnisse in der Zelle ist, wie bei *E. coli*. Es muss eine Kaskade von einem oder mehreren bisher unbekanntem Sensorproteinen für Stickstoff geben, die das Stickstoffsignal über die Uridylyltransferase an GlnK weitergeben. Neben Enzymaktivitäten reguliert diese Kaskade über den globalen Repressor AmtR die Transkription der stickstoffabhängig transkribierten Gene. Die Uridylylierung von GlnK als Voraussetzung für die Aufhebung der AmtR abhängigen Hemmung der stickstoffabhängig transkribierten Gene weist darauf hin, dass eine direkte Protein-Protein Interaktion zwischen AmtR und uridylylierten GlnK stattfindet (NOLDEN et al., 2001b).

Von der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Schmitz-Streit in Göttingen wurde ein Gen aus *Methanosarcina mazei* kloniert, von dem die abgeleitete Aminosäuresequenz Ähnlichkeit mit dem AmtR Protein aus *Corynebacterium glutamicum* aufweist. Das Gen wurde in *E. coli* exprimiert, das rekombinante Protein aufgereinigt und anschließend spezifische Antikörper gegen das Protein hergestellt. Transkriptionsanalysen mittels RT-PCR und Expressionsanalysen mittels Western Blot von *Methanosarcina mazei* Zellen, die mit verschiedenen Stickstoffangeboten gewachsen waren, ergaben, dass die Transkription des potentiellen *amtR* Gens und die Synthese des potentiellen AmtR Proteins unabhängig von den Stickstoffverhältnissen der Zelle erfolgen (SCHMITZ-STREIT, nicht publiziert). Das Protein AmtR aus *Methanosarcina mazei* kann hier nicht weiter charakterisiert werden, weil es sich dabei um bisher nicht publizierte Daten von der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Schmitz-Streit handelt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss des potentiellen Regulatorproteins AmtR aus *Methanosarcina mazei* auf die *in vitro* Transkription des *in vivo* in Abhängigkeit vom Stickstoffangebot transkribierten *glnK/amtB* Operons aus *Methanosarcina mazei* studiert

werden. Außerdem sollte in Gel-Retardationsexperimenten untersucht werden, ob das potentielle Regulatorprotein AmtR die Bindung von TBP/TFB und, bzw. oder, der RNA-Polymerase an den Promotor des *glnK/amtB* Operons aus *Methanosarcina mazei* beeinflusst. Dies wurde in Abhängigkeit vom Vorhandensein der potentiellen Bindungsstelle 495 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts untersucht.

Als Voraussetzung für die Untersuchungen zur Regulation der Transkription bei *Methanosarcina mazei* musste jedoch zunächst ein zellfreies Transkriptionssystem für diesen Organismus erstellt werden. Zu Beginn dieser Arbeit war das Genom von *Methanosarcina mazei* noch nicht sequenziert (DEPPENMEIER et al., 2002). Daher mussten zuerst die Gene der beiden basalen Transkriptionsfaktoren TBP und TFB identifiziert werden. Anschließend wurden die Gene in *E. coli* kloniert und die exprimierten rekombinanten Proteine gereinigt. Nachdem die Aktivität von TBP und TFB nachgewiesen worden war, sollte zur Erstellung eines homogenen *Methanosarcina mazei in vitro* Transkriptionssystems auch die RNA-Polymerase aus diesem Organismus gereinigt werden. Da diese aber, wie sich herausstellte, *in vitro* nicht aktiv war wurde die RNA-Polymerase aus *Methanococcus thermolithotrophicus* gereinigt, um ein funktionelles zellfreies Transkriptionssystem mit TBP und TFB von *Methanosarcina mazei* und *Methanococcus thermolithotrophicus* RNA-Polymerase zu erhalten. Mit der Etablierung dieses Transkriptionssystems eröffnete sich dann die Möglichkeit die Transkription der Hitzeschockgene *grpE*, *dnaK* und *dnaJ in vitro* zu studieren, und den Einfluss des Transkriptionsfaktors TFE und des potentiellen Repressors AmtR auf die Transkription zu untersuchen. Die Verwendung des *in vitro* Transkriptionssystems mit standardisierten Bedingungen ohne den Einfluss unbekannter oder unerwünschter Komponenten, wie es *in vivo* der Fall wäre, erlaubt dabei den einzelnen Proteinen regulatorische Funktionen bei der Transkription zuzuordnen.

II Material und Methoden

1 Material

1.1 Bakterienstämme und Bacteriophagen

Bakterienstämme

Escherichia coli

XL1-Blue MRF'	(Stratagene, La Jolla, USA)
XLORL	(Stratagene, La Jolla, USA)
INV α F'	(Invitrogen, Carlsbad, USA)
JM109	(YANISCH-PERRON et al., 1985)
BL21-CodonPlus™ (DE3)-RIL	(Stratagene, La Jolla, USA)
<i>Methanosarcina mazei</i> Goe1	(DSM, Stamm-Nr. 3647)

Bacteriophagen

Genomische λ -Genbank von *Methanosarcina mazei* S-6, 8×10^7 pfu/ μ l (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Everly Conway de Macario, Albany, New York, USA).

Ex-Assist™ Helferphage (M13), 1×10^{10} pfu/ml (Stratagene, La Jolla, USA).

1.2 Plasmide, genomische DNA und Oligonukleotide

Plasmide

pet14b	4671 bp großer Expressionsvektor, Amp ^r (Novagen, Madison, USA)
pIC19H	2722 bp großes Plasmid, diente mit <i>Bam</i> HI und <i>Hin</i> flI hydrolisiert als Längenstandard für DNA in Agarosegelen (MARSH et al., 1984)
pIC31/2	2985 bp großes Plasmid, in welches die Sequenz von Position – 58 bis + 131 des tRNA ^{Val} Gens von <i>Methanococcus vannielii</i> kloniert wurde (HAUSNER et al., 1991)
pLUW479	pUC19 Plasmid, in welches die Sequenz des <i>gdh</i> Gens von <i>Pyrococcus furiosus</i> bis Position – 201 kloniert wurde (HETHKE et al., 1996)
pRS216	pBluescript II SK (+) Plasmid (Stratagene, La Jolla, USA), in welches in die <i>Eco</i> RV Schnittstelle die Sequenz von Position – 570 bis + 55 des <i>glnK</i> Gens von <i>Methanosarcina mazei</i> kloniert wurde (SCHMITZ-STREIT, nicht publiziert)

pUC19	2686 bp großer Klonierungsvektor, 54 bp lange multiple Klonierungsstelle flankiert von Bindungsstellen für M13-Oligonukleotide, Amp ^r (Roche, Mannheim)
upatpase	pUC18 Plasmid, in welches die Sequenz des <i>aaa</i> ⁺ <i>atpase</i> Promotors von <i>Pyrococcus furiosus</i> in die <i>Sma</i> I Schnittstelle kloniert wurde (VIERKE et al., 2003)
uphsp20	pUC18 Plasmid, in welches die Sequenz des <i>hsp20</i> Promotors von <i>Pyrococcus furiosus</i> kloniert wurde (VIERKE et al., 2003)

Genomische DNA

Genomische DNA von *Methanosarcina mazei* S-6, 8µg/µl (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Everly Conway de Macario, Albany, New York, USA).

Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Annealingtemp.
mmtfb1.1	5' -GAR TGG MGN GCN TTY GAY CAY GAR CA-3'	45 °C
mmtfb1.2	5' -GAA TGG AGR GCH TTY GAY CAY GAA CAG-3'	60 °C - 40 °C
mmtfb2.1	5' -ACN ATH CAY GAY AAR GG-3'	60 °C - 40 °C
mmtfb2.2	5' -ACH ATT CAY GAY AAR GG-3'	60 °C - 40 °C
mmtfb3.1	5' -TAN GTN CKN CCD ATY TCY TT-3'	60 °C - 40 °C
mmtfb3.2	5' -TAD GTY CTK CCD ATT TCY TT-3'	60 °C - 40 °C
mmtfb4.1	5' -TCY TTR TAN CKR TTN CKD ATN GTN ACY TC-3'	60 °C - 40 °C
mmtfb4.2	5' -TTC YTT GTA YCT GTT YCT DAT DGT DAC TTC-3'	45 °C
mmtfb 5	5' -TGA TTG ACT GGA GAA ACC GTG ACT-3'	55 °C
mmtfb 6	5' -GAG AAG TCC AGT CCA AGA GCG TT-3'	55 °C
mmtfb 7	5' -AGT CAC GGT TTC TCC AGT CAA TCA-3'	55 °C
mmtfb 8	5' -AAC GCT CTT GGA CTG GAC TTC TC-3'	55 °C
T3	5' -AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3'	55 °C
T7	5' -GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'	55 °C
mmtfb9	5' -CCT GAT TCT GAA ACT CGG GCT CTA G-3'	56 °C
mmtfb10	5' -GAG TTC GCT ATT CGG ACA CCC TTG-3'	56 °C
mmtfb11	5' -CCT CAT CCG TGG AAG AAG CAT TG-3'	56 °C
mmtfb12	5' -CTT TGC GAG CTT TAA TCA TGG CAC G-3'	56 °C
mmtfb13	5' -GCT TCT TCC ACG GAT GAG GTT CTT G-3'	56 °C
mmtfb14	5' -GGA ACA GTT TAT GAG CAC AGC CGC G-3'	56 °C
mmtfbexp-F	5' -GGA ATT CCA TAT GGT AGA AGT CGA AAG AG-3'	55 °C
mmtfbexp-R	5' -CGC GGA TCC TTA GAG GAT AAT CTC GAT ATC-3'	55 °C
T7-Promotor	5' -TAA TAC GAC TCA CTA TAG G-3'	48 °C
T7-Terminator	5' -GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3'	48 °C
M13 FU	5' -GCC AGG GTT TTC CCA GTC ACG A-3'	60 °C
M13 RU	5' -GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG-3'	60 °C
mmtfe-exp-f	5' -GGA ATT CCA TAT GAA CAC TTT GGT CGA TTT AAA TG-3'	60 °C
mmtfe-exp-r	5' -GCG GGA TCC TTA TGC GGA ACT CAA AGC TTC-3'	60 °C
grpe-f	5' -CAG GTT ATC TCG GCA GTT GCG GC-3'	55 °C
grpe-r	5' -CGG AAT TTC GGG CTT CGG AAC G-3'	55 °C
dnak-fl	5' -CTG AGA ATT CAC CGA ATC ATT ACT G-3'	55 °C
dnak-f2	5' -CTG CTT AAG TAA ACC TGT CAG GTA TC-3'	55 °C
dnak-r	5' -GAG TTG TCC TGC TGC CTT CGG C-3'	55 °C
dnaj-f	5' -CGA AAA GCG TAA GTA ATT GAA GAA G-3'	55 °C
dnaj-r	5' -GGT TCT TTG TTC CTG TCA GGG TG-3'	55 °C
*bio-grpe-r	5' -CGG AAT TTC GGG CTT CGG AAC G-3'	55 °C
pUC19-f	5' -CAG CAA TAA ACC AGC CAG CCG-3'	58 °C

*bio-pUC19-r	5' -CAA CTT ACT TCT GAC AAC GAT CGG-3'	58 °C
amtRbindF	5' -CCA CAT GCG GTC TTC AG-3'	50 °C
amtRbindF1	5' -GAA AAG GGG AAG TCT GGG-3'	50 °C
amtRbindR	5' -CCT TTC AGG CCT TAT CAT TG-3'	50 °C

Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Die erste Spalte gibt die Bezeichnung des Oligonukleotids an, in der zweiten Spalte wird die Sequenz gezeigt und in der dritten Spalte ist die verwendete Annealingtemperatur angegeben. Die in der ersten Spalte mit einem Stern markierten Oligonukleotide besitzen am 5'-Ende eine Modifikation durch Biotin.

1.3 Enzyme und andere Proteine

Ampli Cycle™ Sequencing Kit	Perkin Elmer, Cetus, Norwalk (USA)
AMV Reverse Transkriptase	Roche, Mannheim
BSA	MBI Fermentas, Wilna (Litauen)
Proteinase K	Roche, Mannheim
Ready Reaction DyeDeoxy Terminator	
AmpliTaq®,FS Kit	Perkin Elmer, Cetus, Norwalk (USA)
T4 DNA-Ligase	Roche, Mannheim
T4 Polynukleotid-Kinase	MBI Fermentas, Wilna (Litauen)
Taq-DNA-Polymerase	Diagonal, Münster

Restriktionsenzyme:

<i>Bam</i> HI	Roche, Mannheim
<i>Hinc</i> II	New England Biolabs, Schwalbach
<i>Hind</i> III	MBI Fermentas, Wilna (Litauen)
<i>Hinfl</i>	Roche, Mannheim
<i>Kpn</i> I	Roche, Mannheim
<i>Nde</i> I	New England Biolabs, Schwalbach
<i>Pae</i> I	MBI Fermentas, Wilna (Litauen)
<i>Sfu</i> I	Roche, Mannheim
<i>Sma</i> I	New England Biolabs, Schwalbach
<i>Xba</i> I	Roche, Mannheim

Die Reaktionen wurden nach Vorschrift der Hersteller, mit den für die Enzyme mitgelieferten Reagenzien, durchgeführt.

Die Transkriptionsfaktoren TBP und TFB von *Methanococcus thermolithotrophicus* wurden von Herrn PD Dr. Winfried Hausner (Kiel) zur Verfügung gestellt (HAUSNER et al., 2000). Für den Nachweis der Aktivität der rekombinanten *Methanosarcina mazei* Faktoren TBP und TFB wurde auch die RNA-Polymerase von *Methanococcus thermolithotrophicus* von ihm zur Verfügung gestellt (HAUSNER & THOMM, 1993).

Das rekombinante gereinigte potentielle Regulatorprotein AmtR von *Methanosarcina mazei* wurde von Frau PD Dr. Ruth Schmitz-Streit (Göttingen) zur Verfügung gestellt (nicht publiziert, Accession Number „AF399744“). Das Protein lag in 20 mM Tris/HCl pH 8.0 vor.

1.4 Chemikalien

Agarose (reinst)	Roche, Mannheim
Alconox	Sigma, St. Louis (USA)
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
APS	Serva, Heidelberg
Bacto Agar	Difco, Detroit (USA)
Bacto Hefeextrakt	Difco, Detroit (USA)
Bacto Trypton	Difco, Detroit (USA)
BCIP/NBT-Lösung	Amresco, Solon (USA)
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Caseinhydrolysat (enzymatisch)	Gibco BRL, Gaithersburg (USA)
Cäsiumchlorid	Biomol, Ilvesheim
CDP Star™	Roche, Mannheim
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R 250	Serva, Heidelberg
DEAE-Cellulose (DE 52)	Whatman, Maidenstone (GB)
Desoxyribonukleotide	MBI Fermentas, Wilna (Litauen)
Dialyseschläuche	Serva, Heidelberg
DIG DNA Labeling and Detection Kit	Roche, Mannheim
DIG Easy Hyb	Roche, Mannheim
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, St. Louis (USA)
DNA Extraction Kit	MBI Fermentas, Wilna (Litauen)
DNA Längenstandard VII (DIG-markiert)	Roche, Mannheim
DTT	Roche, Mannheim
EDTA	Serva, Heidelberg
Essigsäure (60%)	Biesterfeld, Hamburg
Ethanol	Serva, Heidelberg
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Formamid	Sigma, St. Louis (USA)
Glyzerin (87%)	Riedel de Haen, Seelze
Glycin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Gibco BRL, Gaithersburg (USA)
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche, Mannheim
IPTG	Roche, Mannheim
1 kb DNA Leiter	MBI Fermentas, Wilna (Litauen)
Lysozym	Roche, Mannheim
Maleinsäure	Sigma, St. Louis (USA)
Maltose	Sigma, St. Louis (USA)
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Sigma, St. Louis (USA)
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schüll, Dassel
Oligonukleotide	MWG Biotech, Ebersberg
PEG 8000	Sigma, St. Louis (USA)
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
poly [d(A-T)]	Roche, Mannheim
poly-[d(I-C)]	Roche, Mannheim
Protein Test Mixture 4 und 5	Serva, Heidelberg
Radionukleotide	Hartmann Analytic, Braunschweig
Ribonukleotide	MBI Fermentas, Wilna (Litauen)

Röntgenfilme: KODAK BioMax MR	Kodak, Rochester (GB)
X-OMAT AR	Kodak, Rochester (GB)
Fuji NIF RX	Fuji, Tokio (Japan)
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
(Acrylamid:Bisacrylamid 30:0,8)	
Rotiszint 11 eco	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Sigma, St. Louis (USA)
SDS	Serva, Heidelberg
Serva Blue G	Serva, Heidelberg
Sigmacote	Sigma, St. Louis (USA)
Streptavidin-Magnetpartikel	Roche, Mannheim
TEMED	Serva, Heidelberg
Tetrazyklin	Sigma, St. Louis (USA)
Tris	Biomol, Ilvesheim
Tween 20	Fluka, Buchs (Schweiz)
Whatman-Papier	Whatman, Maidenstone, (GB)
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

Nicht aufgeführte Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

1.5 Nährmedien

Luria-Broth (LB₀)

Bacto Trypton	10,0	g
Bacto Hefeextrakt	5,0	g
NaCl	5,0	g
ad 1000 ml mit Milli-Q H ₂ O		
pH 7.5		

LB₀-Agar

Dem LB₀-Flüssigmedium wurde 1,5% Bacto Agar zugefügt.

LB₀-Flüssigmedium und -Agar mit Antibiotika und Supplementen

Ampicillin	100,0	µg/ml
Chloramphenicol	34,0	µg/ml
Tetrazyklin	12,5	µg/ml
IPTG	0,5	mmol/l
Maltose	0,2	% (w/v)
MgSO ₄	10,0	mM

Die Antibiotika und Supplemente wurden sterilfiltriert und dem LB₀-Medium nach dem Autoklavieren (bei LB₀-Agar direkt vor dem Gießen, wenn dieser auf ca. 55 °C abgekühlt war) zugegeben.

NZY-Broth

NaCl	5,0	g
MgSO ₄	2,0	g
Bacto Hefeextrakt	5,0	g
Caseinhydrolysat (enzymatisch)	10,0	g
ad 1000 ml mit Milli-Q H ₂ O		
pH 7.5		

NZY-Agar

Dem NZY-Flüssigmedium wurde 1,5% Bacto Agar zugefügt.

NZY-Weichagarose (Top-Agar)

Dem NZY-Flüssigmedium wurde 0,7% Agarose zugefügt.

SOC-Medium

Bacto Hefeextrakt	0,5	% (w/v)
Bacto Trypton	2,0	% (w/v)
NaCl	10,0	mM
KCl	2,5	mM
MgCl ₂	10,0	mM
MgSO ₄	10,0	mM
Glucose	20,0	mM

1.6 Puffer und LösungenSM-Puffer

NaCl	5,8	g
MgSO ₄	2,0	g
1 M Tris/HCl, pH 7.5	50,0	ml
2% Gelatine	5,0	ml
ad 1000 ml mit Milli-Q H ₂ O		

Denaturierungslösung für Plaquehybridisierung

NaOH	0,5	M
NaCl	1,5	M

Neutralisierungslösung für Plaquehybridisierung

Tris/HCl pH 7.5	1,0	M
NaCl	1,5	M

20 x SSC-Puffer

NaCl	3,0	M
Natriumcitrat pH 7.0	0,3	M

Waschpuffer I

2 x SSC SDS	0,1	% (w/v)
----------------	-----	---------

Waschpuffer II

0,5 x SSC SDS	0,1	% (w/v)
------------------	-----	---------

Maleinsäurepuffer

Maleinsäure	100,0	mM
NaCl pH 7.5	150,0	mM

Blockierungslösung

1% Blockingreagenz in Maleinsäurepuffer

Waschpuffer III

Maleinsäurepuffer mit 0,3% Tween 20

Detektionspuffer

Tris/HCl pH 9.5	100,0	mM
NaCl	100,0	mM

TE-Puffer 10:0,1

Tris/HCl pH 8.0	10,0	mM
EDTA	0,1	mM

TBE-Puffer (10-fach)

Tris	900	mM
Borsäure	900	mM
EDTA pH 8.0	20	mM

Auftragspuffer für Agarosegele (6-fach)

Saccharose	50,0	% (w/v)
Harnstoff	4,0	M
EDTA	50,0	mM
Bromphenolblau	0,1	% (w/v)

Auftragspuffer für SDS-PA-Gele (5-fach)

SDS 10%	5,0	% (v/v)
DTT	250	mM
Tris/HCl pH 6.8	250	mM
Glyzerin	50	% (v/v)
Bromphenolblau	0,5	% (w/v)

SDS-Gelelektrophorese-Laufpuffer (5-fach)

Tris	125	mM
Glycin	960	mM
SDS 10%	0.5	% (v/v)

Proteinstandard für SDS-PA-Gele

Protein Mixture 4 (5 mg/ml)	40	µl
Protein Mixture 5 (1 mg/ml)	200	µl
SDS-Auftragspuffer (5-fach) ad 500 µl mit Milli-Q H ₂ O	100	µl

SDS-PA-Gellösung (12%)

Trenngel:

Rotiphorese Gel 30	6,0	ml
4 x Tris/HCl(1,5 M)SDS(0,4%) pH 8.8	3,75	ml
Milli-Q H ₂ O	5,25	ml
APS (10%)	50	µl
TEMED	10	µl

Sammelgel:

Rotiphorese Gel 30	1,0	ml
4 x Tris/HCl(0,5 M)SDS(0,4%) pH 6.8	2,0	ml
Milli-Q H ₂ O	4,7	ml
APS (10%)	40	µl
TEMED	8	µl

Fixierlösung für SDS-PA-Gele

Essigsäure (60%)	167	ml
Isopropanol	250	ml
ad 1000 ml mit Milli-Q H ₂ O		

Färbelösung für SDS-PA-Gele

Essigsäure (60%)	167	ml
Serva Blue G	0,5	g
ad 1000 ml mit Milli-Q H ₂ O		

Entfärber für SDS-PA-Gele

Essigsäure (60%)	167	ml
ad 1000 ml mit Milli-Q H ₂ O		

Auftragspuffer für PA-Harnstoffgele (3-fach)

Formamid (deionisiert)	98,0	% (v/v)
Bromphenolblau	0,1	% (w/v)
Xylencyanol	0,1	% (w/v)
EDTA pH 8.0	10,0	mM

Stammlösung für 10%iges PA-Harnstoff-Gel

Rotiphorese Gel 30	333,3	ml
Harnstoff	420,0	g
10 x TBE	100	ml
ad 1000 ml mit Milli-Q H ₂ O		

Das Gemisch wurde bis zur vollständigen Lösung aller Substanzen unter Rühren erwärmt. Anschließend wurde die Lösung mit Hilfe einer Saugflasche über Membranfilter (45 µm) filtriert und gleichzeitig entgast. Sequenzgele und andersprozentige PA-Harnstoff-Gele enthielten die gleichen Bestandteile. Es erfolgte jeweils eine entsprechende Umrechnung der Rotiphorese Gel 30 Menge.

5%ige PA-Gellösung für Gel-Retardationsexperimente

Rotiphorese Gel 30	83,3	ml
10 x TBE	50,0	ml
ad 500 ml mit Milli-Q H ₂ O		

Die Gellösung wurde mit Hilfe einer Saugflasche über Membranfilter (45 µm) filtriert und gleichzeitig entgast.

Auftragspuffer für den ABI PRISM™ 373 Plattensequenzierer

Formamid	80	% (v/v)
EDTA (25 mM) ph 8.0	19,9	% (v/v)
Xylencyanol	0,1	% (w/v)

Puffer für die Kopplung von Streptavidin-Magnetpartikeln mit 5'-Biotin-markierter DNA

Bindepuffer 1:

Tris/HCl pH 7.5	10	mM
EDTA	1	mM
NaCl	100	mM

Bindpuffer 2:

Tris/HCl pH 7.5	50	mM
EDTA	1	mM
NaCl	100	mM

Waschpuffer:

Tris/HCl pH 7.5	10	mM
EDTA	1	mM
NaCl	1	M

Transkriptionspuffer (5-fach)

Tris/HCl pH 8.5	100	mM
EDTA	0,5	mM
DTT	15	mM
MgCl ₂	10	mM
KCl	200	mM

Transkriptionspuffer (5-fach) nach Optimierung

Tris/HCl pH 9.0	100	mM
EDTA	1	mM
DTT	30	mM
MgCl ₂	20	mM
KCl	400	mM

Nukleosidtriphosphat-Mix für Transkription (25-fach)

ATP	500	μM
CTP	500	μM
GTP	500	μM
UTP	25	μM
[α- ³² P]UTP	1,5	μCi

Plasmidisolierung (Maxi-Präp)

Saccharose-Lösung:

Saccharose	25	% (w/v)
Tris/HCl pH 8.0	50	mM

Lysozym-Lösung:

Lysozym	10	mg/ml
Tris/HCl pH 8.0	50	mM

Detergentien-Lösung:

Brij 35	1	% (v/v)
Natriumdesoxycholat	10	mM
EDTA pH 8.0	65	mM
Tris/HCl pH 8.0	50	mM

Zellaufschluss- und Bindepuffer für die Ni-NTA-Säule

NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	50	mM
Imidazol	10	mM
NaCl	300	mM
Glyzerin	10	% (v/v)
pH 8.0		

Der Zellaufschlusspuffer für die Überprüfung der Expression auf einem SDS-PA-Gel enthielt zusätzlich 8 M Harnstoff.

Elutionspuffer für die Ni-NTA-Säule

NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	50	mM
Imidazol	500	mM
NaCl	300	mM
Glyzerin	10	% (v/v)
pH 8.0		

Puffer für die Superdex-75- und 200-Säulen (TENa10-Puffer)

EDTA	1	mM
Tris/HCl pH 7.5	50	mM
NaCl	300	mM
Glyzerin	10	% (v/v)

Puffer für die Aufreinigung der *Methanosarcina mazei* Goe1 RNA-Polymerase

Alle Puffer enthielten als Redoxindikator 0,1% Resazurin. Zur Entfernung des gelösten Sauerstoffs erfolgte eine Begasung für 20 min mit Stickstoff. Spuren von Sauerstoff wurden durch Zugabe von 5 mM DTT entfernt. Die Reinigung der RNA-Polymerasen wurde bei Raumtemperatur in einer Anaerobenkammer (Coy Laboratory Products Inc., Michigan, USA) durchgeführt.

Zellaufschlusspuffer (TMK₄₀(N)-Puffer):

Tris/HCl pH 7.5	50	mM
MgCl ₂	10	mM
KCl	50	mM
Glyzerin	40	% (v/v)

DEAE-Cellulose-Säule und Heparin-Sepharose-Säule:

TMK₄₀(N) und TMK₄₀(H)

Der Hochsalz-Puffer TMK₄₀(H) enthält 800 mM KCl.

MonoQ-Säule:

TMK₂₀(N) und TMK₂₀(H)

Die Puffer enthalten statt 40% Glycerin nur 20% Glycerin.

Alle in Verbindung mit der FPLC-Anlage verwendeten Puffer wurden über Membranfilter (0,2 µm) filtriert und anschließend entgast.

Puffer für die Aufreinigung der *Methanococcus thermolithotrophicus* RNA-Polymerase

TMK₂₀(N):

Tris/HCl pH 7.5	50	mM
MgCl ₂	10	mM
KCl	50	mM
Glycerin	20	% (v/v)

Der Puffer TMK₂₀(H) enthält 1 M KCl.

Für den Zellaufschluss wurde TMK₂₀(N) verwendet. Für die DEAE-Cellulose-Säule, Heparin-Sepharose-Säule und MonoQ-Säule wurden TMK₂₀(N) und TMK₂₀(H) eingesetzt. Für die Superdex-200-Säule wurde TMK₂₀(N) verwendet.

TCA-Test

TP-Mix:

ATP	10,0	mM
UTP	1,0	mM
[α- ³² P]UTP	0,7	µCi (3000 Ci/mmol)

2 x Salz-Mix:

HEPES pH 7,3	80,0	mM
MgCl ₂	10,0	mM
KCl	250,0	mM
EDTA	0,2	mM

Fertig-Mix:

TP-Mix für TCA-Test	2,0	ml
poly[d(A-T)] (0,25 mg/ml)	2,0	ml
2 x Salz-Mix	10,0	ml
Milli-Q H ₂ O	6,0	ml

TCA-Stopplösung:

NaCl	160	mM
TCA	5,5	% (v/v)

2 Methoden

2.1 Identifizierung und Sequenzierung des *tfb* Gens von *Methanosarcina mazei*

Die Identifizierung des *tfb* Gens von *Methanosarcina mazei* in der genomischen λ -Genbank von *Methanosarcina mazei* S-6 wurde analog zu der in meiner Diplomarbeit beschriebenen Prozedur für das *tbp* Gen von *Methanosarcina mazei* durchgeführt (THOMSEN, 1998). Dort werden auch die Sequenzierung und weitere Methoden geschildert. Abweichend eingesetzte Oligonukleotide sind in der in dieser Arbeit enthaltenen Tab. 2 der Oligonukleotide aufgeführt. Die folgende Aufzählung gibt eine Übersicht der in der Diplomarbeit beschriebenen Methoden, die in dieser Arbeit Verwendung fanden:

- Kulturbedingungen der Bakterienstämme *E. coli* XL1-Blue MRF⁺ und *E. coli* XLORL
- Gelelektrophoresen: Agarosegele und Sequenzgele
- Herstellung des DNA-Längenstandards aus dem Plasmid pIC20H (die Fragmentlängen entsprechen dem in dieser Arbeit verwendeten Plasmid pIC19H)
- Konzentrationsbestimmung von DNA
- Restriktionshydrolysen
- Phenolisierung und Ethanol-fällung
- Reinigung von DNA über Agarosegelelektrophorese
- Ligation von DNA-Fragmenten
- Isolierung von Phagemid- und Plasmid-DNA
- PCR zur Identifizierung des gesuchten Gens in genomischer DNA von *Methanosarcina mazei*
- Sequenzierung der Sonden-DNA
- Sondenherstellung
- Hybridisierungen
- Immunologischer Nachweis gebundener Sonde
- PCR-Test von Klonen auf Existenz des Inserts („Kolonie-PCR“)
- Plattierung der λ -Genbank
- Durchsuchung der λ -Genbank nach positiven Klonen
- Präparation von Phagemiden
- Kartierung der Phagemide

- Sequenzierung der Phagemid-DNA

2.2 Klonierung von *Methanosarcina mazei* *tfb* und *tfe*

Viele Informationen zur Klonierung von *tfb* und *tfe* von *Methanosarcina mazei* werden im Ergebnisteil erwähnt, weshalb hier nur zusätzliche Details geschildert werden. Für die Klonierung in den Expressionsvektor pet14b wurden die Gene *tfb* und *tfe* von *Methanosarcina mazei* mittels PCR amplifiziert (SAIKI et al., 1985; SAIKI et al., 1988). Dafür wurde das „Expand™ High Fidelity PCR System“ (Roche, Mannheim) für *tfb* und Platinum® Pfx DNA-Polymerase (Gibco™ Invitrogen, Carlsbad, USA) für *tfe* nach Anleitung der Hersteller verwendet. Die Reaktionen wurden in einem Thermocycler (GenAmp PCR System 2400, Perkin Elmer) jeweils mit den Oligonukleotiden mmtfbexp-F und mmtfbexp-R bzw. mmtfe-exp-f und mmtfe-exp-r sowie genomischer *Methanosarcina mazei* S-6 DNA durchgeführt. Die Sequenzen der Oligonukleotide und die verwendete Annealingtemperatur werden in der Tab. 2 gezeigt. Der Erfolg der PCR wurde auf einem Agarosegel überprüft und die PCR-Produkte einer weiteren Reaktion mit dem „High Pure PCR Product Purification Kit“ (Roche, Mannheim) gereinigt. Die PCR-Produkte und der Expressionsvektor pet14b wurden mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *BamHI* bei 37 °C über Nacht (10 U/μg DNA) hydrolisiert und anschließend mittels eines präparativen Agarosegels mit dem „DNA Extraction Kit“ (MBI Fermentas, Wilna, Litauen) gereinigt. Die Ligation erfolgte mit T4 DNA-Ligase jeweils in einem 30 μl Ansatz bei Raumtemperatur über Nacht. Anschließend wurden die Ligationsansätze direkt für die Transformation verwendet.

Die Transformation von pet14b mit inserierten *tfb* Gen erfolgte in *E. coli* INVαF' Zellen (Invitrogen, Carlsbad, USA). Dabei wurde bis auf folgende Abweichungen nach Vorschrift des Herstellers vorgegangen: Es wurden 125 μl Zellsuspension und 25 μl Ligationsansatz eingesetzt. Der Hitzeschock wurde für 1 min durchgeführt und danach für 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurden 900 μl LB-Medium zugegeben. Nach entsprechender Inkubation wurden hiervon 100 μl direkt ausplattiert und die restlichen 900 μl zur Sedimentation der Zellen für 1 min zentrifugiert. Diese wurden dann in 100 μl LB-Medium aufgenommen und anschließend ebenfalls ausplattiert. Auf diese Weise konnte man den gesamten Ansatz auf zwei Agarplatten mit Ampicillin ausplattieren. Bei der Transformation von pet14b mit inserierten *tfe* Gen in *E. coli* JM109 Zellen wurden gleichermaßen verfahren. Einige gewachsene Einzelkolonien wurden auf eine neue Agarplatte mit Ampicillin überimpft und von dieser Platte dann 5 ml LB-Medium mit Ampicillin mit Einzelkolonien beimpft. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden das Plasmid mit dem „High Pure Plasmid Isolation Kit“ (Roche, Mannheim) für *tfb* und dem „E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit“ (Peqlab, Erlangen) für *tfe* nach Anleitung der Hersteller isoliert und anschließend sequenziert. Die Transformation in *E. coli* BL21-CodonPlus™ (DE3)-RIL Zellen (Stratagene, La Jolla, USA) zur Expression des Proteins erfolgte nach Anleitung des Herstellers mit folgenden Abweichungen: Es wurde 100 μl Zellsuspension eingesetzt und ca. 100 ng Plasmid-DNA. Der Hitzeschock wurde für 45 sec durchgeführt und LB-Medium statt SOC-Medium verwendet. Die Ausplattierung erfolgte wie für INVαF' und JM109 Zellen beschrieben. Das *thp* Gen von *Methanosarcina mazei* lag schon kloniert vor und war wie im Ergebnisteil kurz geschildert kloniert worden (NAJI, 2000).

2.3 Expression und Reinigung von *Methanosarcina mazei* TFB, TFE und TBP

Zur Expression der Proteine wurden *E. coli* BL21-CodonPlus™ (DE3)-RIL Zellen (Stratagene, La Jolla, USA) mit dem Expressionsvektor pet14b, welcher das entsprechende Gen enthielt, verwendet. Von einer LB-Agarplatte mit Ampicillin und Chloramphenicol wurde eine Einzelkolonie in ein Röhrchen mit 5 ml LB-Medium und diesen beiden Antibiotika überimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert und am nächsten Tag 400 ml Erlenmeyerkolben mit LB-Medium, Ampicillin und Chloramphenicol mit je 1 ml der Übernachtskultur angeimpft. Nachdem deutliches Wachstum der Kultur nach Inkubation bei 37 °C sichtbar war wurde die optische Dicht der Kultur im Photometer (Beckmann DU 64, Spectrophotometer) bei einer Wellenlänge von $\lambda=600$ nm gemessen. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 erfolgte die Induktion mit IPTG (Menge siehe Ergebnisteil). Nach weiterer Inkubation zur Expression des Proteins (Zeit und Temperatur siehe Ergebnisteil) erfolgte die Ernte der Zellen durch 10minütige Zentrifugation bei 6000 rpm (Beckmann Zentrifuge, Rotor GS3, 4 °C).

Der Zellaufschluss erfolgte mit einer French-Press-Zelle (French Pressure Cell, American Instruments Company, Maryland, USA). Die sedimentierten Zellen wurden auf Eis in 10 ml Zellaufschluss- und Bindepuffer für die Ni-NTA-Säule aufgenommen und durch die während der French-Press-Zell-Behandlung auftretenden Scherkräfte aufgeschlossen. Die gewonnene Suspension wurde daraufhin sofort für 1 h bei 4 °C und 40000 rpm in der Ultrazentrifuge (Beckmann L-60 ZU, 70Ti-Rotor) zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand (S100) mit den löslichen Zellproteinen wurde auf Eis gelagert und umgehend säulenchromatographisch gereinigt.

Die chromatographische Aufreinigung des Zielproteins erfolgte mit einer FPLC-Anlage (LKB, Freiburg) in einer Kühlkammer bei 10 °C. Die FPLC-Anlage enthält folgende Komponenten: Liquid Chromatography Controller LCC-501 Plus, Gradientenmischer, photometrische Durchflusszelle zur Messung des Proteingehalts bei 280 nm, Leitfähigkeitsmesser, zwei Pumpen LKB p-500, Multifunktionsventile (MV-7 und MV-8), Fraktionskollektor LKB FRAC 200, peristaltische Pumpe und diverse Säulen. Die Steuerung der Anlage erfolgte über den Controller, der über einen PC mit dem Programm FPLCdirector™ Vers. 1.03 (OS/2) von Pharmacia programmiert wurde.

Da die zu reinigenden rekombinanten Proteine aufgrund der Verwendung des Expressionsvektors pet14b einen His₆-Tag als Fusionsanteil besaßen erfolgte die Reinigung durch Affinitätschromatographie mittels einer Ni-NTA-Säule (Qiagen, Hilden). Mit einer Flussrate von 0,5 ml pro min wurde die Probe aufgetragen. Zuvor war die Ni-NTA-Säule mit Zellaufschluss- und Bindepuffer gespült worden. Nach dem Auftrag wurde die Säule mit Zellaufschluss- und Bindepuffer solange gespült bis keine Elution von nicht spezifisch gebundenen Protein mehr zu detektieren war. Die Elution des spezifisch gebundenen Proteins erfolgte mit einer linear gesteigerten Imidazolkonzentration von 10 mM bis 500 mM. Das eluierte Protein wurde durch den Fraktionskollektor in 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Eine anschließende Reinigung durch Gelfiltration mit einer Superdex-Säule (Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden) erfolgte nach Angaben des Herstellers. Es wurde 2 ml Proteinlösung der Ni-NTA-Säulen Fraktionen aufgetragen. Die Gelfiltration wurde mit einer konstanten Flussrate von 0,3 ml/min durchgeführt und 2 ml Fraktionen durch den Fraktionskollektor gesammelt. Die Konzentration des gereinigten Proteins wurde nach BRADFORD (1976) kolorimetrisch bestimmt. Die Eichkurve wurde mit BSA erstellt. Die Messungen erfolgten in einem Photometer (Beckmann DU 64, Spectrophotometer) bei einer Wellenlänge von 595 nm.

Die Expression und Reinigung von *Methanosarcina mazei* TBP erfolgte wie von NAJI (2000) beschrieben.

2.4 Sequenzanalyse, Datenbankrecherche, Sequenzvergleiche und Erstellung der phylogenetischen Stammbäume

Es wurden die verschiedenen Programme des Programmpakets HUSAR 5.0 (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) verwendet, welches auf dem GCG Programmpaket (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USA) basiert. Zur Erstellung der phylogenetischen Stammbäume wurden die verschiedenen Datenbanken durchsucht und die erhaltenen Sequenzen folgender Organismen verwendet (in Klammern sind die Accession Numbers angegeben):

TBP

Methanosarcina mazei (aj243798), *Methanococcus thermolithotrophicus* (aj271331), *Methanobacterium thermoautotrophicum* (o27664), *Methanococcus jannaschii* (q57930), *Pyrococcus furiosus* (q57050), *Pyrococcus kodakaraensis* (q52366), *Pyrococcus horikoshii* (o58737), *Archaeoglobus fulgidus* (o29874), *Aeropyrum pernix* (q9yat1), *Sulfolobus shibatae* (q55031), *Sulfolobus acidocaldarius* (q53648), *Halobacterium salinarum* (q48325), *Drosophila melanogaster* (p20227), *Caenorhabditis elegans* (p32085), *Homo sapiens* (p20226), *Saccharomyces cerevisiae* (p13393), *Arabidopsis thaliana* (p28147), *Glycine max* (q42808), *Acanthamoeba castellanii* (p26354), *Tetrahymena thermophila* (q27850), *Pneumocystis carinii* (q12652), *Plasmodium falciparum* (p32086), *Dictyostelium discoideum* (p26355), *Acetabularia cliftonii* (p46272)

TFB/TFIIB

Methanosarcina mazei (aj243755), *Methanococcus thermolithotrophicus* (aj271467), *Archaeoglobus fulgidus* (o28970), *Methanobacterium thermoautotrophicum* (o26971), *Pyrococcus furiosus* (q51731), *Methanococcus jannaschii* (q58192), *Aeropyrum pernix* (q9y942), *Sulfolobus shibatae* (p50387), *Halobacterium volcanii* (q9yga5), *Pyrococcus horikoshii* (o59151), *Drosophila melanogaster* (p29052), *Homo sapiens* (q00403), *Xenopus laevis* (p29054), *Saccharomyces cerevisiae* (p29055), *Arabidopsis thaliana* (p48512), *Caenorhabditis elegans* (q20429), *Glycine max* (t06440)

Mit dem Programm CLUSTAL wurde ein „Alignment“ der vollständigen TBP Sequenzen erstellt und ein zweites „Alignment“ ohne die variable N-terminale Region der eukaryellen Moleküle durchgeführt, da die archaeellen Proteine diesen Bereich nicht enthalten. Für das „Alignment“ der TFB/TFIIB Sequenzen wurden von *Caenorhabditis elegans* nur die ersten 300 Aminosäuren verwendet, da dieses Molekül einen großen C-terminalen Bereich enthält, der bei keinem anderen Homolog vorkommt. Die Sequenz des Inteins in der TFB Sequenz von *Methanococcus jannaschii* wurde ebenfalls nicht verwendet. Diese Dateien wurden dann zur Berechnung der „Distance Matrices“ mit dem Programm EPRODIST verwendet, und das Ergebnis dieser Berechnung diente wiederum zur Konstruktion der phylogenetischen Stammbäume mit dem Programm EFITCH. Die Darstellung der phylogenetischen Stammbäume erfolgte mit dem Programm TREEVIEW.

2.5 *In vitro* Transkription im *Methanococcus thermolithotrophicus* System zum Nachweis der funktionellen Aktivität der rekombinanten *Methanosarcina mazei* Transkriptionsfaktoren TBP und TFB

Die *in vitro* Transkription wurde im zellfreien *Methanococcus thermolithotrophicus* Transkriptionssystem (FREY et al., 1990; HAUSNER & THOMM, 1993) durchgeführt. Als Matrize diente linearisiertes Plasmid pIC31/2, welches die Region von Position – 58 bis + 131 des tRNA^{Val} Gens von *Methanococcus vannielii* enthält (HAUSNER et al., 1991). Die Plasmid-DNA war durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation gereinigt worden. Das Plasmid wurde mit der Restriktionsendonuklease *SfuI* hydrolisiert, was zu einem 89 nt „run-off“ Transkript führt. Anschließend wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion zur Entfernung der Restriktionsendonuklease durchgeführt und die DNA durch Ethanol-fällung konzentriert.

Ein 25 µl Transkriptionsansatz enthielt 250 ng linearisierte Plasmid-DNA, 500 ng gereinigte RNA-Polymerase von *Methanococcus thermolithotrophicus*, 20 µM ATP/CTP/GTP, 2 µM UTP und 1,5 µCi [α -³²P]UTP (3000Ci/mmol) in Transkriptionspuffer (20 mM Tris/HCl pH 8,5, 2 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 3 mM DTT, 40 mM KCl). Die rekombinanten Transkriptionsfaktoren TBP (99 ng) und TFB (75 ng) von *Methanococcus thermolithotrophicus* bzw. TBP (97 ng) und TFB (45 ng) von *Methanosarcina mazei* waren, wie in der Abb. 11 angegeben, enthalten. Die Ansätze wurden ohne Ribonukleosidtriphosphate für 1 h bei Raumtemperatur vorinkubiert und nach Komplettierung für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Auftragspuffer für PA-Harnstoffgele gestoppt und die Ansätze für 3 min bei 85°C inkubiert.

Die Analyse der Transkripte erfolgte durch Auftrennung in einem 15%igen PA-Harnstoffgel. Das Gel hatte eine Größe von 13 cm x 16 cm und eine Dicke von 1 mm. 25 ml der PA-Harnstoff-Gellösung wurden mit 12 µl TEMED und 300 µl APS (10%) versetzt und zwischen die gesäuberten Glasplatten gegossen. Das Gel polymerisierte mindestens 1,5 h, bevor es in die Gelanlage eingebaut wurde. Als Laufpuffer diente 1 x TBE. Nachdem die Taschen gespült waren wurden die Proben aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 15 min bei 15 mA und anschließend bei 25 mA. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das in Frischhaltefolie eingewickelte Gel in eine Filmkassette gelegt und ein Röntgenfilm (Kodak X-OMAT AR, 13 x 18) aufgelegt. Der Film wurde bei –70 °C exponiert und dann entwickelt. Die Behandlung der Ansätze nach der Reaktion und die RNA-Gelelektrophorese wurde bei allen folgenden *in vitro* Transkriptionsexperimenten analog durchgeführt.

2.6 Reinigung der RNA-Polymerasen von *Methanosarcina mazei* und *Methanococcus thermolithotrophicus*

Die RNA-Polymerase von *Methanosarcina mazei* Goel wurde wie von NAJI (2000) beschrieben gereinigt. Es wurde jedoch nur bis zur MonoQ-Säule gereinigt. Die abschließende Gelfiltration wurde nicht durchgeführt.

Die Reinigung der RNA-Polymerase von *Methanococcus thermolithotrophicus* erfolgte wie von FREY et al. (1990) und HAUSNER & THOMM (1993) beschrieben.

2.7 Konstruktion der Plasmid-Matrizen

Der Promotor und der Anfang der Gene *grpE*, *dnaK* und *dnaJ* von *Methanosarcina mazei* wurde in den Vektor pUC19 kloniert um als Matrize für *in vitro* Transkriptionen zu dienen. Zunächst wurde der jeweilige DNA-Abschnitt mittels PCR amplifiziert. Dafür wurde die *Pwo* DNA-Polymerase (Peqlab, Erlangen), genomische DNA von *Methanosarcina mazei* S-6 und die Oligonukleotide *grpe-f* und *grpe-r*, *dnak-fl* und *dnak-r*, *dnak-f2* und *dnak-r* bzw. *dnaj-f* und *dnaj-r* verwendet. Die Sequenzen der Oligonukleotide und die jeweilige Annealingtemperatur werden in Tab. 2 gezeigt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden über ein präparatives Agarosegel mit dem „DNA Extraction Kit“ (MBI Fermentas, Wilna, Litauen) gereinigt und anschließend mit T4 DNA-Ligase in den mit der Restriktionsendonuklease *SmaI* hydrolisierten Vektor pUC19 ligiert. Die Ligationsansätze wurden dann zur Transformation in *E. coli* INV α F' verwendet. Dabei fanden die bei der Klonierung von *tfb* und *tfe* beschriebenen Abweichungen vom Protokoll des Herstellers ebenfalls Anwendung. Einige gewachsene Kolonien wurden dann jeweils mittels „Kolonie-PCR“ mit den Oligonukleotiden M13 FU und M13 RU (Tab 2.) auf Vorhandensein des Inserts überprüft und von positiven Kolonien nach Isolierung des Plasmids mit dem „E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kit“ (Peqlab, Erlangen) dieses sequenziert. Von mutationsfreien Klonen wurde das Plasmid dann im präparativen Maßstab gewonnen und anschließend über CsCl-Dichtegradientenzentrifugation nach SAMBROCK (1989) in leicht modifizierter Form (HETHKE, 1993) gereinigt. Auf diese Weise stand das *grpE* Gen von Position – 173 bis + 129, das *dnaK* Gen von Position – 280 bis + 169 und von Position – 51 bis + 169 sowie das *dnaJ* Gen von Position – 71 bis + 152 jeweils in pUC19 kloniert als Matrize für *in vitro* Transkriptionen zur Verfügung.

2.8 *In vitro* Transkription der Hitzeschockgene *grpE*, *dnaK* und *dnaJ*

Als Matrizen dienten die in der Tab. 4 aufgeführten Plasmide. In der Tab. 4 ist auch angegeben, mit welchen Restriktionsendonukleasen die Plasmide jeweils hydrolisiert wurden und die daraus resultierende Länge des „run-off“ Transkripts. Nach der Linearisierung wurden die Plasmide einer Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-fällung unterzogen. Die *in vitro* Transkription wurde mit den optimierten Bedingungen für die Transkription mit *Methanococcus thermolithotrophicus* RNA-Polymerase und *Methanosarcina mazei* TBP und TFB durchgeführt. Es wurde jeweils 8 μ l der Ansätze auf einem 10%igen PA-Harnstoffgel aufgetrennt.

2.9 Affinitätsreinigung von Proteinen mit immobilisierter DNA

Die benötigte DNA wurde mittels PCR hergestellt. Es wurde das Plasmid pUC19 mit dem inserierten *Methanosarcina mazei* *grpE* Gen von Position – 173 bis + 129 als Matrize verwendet sowie die Oligonukleotide *grpe-f* und *bio-grpe-r*. Für die Kontroll-DNA wurde das Plasmid pUC19 ohne Insert als Matrize sowie die Oligonukleotide pUC19-f und bio-pUC19-r in der PCR eingesetzt. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit dem „High Pure PCR Product Purification Kit“ (Roche, Mannheim) gereinigt. Die mit „bio“ bezeichneten Oligonukleotide sind am 5'-Ende mit Biotin markiert. Dadurch ist eine Kopplung der PCR-Produkte an Streptavidin-Magnetpartikel möglich. Das Prinzip beruht auf einer starken Bindung zwischen Biotin und Streptavidin. Die Kopplung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers der Streptavidin-Magnetpartikel (Roche, Mannheim). Die vor und nach der Kopplung entnommenen Proben der Ansätze wurden auf einem Agarosegel überprüft. Es

sollte noch eine geringe Menge PCR-Produkt nach der Kopplung im Überstand sein, um von einer vollständigen Sättigung der Magnetpartikel ausgehen zu können. Die Magnetpartikel mit der gebundenen DNA wurden abschließend pelletiert und in TE 10:0,1 aufgenommen. Die Lagerung erfolgte dunkel bei 4 °C. Die Bindungsexperimente erfolgten wie im Ergebnisteil beschrieben.

2.10 Primer Extension zur Bestimmung des Startnukleotids der Transkription

Die Bestimmung des Startnukleotids der *in vitro* Transkription des *grpE* Gens von *Methanosarcina mazei* erfolgte durch die Primer Extension Methode (LANE et al., 1985). Dabei wird ein mit [γ - 32 P]ATP radioaktiv markiertes komplementäres Oligonukleotid an die zu analysierende RNA hybridisiert und anschließend mit Reverser-Transkriptase verlängert. Die Verlängerung der cDNA endet am 5'-Ende des vorher *in vitro* erzeugten Transkripts. Durch Vergleich eines Sequenzstandards mit der Länge des synthetisierten Reverse-Transkriptase-Produkts kann das Startnukleotid des Transkripts ermittelt werden, da der Anfang der cDNA durch das gewählte Oligonukleotid bekannt ist.

Zur Bestimmung des Startnukleotids der *in vitro* Transkription des *grpE* Gens von *Methanosarcina mazei* wurde das radioaktiv markierte Oligonukleotid *grpe-r* verwendet. Dieses war komplementär zu den Nukleotiden + 108 bis + 129 des Transkripts. Das *grpE* Transkript wurde durch *in vitro* Transkription ohne Zusatz von radioaktivem [α - 32 P]UTP synthetisiert (ATP, CTP, GTP, UTP; je 0,5 mM). Der Transkriptionsansatz wurde einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen und nach Zugabe von 5×10^5 cpm radioaktiv markiertem Oligonukleotid eine Ethanol-Fällung durchgeführt. Das Präzipitat wurde in 10 μ l 5 x Hybridisierungspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 200 mM KCl, 2,5 mM EDTA) resuspendiert und 3 min bei 85 °C denaturiert. Zur Hybridisierung des Oligonukleotids an die RNA wurde 10 min bei 55 °C inkubiert. Der Ansatz wurde dann für 1 min bei 37 °C inkubiert und anschließend 3,6 μ l des auf 37 °C temperierten Reverse-Transkriptase-Mixes zum Start der Primer Extension Reaktion zugegeben. Der Reverse-Transkriptase-Mix enthielt 1,0 μ l dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; je 2,5 mM), 1,0 μ l Actinomycin D (680 ng/ μ l), 1,2 μ l 10 x AMV Reaktionspuffer (500 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT), 0,2 μ l AMV-Reverse-Transkriptase (5 U/ μ l) und 0,2 μ l Milli-Q H₂O. Actinomycin D interkaliert in doppelsträngige Nukleinsäure und bindet außerdem an die große Furche der DNA, damit kann diese nicht mehr als Matrize fungieren. Es bindet aber nicht an einzelsträngige RNA, womit die reverse Transkription nicht behindert wird (SAMBROOK et al., 1989). Das im Ansatz vorhandene Actinomycin D unterdrückt also die Bildung zusätzlicher unerwünschter Produkte bei der Primer Extension Reaktion. Die Inkubation der Primer Extension Reaktion erfolgte für 30 min bei 37 °C. Nach Zugabe von 14 μ l NaAc (0,6 M) und 80 μ l 96%igem Ethanol (-20 °C) wurde die Nukleinsäure gefällt. Nach erneuter Fällung mit 100 μ l 70%igem Ethanol (-20 °C) wurde das Präzipitat in 5 μ l Auftragspuffer für PA-Harnstoffgele resuspendiert und 3 min bei 90 °C denaturiert. Der Ansatz wurde auf einem 6%igen PA-Harnstoff-Sequenzgel zusammen mit dem Sequenzstandard, der mit dem gleichen Oligonukleotid erzeugt wurde, elektrophoretisch aufgetrennt.

2.11 5'-Markierung von DNA mit radioaktivem [γ - 32 P]ATP

Für die Primer Extension Reaktion und den Sequenzstandard wurde ein am 5'-Ende mit [γ - 32 P]ATP markiertes Oligonukleotid benötigt. Ein Markierungsansatz enthielt 2,0 μ l Oligonukleotid (10 pmol/ μ l), 2,0 μ l 10 x PNK-Reaktionspuffer A, 2,0 μ l T4 Polynukleotid-

Kinase (10 U/ μ l), 35 μ Ci [γ - 32 P]ATP auf ein Volumen von 20,0 μ l aufgefüllt mit Milli-Q H₂O. Die T4 Polynukleotid-Kinase katalysiert den Transfer des γ -Phosphats von [γ - 32 P]ATP auf die 5'-OH-Gruppe des Oligonukleotids. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37 °C und anschließend für 3 min bei 95 °C inkubiert. Zur Reinigung der Oligonukleotide von den restlichen Bestandteilen des Markierungsansatzes wurde das „Qiaquick Nucleotide Removal Kit“ (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Reinigung wurde nach Anleitung des vom Hersteller mitgelieferten Protokolls durchgeführt. Die Aufnahme der Probe erfolgte in 50 μ l H₂O. Ein Aliquot von 1 μ l der Probe wurde im Szintillationszähler (WinSpectral™ 1414 Liquid Scintillation Counter, Perkin Elmer Wallac GmbH) zur Bestimmung der inkorporierten Radioaktivität gemessen. Die Markierung der PCR-Produkte (jeweils 500 ng) für die Gel-Retardationsexperimente erfolgte analog zu der hier beschriebenen Prozedur.

2.12 Sequenzier-Reaktionen zur Erstellung eines Sequenzstandards

Zur Bestimmung des Startnukleotids der Transkription wurde ein Sequenzstandard benötigt. Dieser ermöglicht die Ermittlung der Länge der cDNA und damit die Bestimmung des Startnukleotids. Die Sequenzier-Reaktionen wurden mit dem „CycleReader™ DNA Sequencing Kit“ (MBI Fermentas, Wilna, Litauen) nach Anleitung des vom Hersteller mitgelieferten Protokolls durchgeführt. Das Prinzip dieser Sequenzierung beruht auf der Methode der Cycle-Sequenzierung (INNIS et al., 1988; MURRAY, 1989). Die Kettenabbrüche erfolgen wie bei der Sequenzierung nach SANGER et al. (1977) durch den Einbau von Didesoxynukleotiden, die in einem bestimmten Verhältnis neben Desoxynukleotiden in den Ansätzen vorliegen. Analog zur PCR-Technik werden zyklische Wiederholungen von DNA-Denaturierung, Oligonukleotidhybridisierung und Elongationsphase mit der eigentlichen Sequenzier-Reaktion durchgeführt. Es sind nur geringe Mengen Matrize pro Reaktionsansatz erforderlich, weil ein DNA-Molekül bei jedem Zyklus wieder als Matrize fungieren kann.

Die Sequenzier-Reaktions-Mischung (Master-Mix) enthielt 2,0 μ l mit [γ - 32 P]ATP radioaktiv markierte Sequenzieroligonukleotide (2,8 x 10⁵ cpm/ μ l), 5,0 μ l 10 x Sequenzierpuffer, 1,5 μ l Reader™ Taq-DNA-Polymerase (2 U/ μ l), 13,4 μ l Plasmid-DNA (pUC19 mit *grpE* Insert; 37,2 ng/ μ l) auf ein Volumen von 37,5 μ l aufgefüllt mit Milli-Q H₂O. Als Sequenzieroligonukleotid diente das auch für die Primer Extension Reaktion verwendete Oligonukleotid *grpe-r*. Zu den vorgelegten je 2,5 μ l der vier verschiedenen Terminations-Mixe wurden jeweils 7,5 μ l des Master-Mixes gegeben. Die vier verschiedenen Terminations-Mixe enthalten jeweils ein anderes der vier verschiedenen ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Die Sequenzier-Reaktionen wurden im GenAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Cetus, Norwalk, USA) durchgeführt. Durch Zugabe von je 5,0 μ l Auftragspuffer für PA-Harnstoffgele wurde die Reaktion gestoppt. Die Analyse von je 2,0 μ l der 3 min bei 95 °C denaturierten Sequenzier-Reaktionen erfolgte zusammen mit den Primer Extension Reaktionen auf einem 6%igen PA-Harnstoff-Sequenzgel.

2.13 *In vitro* Transkription mit TFE

Als Matrize diente linearisiertes Plasmid pUC19, in welches das *Methanosarcina mazei grpE* Gen von Position – 173 bis + 129 inseriert worden war. Die Plasmid-DNA war durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation gereinigt. Das Plasmid wurde mit der Restriktionsendonuklease *HincII* hydrolysiert und anschließend einer Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung unterzogen. Es wird ein „run-off“ Transkript von 146 nt

erwartet. Die *in vitro* Transkription wurde mit den optimierten Bedingungen für *Methanococcus thermolithotrophicus* RNA-Polymerase und *Methanosarcina mazei* TBP und TFB durchgeführt. Die eingesetzten TFE Mengen werden im Ergebnisteil erwähnt, ebenso die abweichenden TBP Mengen bei dem Versuch mit suboptimalen Mengen dieses Proteins. Es wurde jeweils 8 µl auf ein 10%iges PA-Harnstoffgel aufgetragen.

2.14 Test auf RNase Aktivität der AmtR Charge und Gel-Retardation von RNA

Die gemachten Angaben beziehen sich auf den Versuch III.12.1. Als Matrize für die *in vitro* Transkription diente linearisiertes Plasmid pUC19, in welches das *grpE* Gen von *Methanosarcina mazei* von Position – 173 bis + 129 inseriert worden war. Die Plasmid-DNA war durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation gereinigt. Das Plasmid wurde mit der Restriktionsendonuklease *HincII*, für die nur eine Schnittstelle vorhanden ist, hinter dem Insert geschnitten, was zu einem 146 nt run-off Transkript führt. Das linearisierte Plasmid wurde anschließend einer Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung unterzogen.

Der 175 µl *in vitro* Transkriptionsansatz enthielt 16,0 ng/µl gereinigte DNA-abhängige RNA-Polymerase aus *Methanococcus thermolithotrophicus*, 5,0 ng/µl rekombinantes *Methanosarcina mazei* TBP, 3,4 ng/µl rekombinantes *Methanosarcina mazei* TFB und 6,0 ng/µl Plasmid-DNA in Transkriptionspuffer (20 mM Tris/HCl pH 9.0, 4 mM MgCl₂, 80 mM KCl, 6 mM DTT, 0,2 mM EDTA). Zum Start der Reaktion wurde der Ansatz mit 20 µM ATP/CTP/GTP, 1 µM UTP und 10,5 µCi [α -³²P]UTP (3000 Ci/mmol) komplettiert und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Mengen entsprechen einem 7-fachen Standard 25 µl Ansatz. Es wurden also die optimierten Bedingungen für *Methanococcus thermolithotrophicus* RNA-Polymerase und *Methanosarcina mazei* TBP und TFB verwendet.

Von dem Transkriptionsansatz wurde nach der Reaktion ein Aliquot abgenommen. Der Rest des Transkriptionsansatzes wurde einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen um die vorhandenen Proteine zu entfernen. Dies verhindert eine erneute Bildung von Transkripten bei der nachfolgenden Inkubation mit AmtR. Anschließend wurde der Ansatz einer Ethanol-Fällung unterzogen und das Präzipitat wieder im Ausgangsvolumen Transkriptionspuffer aufgenommen. Hiervon wurde ebenfalls ein Aliquot abgenommen.

Von dem restlichen Ansatz wurden zwei Aliquots mit je 50 µl gebildet. Zu einem Aliquot wurden 2,0 µl rekombinantes AmtR (9,8 mg/ml), entspricht 377 ng/µl im Ansatz, und zum anderen Aliquot 2,0 µl 20 mM Tris/HCl pH 8.0, der Puffer in dem AmtR vorliegt, gegeben. Diese beiden Ansätze wurden dann für 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden beide Ansätze geteilt. Jeweils eine Hälfte der geteilten Ansätze wurde direkt für den Auftrag verwendet. Mit der jeweils anderen Hälfte der geteilten Ansätze wurde vor dem Auftrag eine Phenolextraktion durchgeführt.

Alle Ansätze und abgenommenen Aliquots enthielten das gleiche Volumen (25µl) bzw. vor den Teilungen ein Vielfaches davon. Die abgenommenen Aliquots wurden bis zum Auftrag auf Eis gelagert. Alle Ansätze wurden vor dem Auftrag auf das Gel mit Auftragspuffer für PA-Harnstoffgele versetzt und 3 min bei 85 °C inkubiert. Es wurde dann jeweils 8 µl auf einem 10%igen PA-Harnstoffgel elektrophoretisch aufgetrennt.

2.15 *In vitro* Transkription mit AmtR

Die gemachten Angaben beziehen sich auf den Versuch III.12.2. Als Matrize für die *in vitro* Transkription diente zum einen linearisiertes Plasmid pIC31/2, welches den Promotor und das tRNA^{Val} Gen von *Methanococcus vannielii* trägt. Das Plasmid wurde mit der Restriktionsendonuklease *SfuI*, für die nur eine Schnittstelle vorhanden war, im Bereich des tRNA^{Val} Gens geschnitten, was zu einem run-off Transkript von 89 nt führt. Als Matrize für die *in vitro* Transkription des *grpE* Gens von *Methanosarcina mazei* diente linearisiertes Plasmid pUC19, in welches der Promotor und der Anfang des *grpE* Gens inseriert worden war. Eine Restriktionshydrolyse mit der Restriktionsendonuklease *HincII*, für die nur eine Schnittstelle hinter dem Insert vorhanden ist, führt zu einem „run-off“ Transkript von 146 nt. Beide Plasmide waren vor der Linearisierung durch eine CsCl-Dichtegradientenzentrifugation gereinigt worden. Nach der Linearisierung erfolgte jeweils eine Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung. Für die *in vitro* Transkription des *glnK* Gens von *Methanosarcina mazei* diente ein PCR-Produkt als Matrize. Das PCR-Produkt wurde mit den Oligonukleotiden amtRbindF und T3 (komplementär zur Vektorsequenz) sowie dem Plasmid pRS216 als Matrize erstellt. Das Plasmid pRS216 ist ein pBluescript SK Plasmid (Stratagene, La Jolla, USA) mit einem 625 bp langen Insert, welches in die *EcoRV* Schnittstelle eingefügt wurde. Das Insert enthält die ersten 55 bp des *glnK* Gens von *Methanosarcina mazei* und 570 bp des Bereichs stromaufwärts des Gens. Eine *in vitro* Transkription mit diesem PCR-Produkt ergibt ein Transkript von 149 nt (55 nt Insert + 94 nt Vektor). Zur Reinigung des PCR-Produkts wurde der Reaktionsansatz auf ein Agarosegel aufgetragen und das PCR-Produkt aus dem Gel eluiert. Da das PCR-Produkt kürzer als die als Matrize benutzten Plasmide ist wurde weniger in den *in vitro* Transkriptionsansätzen eingesetzt. Es erfolgte eine Umrechnung, so dass jeweils die gleiche Anzahl Moleküle, und damit Promotoren, eingesetzt wurden.

Für die *in vitro* Transkription wurden die optimierten Bedingungen für *Methanococcus thermolithotrophicus* RNA-Polymerase und *Methanosarcina mazei* TBP und TFB verwendet. Die jeweils 25 µl großen *in vitro* Transkriptionsansätze enthielten also 400 ng gereinigter DNA-abhängiger RNA-Polymerase aus *Methanococcus thermolithotrophicus*, 125 ng rekombinantes *Methanosarcina mazei* TBP, 85 ng rekombinantes *Methanosarcina mazei* TFB und 150 ng Plasmid-DNA (pIC31/2 mit tRNA^{Val} und pUC19 mit *grpE*) bzw. 36 ng PCR-Produkt (*glnK*) in Transkriptionspuffer (20 mM Tris/HCl pH 9.0, 4 mM MgCl₂, 80 mM KCl, 6 mM DTT, 0,2 mM EDTA). Außerdem war 0 ng, 1500 ng, 3000 ng oder 4500 ng rekombinantes *Methanosarcina mazei* AmtR im Ansatz vorhanden und in den anderen Ansätzen jeweils ein Pufferausgleich vorgenommen worden. Das molare Verhältnis von DNA zu AmtR beträgt bei 1500 ng AmtR 1:883, bei 3000 ng AmtR 1:1766 und bei 4500 ng AmtR 1:2649. AmtR wurde mit der jeweiligen DNA vor der Zugabe der Proteine des Transkriptionsapparates 5 min bei Raumtemperatur vorinkubiert, damit AmtR an die DNA binden kann, falls es als Repressor durch DNA-Bindung fungiert. Zum Start der Reaktion wurden die Ansätze mit 20 µM ATP/CTP/GTP, 1 µM UTP und 1,5 µCi [α -³²P]UTP (3000 Ci/mmol) komplettiert. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C für 30 min. Anschließend wurden die Ansätze einer Phenolextraktion unterzogen, um die Proteine zu entfernen. Dann wurde jeweils Auftragspuffer für PA-Harnstoffgele hinzugefügt und für 3 min bei 85 °C inkubiert. Es wurde jeweils 8 µl auf einem 10%igen PA-Harnstoffgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auswertung des Experiments erfolgte durch Autoradiographie und mit Hilfe eines PhosphorImagers (FLA-5000, Fujifilm) sowie dazugehöriger Software (Aida Image Analyzer, Raytest). Die Werte der relativen Transkriptionsaktivität stellen die Mittelwerte aus den Daten zweier unabhängiger Experimente dar.

2.16 *In vitro* Transkription des *glnK* Gens mit AmtR nach verschiedenen Vorinkubationen

Die gemachten Angaben beziehen sich auf den Versuch III.12.3. Als Matrize diente das zuvor (II.2.15) beschriebene *glnK* PCR-Produkt. Für die *in vitro* Transkription wurden die optimierten Bedingungen für *Methanococcus thermolithotrophicus* RNA-Polymerase und *Methanosarcina mazei* TBP und TFB verwendet, die zuvor (II.2.15) noch einmal detailliert aufgeführt wurden.

Es wurden verschiedene Vorinkubationen durchgeführt, um zu beobachten, ob die Reihenfolge der Zugabe der einzelnen Komponenten einen Effekt auf die relative Transkriptionsaktivität in Abhängigkeit von der AmtR Zugabe hat. Zunächst wurde in alle Reaktionsgefäße DNA und Transkriptionspuffer gegeben. In die Ansätze von Spur 9 – 12 wurde auch TBP und TFB gegeben. Dann wurden alle Ansätze für 10 min bei 37 °C inkubiert, auch die Ansätze, die bisher nur DNA und Transkriptionspuffer enthielten. Daraufhin wurde zu den Ansätzen von Spur 1 – 4 die jeweilige Menge AmtR und zu den Ansätzen von Spur 5 – 8 TBP, TFB und RNA-Polymerase gegeben. Dies wurde durchgeführt, um zu beobachten, ob eine Vorinkubation mit AmtR den Hemmeffekt verstärkt bzw. eine Vorinkubation mit TBP, TFB und RNA-Polymerase den Hemmeffekt verringert. Zu den Ansätzen von Spur 9 – 12, die schon TBP und TFB enthielten wurde die jeweilige Menge AmtR hinzugefügt. Dies wurde durchgeführt, um zu untersuchen, ob AmtR die Anlagerung der RNA-Polymerase, und damit die vollständige Ausbildung des Präinitiationskomplexes, verhindert. Es folgte eine weitere Inkubation für 10 min bei 37 °C mit allen Ansätzen. Dann wurden die Ansätze mit den jeweiligen bisher noch nicht zugefügten Proteinen ergänzt.

Zum Start der Reaktion wurden die Ansätze mit 20 µM ATP/CTP/GTP, 1 µM UTP und 1,5 µCi [α -³²P]UTP (3000 Ci/mmol) komplettiert. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C für 30 min. Anschließend wurden die Ansätze einer Phenolextraktion unterzogen, um die Proteine zu entfernen. Dann wurde jeweils Auftragspuffer für PA-Harnstoffgele hinzugefügt und für 3 min bei 85 °C inkubiert. Es wurde jeweils 8 µl auf einem 10%igen PA-Harnstoffgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auswertung des Experiments erfolgte durch Autoradiographie und mit Hilfe eines PhosphorImagers (FLA-5000, Fujifilm) sowie dazugehöriger Software (Aida Image Analyzer, Raytest).

2.17 Gel-Retardation mit unterschiedlichen AmtR Mengen

Die gemachten Angaben beziehen sich auf den Versuch III.12.4. Es wurde ein 623 bp langes PCR-Produkt hergestellt, das die Region von Position – 570 bis + 53 des *glnK* Gens von *Methanosarcina mazei* enthält. Für die PCR-Reaktion wurden die Oligonukleotide amtRbindF und amtRbindR (Tab. 2) sowie das Plasmid pRS216 als Matrize eingesetzt. Zur Reinigung des PCR-Produkts wurde der Reaktionsansatz auf ein Agarosegel aufgetragen und das PCR-Produkt aus dem Gel eluiert, anschließend erfolgte eine Ethanol-Fällung. Die DNA wurde dann mit T4 Polynukleotid-Kinase an den 5'-Enden mit [γ -³²P]ATP radioaktiv markiert und mit dem „Qiaquick Nucleotide Removal Kit“ (Qiagen, Hilden) die restlichen Bestandteile des Markierungsansatzes wieder von der DNA getrennt. Eine detaillierte Beschreibung der radioaktiven Markierung des PCR-Produkts wird unter II.2.11 gegeben.

Ein 20 µl Bindungsansatz enthielt:

- 1 µl markierte DNA (ca. 1 - 10 ng/µl; ca. 80 ips (Impulse pro Sekunde))
- 1 µg poly [d (I-C)] DNA
- 6 µg BSA
- 5% PEG 8000
- 20 mM Tris/HCl pH 9.0, 4 mM MgCl₂, 80 mM KCl, 6 mM DTT und 0,2 mM EDTA (Transkriptionspuffer)
- 1740 ng rekombinantes *Methanosarcina mazei* TBP und 224 ng rekombinantes *Methanosarcina mazei* TFB wie über den Spuren angegeben
- rekombinantes *Methanosarcina mazei* AmtR in den Mengen wie über den Spuren angegeben
- in den Ansätzen ohne TBP und TFB bzw. bei den verschiedenen AmtR Mengen wurde jeweils ein Pufferausgleich vorgenommen und die Ansätze mit Milli-Q H₂O auf 20 µl aufgefüllt

Die Bindungsansätze wurden 30 min bei 37°C inkubiert und die gesamten Ansätze zügig ohne Auftragspuffer auf ein vorbereitetes 5%iges natives PA-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 15 min bei 10 mA und danach für ca. 2,5 h bei 15 mA mit 1 x TBE als Laufpuffer. Ansonsten wurde wie bei der RNA-Gelelektrophorese vorgegangen. Die Auswertung erfolgte durch Autoradiographie.

2.18 Gel-Retardation mit AmtR nach verschiedenen Vorinkubationen

Die gemachten Angaben beziehen sich auf den Versuch III.12.5. Die Versuchsdurchführung erfolgte analog zu dem zuvor (II.2.17) beschriebenen Gel-Retardationsexperiment bis auf folgende Abweichungen:

Es wurde 2000 ng rekombinantes *Methanosarcina mazei* AmtR eingesetzt wie über den Spuren angegeben.

Beim Ansatz von Spur 5 wurde die DNA mit TBP und TFB 15 min bei 37°C vorinkubiert vor der Zugabe von AmtR. Beim Ansatz von Spur 6 wurde die DNA 15 min bei 37°C mit AmtR vorinkubiert vor der Zugabe von TBP und TFB. Bei den Vorinkubationen waren alle sonstigen Komponenten eines Standard-Bindungsansatzes vorhanden. Bei dem Ansatz von Spur 4 erfolgte wie angegeben keine Vorinkubation, sondern TBP, TFB und AmtR wurden gleichzeitig zugegeben.

2.19 Gel-Retardation mit unterschiedlicher DNA und Nachweis eines DNA-TBP-AmtR Komplexes

Die gemachten Angaben beziehen sich auf den Versuch III.12.6. Die Versuchsdurchführung erfolgte bis auf folgende Abweichungen analog zu dem zuerst (II.2.17) beschriebenen Gel-Retardationsexperiment:

Abb. 24A: Das Gel-Retardationsexperiment wurde mit einem 302 bp langen radioaktiv markierten PCR-Produkt durchgeführt, das die Region von Position - 173 bis + 129 des *grpE* Gens von *Methanosarcina mazei* enthält. Für die Reaktion zur Synthese des PCR-Produkts wurden die Oligonukleotide *grpe-f* und *grpe-r* (Tab. 2) sowie das Plasmid pUC19, mit dem inserierten *grpE* Gen, als Matrize eingesetzt.

Abb. 24B: Das Gel-Retardationsexperiment wurde mit einem 191 bp langen radioaktiv markierten PCR-Produkt durchgeführt, das die Region von Position – 138 bis + 53 des *glnK* Gens von *Methanosarcina mazei* enthält. Für die Reaktion zur Synthese des PCR-Produkts wurden die Oligonukleotide amtRbindF1 und amtRbindR (Tab. 2) sowie das Plasmid pRS216als Matrize eingesetzt.

Abb. 24C: Das Gel-Retardationsexperiment wurde mit einem 623 bp langen radioaktiv markierten PCR-Produkt durchgeführt, das die Region von Position – 570 bis + 53 des *glnK* Gens von *Methanosarcina mazei* enthält. Für die Reaktion zur Synthese des PCR-Produkts wurden die Oligonukleotide amtRbindF und amtRbindR (Tab. 2) sowie das Plasmid pRS216als Matrize eingesetzt.

Ein 20 µl Bindungsansatz enthielt abweichend:

- 1 µl markierte DNA (ca. 1 - 10 ng/µl; ca. 200 ips (Impulse pro Sekunde))
- zusätzlich 5 mM MgCl₂, also insgesamt 9 mM MgCl₂
- 1500 ng rekombinantes *Methanosarcina mazei* TBP wie über den Spuren angegeben
- 400 ng gereinigte RNA-Polymerase aus *Methanococcus thermolithotrophicus* wie über den Spuren angegeben
- 400 ng rekombinantes *Methanosarcina mazei* AmtR wie über den Spuren angegeben

Außerdem wurde nur 10 µl, also ein halber Ansatz auf das Gel aufgetragen.

2.20 Native PA-Gelelektrophorese zur Prüfung auf Protein-Protein Interaktion

Die gemachten Angaben beziehen sich auf den Versuch III.12.7. Das native PA-Gel entspricht einem SDS-PA-Gel ohne SDS und wurde nach EHLERS et al. (2002a) hergestellt. Das Sammelgel war 6,7%ig (62,5 mM Tris/HCl pH 7.5) und das Trenngel war 16,7%ig (187,5 mM Tris/HCl pH 8.9). Die Dicke des Gels betrug 1 mm. Der Laufpuffer enthielt 82,6 mM Tris/HCl pH 9.4 und 33 mM Glycin. Es wurden jeweils 4900 ng AmtR und 2500 ng TBP in einem Volumen von 15 µl mit Transkriptionspuffer und 10% Glycerin für 30 min bei 37 °C inkubiert und die gesamte Probe aufgetragen. Die Richtung des Stromflusses beim Gellauf entsprach der bei einem SDS-PA-Gel, d. h. beim Auftrag lag die Kathode und entgegengesetzt die Anode. Der Gellauf wurde für 1,5 h bei 10 mA durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch Coomassie-Blau Färbung.

III Ergebnisse

1 Identifizierung, Sequenzierung, Klonierung, Expression und Reinigung von *Methanosarcina mazei tfb* bzw. TFB

1.1 Identifizierung und Sequenzierung des *tfb* Gens von *Methanosarcina mazei* S-6

Zur Erstellung eines *Methanosarcina mazei in vitro* Transkriptionssystems sollte der Transkriptionsfaktor TFB von *Methanosarcina mazei* rekombinant hergestellt werden. Die Sequenz des *tfb* Gens war zu diesem Zeitpunkt der Arbeit noch nicht bekannt, da die Daten der Sequenzierung des *Methanosarcina mazei* Goe1 Genoms noch nicht verfügbar waren (DEPPENMEIER et al., 2002). Es war deshalb nicht möglich, die Sequenz des *tfb* Gens direkt aus genomischer *Methanosarcina mazei* DNA mittels PCR zu amplifizieren und anschließend zu klonieren. Daher wurde zur Identifizierung des *tfb* Gens eine genomische λ -Genbank von *Methanosarcina mazei* S-6 mit einer Sonde durchsucht. Die λ -Genbank wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Everly Conway de Macario (Albany, New York, USA) zur Verfügung gestellt.

1.2 Herstellung der Sonden-DNA

Zunächst mussten die Oligonukleotide entwickelt werden, die zur Herstellung der Sonden-DNA benötigt werden. Die Sonden-DNA sollte dabei ein möglichst großes Teilstück des *tfb* Gens enthalten. Es wurden Aminosäuresequenzvergleiche mit bereits bekannten Sequenzen archaeeller TFBs durchgeführt, um stark konservierte Bereiche zu ermitteln. Hierfür wurde die Aminosäuresequenz des TFB folgender Organismen verwendet: *Methanococcus thermolithotrophicus*, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus woesei* und *Sulfolobus shibatae*.

Es wurden vier stark konservierte Bereiche der Aminosäuresequenz ausgewählt, die lang genug waren, um nach Übersetzung der Aminosäuresequenz in Nukleinsäuresequenz, unter Berücksichtigung des genetischen Codes, praktikable Oligonukleotide zu liefern. Da die verschiedenen Aminosäuren durch unterschiedlich viele Tripletts kodiert werden, wurde außerdem darauf geachtet, dass die stark konservierten Bereiche möglichst viele Aminosäuren aufweisen, die von möglichst wenig Tripletts kodiert werden. Da diese Oligonukleotide aber immer noch stark degeneriert wären und so eventuell viele Nebenprodukte bei der PCR erzeugen könnten, wurde zusätzlich eine „Codon Usage“ Tabelle für *Methanosarcina mazei* erstellt. Dafür wurde aus den bekannten Sequenzen der fünf Gene *trkA*, *grpE*, *dnaK*, *dnaJ* und *tbp* von *Methanosarcina mazei* für jedes Codon ermittelt, wie häufig es bei diesem Organismus vorkommt (nicht repräsentativ). Diese Ergebnisse wurden bei der Entwicklung der Oligonukleotide berücksichtigt, wodurch einige weniger stark degeneriert waren.

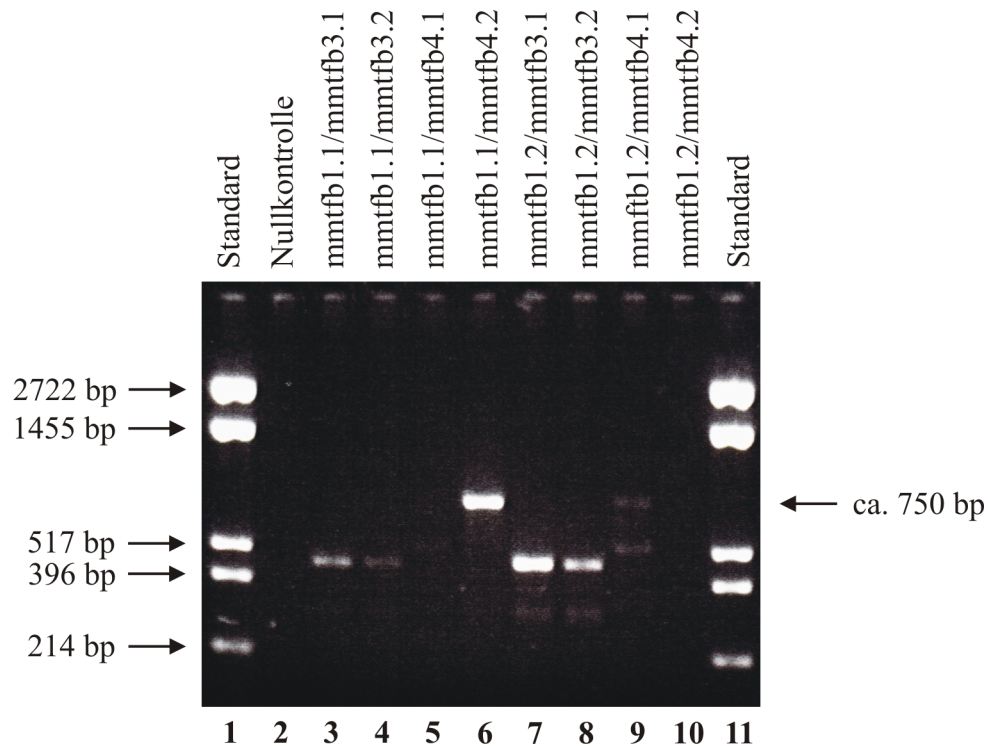


Abb. 2: PCR mit degenerierten Oligonukleotiden und genomischer *Methanosarcina mazei* DNA zur Herstellung von Sonden-DNA

1,5%iges Agarosegel zur Analyse von PCR-Produkten. Die Größe der DNA-Fragmente des Standards (pIC19H hydrolisiert mit *Bam*HI und *Hin*fl) wird durch Pfeile links vom Gel angezeigt. Die Größe des mit den Oligonukleotiden mmtfb1.1 und mmtfb4.2 synthetisierten PCR-Produkts wird rechts vom Gel angezeigt. Über den Spuren sind die verwendeten Oligonukleotide angegeben. Die Nullkontrolle wurde ohne Matrizen-DNA durchgeführt.

Die Abb. 2 zeigt das Ergebnis einer PCR mit degenerierten Oligonukleotiden und genomischer *Methanosarcina mazei* DNA. Unter den gewählten Bedingungen lieferte das Oligonukleotidpaar mmtfb1.1/mmtfb4.2 das beste Ergebnis (Spur 6). Es ergab das längste PCR-Produkt mit ca. 750 bp, und es waren auch keine Nebenprodukte zu beobachten. Ein ca. 750 bp PCR-Produkt wurde mit diesem Oligonukleotidpaar aufgrund der Sequenzvergleiche der verschiedenen TFB erwartet, da angenommen wurde, dass aufgrund der hohen Konservierung des *tfb* Gens auch bei *Methanosarcina mazei* ein Amplifikat ähnlicher Länge erzielt werden kann wie bei anderen archaellen *tfb* Genen. Einige andere Oligonukleotidpaare ergaben zwar auch ein PCR-Produkt erwarteter Länge, aber diese Produkte waren kürzer und z. T. waren auch Nebenprodukte vorhanden. Mit anderen Oligonukleotidpaaren wiederum konnte gar kein PCR-Produkt erzeugt werden.

Daraufhin wurde erneut eine PCR mit genomischer DNA aus *Methanosarcina mazei* und den Oligonukleotiden mmtfb1.1 und mmtfb4.2 durchgeführt. Der PCR-Ansatz wurde auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen und die Bande des ca. 750 bp PCR-Produkts mit der vermutlichen Teilsequenz des *tfb* Gens aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend eluiert. Das isolierte PCR-Produkt diente dann in einer weiteren PCR als Matrize. Hierbei wurden degenerierte Oligonukleotide eingesetzt, die innerhalb des ca. 750 bp PCR-Produkt binden sollten, falls es sich dabei tatsächlich um eine Teilsequenz des *tfb* Gens handelt. Es konnten dabei PCR-Produkte erwarteter Größe erhalten werden, was darauf hindeutet, dass es sich bei dem ca. 750 bp PCR-Produkt tatsächlich um ein Teilstück des *tfb* Gens handelt.

Anschließend wurde das aus dem Agarosegel eluierte ca. 750 bp PCR-Produkt sequenziert. Dabei wurden die degenerierten Oligonukleotide eingesetzt, weshalb die Sequenz schwer zu bestimmen war. Daher wurden für Bereiche, die sicher bestimmt werden konnten, neue Oligonukleotide entwickelt, die nicht degeneriert waren. Bei einer erneuten Sequenzierung des ca. 750 bp PCR-Produkts mit diesen nicht degenerierten Oligonukleotiden konnten 677 bp der Sequenz des PCR-Produkts sicher bestimmt werden. Ein Vergleich der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz mit der Sequenz des TFB von *Methanococcus thermolithotrophicus*, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus woesei* und *Sulfolobus shibatae* ergab eine sehr hohe Übereinstimmung. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem ca. 750 bp PCR-Produkt, das als Sonde dienen sollte, um ein Teilstück des *tfb* Gens von *Methanosarcina mazei* handelt.

1.3 Markierung der Sonden-DNA

Als Sonde sollte das ca. 750 bp PCR-Produkt mit der Teilsequenz des *tfb* Gens von *Methanosarcina mazei* dienen. Zuerst wurde das aus einem präparativen Agarosegel eluierte PCR-Produkt mit den Oligonukleotiden mmtfb1.1 und mmtfb4.2 amplifiziert und das Amplifikat dann wieder über ein Agarosegel gereinigt. Nach der Eluierung aus dem Agarosegel diente dieses ca. 750 bp PCR-Produkt dann als Substrat-DNA für die Markierung mit dem DIG-High Prime System (Roche, Mannheim), wobei eine Markierung mit Digoxigenin erfolgte. Zur Identifizierung des *tfb* Gens konnte somit markierte Sonden-DNA eingesetzt werden, die vollständig homolog zu einem Teilstück des *tfb* Gens von *Methanosarcina mazei* war. Eine Überprüfung der Markierungseffizienz verlief erfolgreich.

1.4 Durchsuchung der λ -Genbank nach positiven Klonen

Die genomische λ -Genbank von *Methanosarcina mazei* S-6 sollte mittels der DIG-markierten Sonde durch Plaquehybridisierung nach Klonen durchsucht werden, die das *tfb* Gen von *Methanosarcina mazei* enthalten. Die λ -Genbank war durch Spaltung genomischer *Methanosarcina mazei* S-6 DNA mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* erstellt worden, und der Titer der λ -Genbank zuvor mit 8×10^7 pfu/ μ l bestimmt worden (THOMSEN, 1998). Als Wirtszellen für die λ -Phagen dienten *E. coli* XL1-Blue MRF' Zellen. Eine definierte Menge Phagensuspension wurde mit Wirtszellen vermischt und nach kurzer Inkubation NZY-Weichagarose zugegeben. Dieses Gemisch wurde dann auf einer NZY-Agarplatte gleichmäßig verteilt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die entstandenen Phagenplaques wurden durch Plaquehybridisierung getestet. Nach dem Transfer der Plaques auf eine Nitrocellulosemembran wurde als Positivkontrolle auf jede Membran an definierter Stelle ein Aliquot des nicht markierten ca. 750 bp PCR-Produkts mit der Teilsequenz des *tfb* Gens gegeben. Danach erfolgte die Hybridisierung mit der Sonde und anschließend die kolorimetrische Detektion gebundener Sonde. Die Abb. 3 zeigt exemplarisch eine Nitrocellulosemembran mit einem durch Plaquehybridisierung positiv auf das *tfb* Gen von *Methanosarcina mazei* getesteten Phagenplaque. Es fanden sich nach Überprüfung von ca. 4800 Phagenplaques auf verschiedenen Platten insgesamt acht Plaques, die ein Signal mit der Sonde zeigten. Die Positivkontrolle gab bei allen Hybridisierungen ein deutliches Signal.

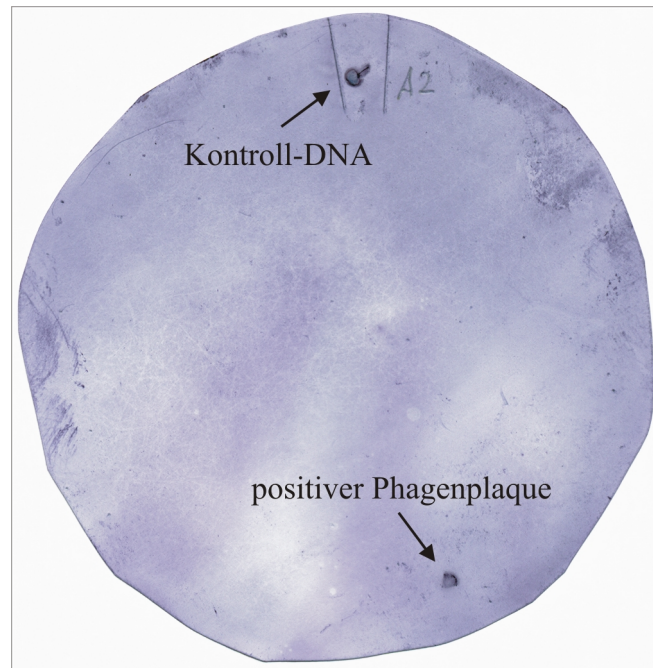


Abb. 3: Plaquehybridisierung mit dem Abdruck einer Phagenplatte auf einer Nitrocellulosemembran

Die auf der Agarplatte entstandenen Phagenplaques wurden auf die Nitrocellulosemembran übertragen. Dann erfolgte die Hybridisierung mit der DIG-markierten Sonden-DNA gegen das *tfb* Gen von *Methanosarcina mazei* und anschließend die kolorimetrische Detektion gebundener Sonde. Ein positiver Phagenplaque und die aufgebrauchte Kontroll-DNA (nicht markierte Sonden-DNA) werden durch Pfeile gekennzeichnet.

Die Plaques, die bei der Hybridisierung ein Signal gaben, wurden ausgestochen und anschließend aus dem Agar eluiert. Die so erhaltenen Phagensuspensionen wurden dann in der PCR mit den nicht degenerierten Oligonukleotiden mmtfb5 und mmtfb8 auf das Vorhandensein des *tfb* Gens von *Methanosarcina mazei* überprüft. Positive Phagen sollten ein PCR-Produkt von 482 bp ergeben. Als Kontrolle für die PCR wurden auch 2 negative Plaques ausgestochen und getestet. Die Abb. 4 zeigt das Ergebnis der PCR. Mit der Kontroll-DNA (ca. 750 bp PCR-Produkt der Sonde) konnte ein 482 bp Produkt synthetisiert werden (Spur 3). Mit der Phagensuspension direkt aus der λ -Genbank konnte ebenfalls ein 482 bp Produkt erzeugt werden (Spur 4). Es konnten also in der λ -Genbank Phagen, die das *tfb* Gen von *Methanosarcina mazei* enthalten durch PCR nachgewiesen werden. Die in der Hybridisierung negativen Plaques ergaben wie erwartet kein Produkt (Spur 13 und 14). Es zeigte sich, dass von den acht bei der Hybridisierung positiv getesteten Plaques nur einer in der PCR positiv war (Spur 6). Die anderen Plaques waren entweder falsch positiv oder nicht korrekt ausgestochen worden. Die positiv getestete Phagensuspension wurde auch noch durch PCR mit weiteren Oligonukleotiden erfolgreich auf das *tfb* Gen überprüft.

Da man bei der großen Anzahl von Plaques nicht mit Sicherheit einzelne Phagenplaques ausstechen konnte, also noch keine reine Phagenkultur vorlag, wurden erneut Wirtsbakterien mit den eluierten Phagen infiziert und auf Platten ausgebracht. Die entstandenen Plaques wurden wieder durch Plaquehybridisierung überprüft und positive Plaques zusätzlich durch PCR getestet. Es hatte eine Anreicherung der positiven Phagen stattgefunden. Die Prozedur zur Anreicherung wurde wiederholt und eine geringere Menge Phagensuspension ausplattiert. Von den erhaltenen deutlich isoliert liegenden Phagenplaques wurden jeweils einige Plaques ausgestochen und in der PCR mit den Oligonukleotiden mmtfb5 und mmtfb8 auf die Anwesenheit des *tfb* Gens von *Methanosarcina mazei* überprüft. Die isolierten positiven

Phagen wurden als Klon angesehen und vor der Präparation des Phagemids durch erneute Infektion von Wirtszellen mit anschließender Ernte der Phagen amplifiziert.

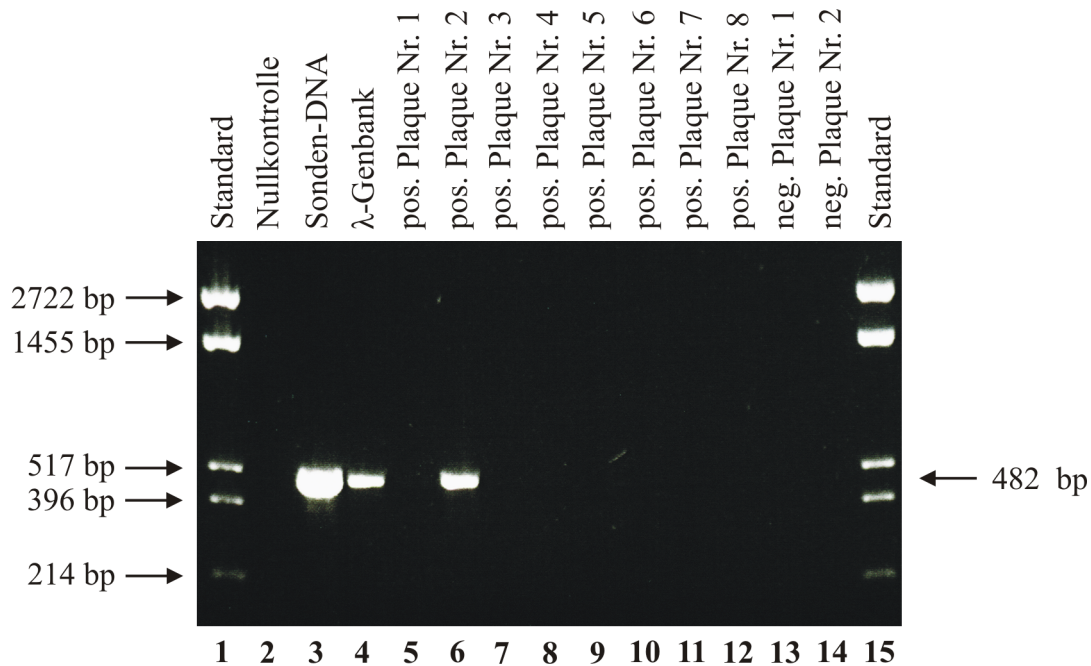


Abb. 4: PCR zur Überprüfung von Phagenplaques auf Vorkommen des *tfb* Gens von *Methanosarcina mazei*

1,5%iges Agarosegel zur Analyse von PCR-Produkten. Die Größe der DNA-Fragmente des Standards (pIC19H hydrolisiert mit *Bam*HI und *Hin*fI) wird durch Pfeile links vom Gel angezeigt. Die Größe des mit den Oligonukleotiden mmtfb5 und mmtfb8 synthetisierten PCR-Produkts wird rechts vom Gel angezeigt. Über den Spuren ist die verwendete Matrizen-DNA angegeben. Die Nullkontrolle wurde ohne Matrizen-DNA durchgeführt.

Der Phagen-Klon war durch PCR bisher nur auf den Besitz eines Teilbereichs des *tfb* Gens von *Methanosarcina mazei* überprüft worden, da die Bindungsstellen der verwendeten Oligonukleotide alle innerhalb der Gensequenz lagen. Um zu ermitteln, ob der Klon das gesamte *tfb* Gen enthält, wurde eine Kartierung durch PCR vorgenommen. Mit den Oligonukleotiden T3 und T7, die im Vektorbereich vor und hinter der Klonierungsstelle für das Insert binden, ließ sich die Größe des Inserts ermitteln. Auf diese Weise wurde die Größe des Inserts mit ca. 2,2 kb bestimmt. Durch die Kombination der T3 und T7 Oligonukleotide mit Oligonukleotiden, die innerhalb der Sequenz des *tfb* Gens binden, ließ sich auch die Lage und Orientierung des gesuchten Gens ermitteln. Die Orientierung des *tfb* Gens ergab sich durch das Auftreten bzw. Fehlen von PCR-Produkten, die Lage konnte anhand der Länge der Amplifikate ermittelt werden. Bei den Oligonukleotiden, die innerhalb der Gensequenz binden, konnte die ungefähre Position ihrer Bindungsstelle in Bezug auf den Anfang und das Ende des Gens durch Sequenzvergleiche von *tfb* Genen verschiedener Archaea mit der schon bekannten Teilsequenz des *tfb* Gens von *Methanosarcina mazei* abgeleitet werden. Bei einer angenommenen Größe von ca. 1 kb für das *tfb* Gen von *Methanosarcina mazei*, worauf aufgrund der Sequenzvergleiche archaeeller *tfb* Gene geschlossen wurde, ergab die Kartierung, dass das Gen vollständig vorhanden sein müsste. Zusätzlich wäre noch ein Bereich von ca. 200 bp stromaufwärts und ein Bereich von ca. 1 kb stromabwärts des *tfb* Gens vorhanden.

1.5 Präparation des Phagemids

Durch Koinfektion mit dem ExAssist™-Helferphagen (M13) war es möglich, das pBluescript SK(-) Phagemid *in vivo* aus dem Genom der λ -Phagen herauszuschneiden. Das pBluescript SK(-) Phagemid hat ohne Insert-DNA eine Größe von 2958 bp und eine Insertionskapazität von 10 kb. Vor dem Herausschneiden ist es Teil des λ ZAP II Vektors (Stratagene, La Jolla, USA), mit dem die λ -Genbank von *Methanosarcina mazei* S-6 erstellt wurde. Die Phagen DNA enthält in der multiplen Klonierungsstelle sechs einmalige Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen. Unter anderem gibt es dort eine *EcoRI* Schnittstelle, über die die Klonierung der *Methanosarcina mazei* S-6 DNA erfolgte. An den Flanken des Phagemids befindet sich im λ ZAP II Vektor einerseits die Initiationsstelle und andererseits die Terminationsstelle des *f1 ori* der Replikation. Proteine des M13 Helferphagen erkennen die Initiationsstelle des λ -Phagen und führen einen Bruch in einen der DNA-Stränge ein. Es erfolgt eine Neusynthese von DNA von der Bruchstelle bis zum Terminationssignal. Das entstandene einzelsträngige DNA-Molekül umfasst die Phagemid-DNA und auch das Insert. Ein weiteres Protein des M13 Phagen zirkularisiert das DNA-Molekül, wobei ein funktionsfähiger *f1 ori* wiederhergestellt wird. Der neu entstandene *f1 ori* gibt die Signale für die Transkription der Gene, welche die Proteine kodieren, die für die Verpackung und Sekretion der filamentösen Phagenpartikel erforderlich sind. Die Vermehrung des ExAssist™-Helferphagen ist durch eine Mutation ausgeschlossen. Aus den isolierten Phagenklonen wurde so das Phagemid mit dem Insert, welches das *tfb* Gen von *Methanosarcina mazei* S-6 enthält, ausgeschnitten. Die Wirtszellen wurden durch Hitze abgetötet. Das erhaltene Phagemid wurde in *E. coli* XLORL Zellen kloniert. In Zellen von *E. coli* XLORL verhält sich das pBluescript SK(-) Phagemid wie ein doppelsträngiges Plasmid und kann deshalb auch durch Plasmidpräparation gewonnen werden. Eine auf dem Phagemid kodierte Ampicillinresistenz ermöglicht eine Selektion auf Zellen, die Phagemid enthalten. Unter sterilen Bedingungen gepickte Kolonien wurden zusätzlich durch PCR auf die Anwesenheit des Phagemids mit dem *tfb* Gen von *Methanosarcina mazei* getestet. Dafür wurden die Oligonukleotide *mmtfb5* und *mmtfb8* eingesetzt. Es konnte dabei bei allen untersuchten Kolonien ein PCR-Produkt der erwarteten Größe von 482 bp synthetisiert werden.

1.6 Sequenzierung des Phagemids

Die Sequenzierung des aus den *E. coli* XLORL Zellen präparierten Phagemids erfolgte nach dem ABI PRISM™ Protokoll mit dem Ready Reaction DyeDeoxy Terminator AmpliTaq® FS Kit (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA). Die Fragmentlängenanalyse erfolgte kapillarelektrophoretisch mit dem ABI PRISM™ 310 Kapillarsystem, und z. T. auch gelelektrophoretisch mit dem ABI PRISM™ 373 Gelsystem. Die Sequenzierung erfolgte von der bereits bestimmten SONDENSEQUENZ aus und mit dem T3 Oligonukleotid vom Vektor aus. Mit Hilfe der bestimmten Sequenz wurden neue Oligonukleotide entwickelt, mit denen dann die vollständige Sequenz des *tfb* Gens von *Methanosarcina mazei* ermittelt werden konnte. Zusätzlich wurde ein Bereich von 240 bp stromaufwärts des Gens bis zur Vektorsequenz und ein Bereich von 292 bp stromabwärts des Gens erfolgreich sequenziert. Das *tfb* Gen von *Methanosarcina mazei* besteht inklusive Stopcodon aus 1014 bp, die für 337 Aminosäuren kodieren. Ein Aminosäuresequenzvergleich mit dem TFB der Archaea *Methanococcus thermolithotrophicus*, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus woesei* und *Sulfolobus shibatae* zeigte eine hohe Homologie des *Methanosarcina mazei* TFB zu diesen. Die Sequenz des *Methanosarcina mazei* S-6 *tfb* Gens ist in der EMBL Nucleotide Sequence Database des

European Bioinformatics Institute (Cambridge, Großbritannien) unter der Accession Number „AJ243755“ hinterlegt worden und wird in der Abb. 9 gezeigt.

1.7 Klonierung des *tfb* Gens von *Methanosarcina mazei* S-6

Aufgrund der ermittelten Sequenz des *tfb* Gens von *Methanosarcina mazei* war es nun möglich, Oligonukleotide zu entwickeln, mit denen das *tfb* Gen selektiv amplifiziert werden kann. Die Klonierungsoligonukleotide mmtfbexp-F und mmtfbexp-R waren so beschaffen, dass zusätzlich zu der zum Anfang bzw. Ende des *tfb* Gens komplementären Sequenz sich in Richtung 5'-Ende jeweils eine Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuklease anschloss und darauf folgend noch einige beliebige Nukleotide vorhanden waren. Die kurze beliebige Sequenz am 5'-Ende der Oligonukleotide war nötig, da Restriktionsendonukleasen einen kurzen doppelsträngigen Bereich beiderseits der Erkennungssequenz benötigen, um effektiv die DNA zu schneiden. Das Vorwärts-Oligonukleotid mmtfbexp-F enthielt eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *NdeI* und das Rückwärts-Oligonukleotid mmtfbexp-R enthielt eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *BamHI*. Aufgrund der gewählten *NdeI*-Schnittstelle konnte das *tfb* Gen später im korrekten Leseraster des Expressionsvektors pet14b (Novagene, Madison, USA) inseriert werden. Bei Verwendung des Expressionsvektors pet14b enthält das exprimierte Zielprotein einen Fusionsanteil, den sogenannten His-Tag. Dieser Fusionsanteil aus sechs Histidin-Resten ermöglicht die Reinigung des Proteins über Affinitätschromatographie mit Ni²⁺-chelatierten Säulen.

Zunächst wurde eine PCR mit dem „Expand™ High Fidelity PCR System“ (Roche, Mannheim) nach Anleitung des Herstellers mit genomischer *Methanosarcina mazei* S-6 DNA und den Klonierungsoligonukleotiden durchgeführt. Dieses PCR System enthält einen Enzym-Mix aus thermostabiler *Taq* DNA-Polymerase und *Pwo* DNA-Polymerase. Aufgrund der Proofreading-Aktivität der *Pwo*-Polymerase kann bei Verwendung dieses Systems eine ca. dreimal geringere Falscheinbaurate als bei alleiniger Verwendung der *Taq*-Polymerase erzielt werden. Damit wird die Mutationsrate bei der PCR gesenkt, und es kann mit erhöhter Wahrscheinlichkeit ein Klon mit korrekter Sequenz des *tfb* Gens erhalten werden. Der Erfolg der PCR wurde auf einem 1,5%igen Agarosegel überprüft und erneut eine PCR mit identischen Bedingungen in größerem Maßstab durchgeführt. Die PCR-Produkte dieser Reaktionsansätze wurden mit dem „High Pure PCR Product Purification Kit“ (Roche, Mannheim) gereinigt und anschließend einer Ethanol-fällung unterzogen. Die gewonnenen PCR-Produkte und der Expressionsvektor pet14b wurden mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *BamHI* hydrolisiert. Das PCR-Produkt enthielt nur die durch die Oligonukleotide hinzugefügten Erkennungssequenzen für diese Restriktionsendonukleasen, innerhalb der Gensequenz war keine Erkennungssequenz vorhanden. Der Expressionsvektor pet14b enthielt ebenfalls für diese Restriktionsendonukleasen nur je eine Erkennungssequenz, und zwar in der multiplen Klonierungsstelle. Danach erfolgte eine Reinigung der PCR-Produkte und des Vektors über ein präparatives Agarosegel. Die Elution der DNA aus dem Agarosegel wurde mit dem „DNA Extraction Kit“ (MBI Fermentas, Wilna, Litauen) durchgeführt. Mit T4 DNA Ligase (MBI Fermentas, Wilna, Litauen) erfolgte die Ligation von Vektor und Insert, wobei im Ligationsansatz Vektor und Insert im molaren Verhältnis 1:3 vorhanden waren. Aufgrund der Restriktion mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen konnte der Vektor nicht mit sich selbst ligieren und außerdem konnte das PCR-Produkt nur in der gewünschten Orientierung inseriert werden.

Die Ligationsansätze wurden dann direkt zur Transformation von *E. coli* INV α F' Zellen (Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet. In diesem Zellstamm wird das Zielprotein nicht exprimiert, da es im Expressionsvektor unter der Kontrolle des T7 Promotors steht. Dieser Zellstamm besitzt aber kein Gen für die T7-RNA-Polymerase, und von der *E. coli* RNA-Polymerase wird der Promotor nicht erkannt. Dieser Zellstamm diente nur zur stabilen Lagerung und Amplifikation des Plasmids mit dem klonierten *tfb* Gen. Eine durch den Expressionsvektor vermittelte Ampicillinresistenz erlaubte eine Selektion auf transformierte Zellen. Einige Kolonien wurden neu auf Agarplatten ausgestrichen, und dann wurden einige neu gewachsene Kolonien durch „Kolonie-PCR“, wobei eine Kolonie von einer Agarplatte mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und zu einem PCR-Reaktionsansatz gegeben wird, mit den Klonierungsoligonukleotiden auf das Vorhandensein des *tfb* Gens von *Methanosarcina mazei* überprüft. Ein positiv getesteter Klon wurde überimpft und das Plasmid mit dem „High Pure Plasmid Isolation Kit“ (Roche, Mannheim) präpariert. Das Insert des isolierten Plasmids wurde sequenziert um sicherzustellen, dass bei der PCR zur Erstellung des Inserts keine Mutation eingefügt wurde. Die Sequenzierung zeigte, dass das *tfb* Gen an der gewünschten Position im Expressionsvektor inseriert worden war und die Sequenz mit der bei der Sequenzierung des Phagemids ermittelten *tfb* Sequenz übereinstimmt. Der Klon enthielt also ein mutationsfreies *Methanosarcina mazei* *tfb* Gen.

1.8 Expression von *Methanosarcina mazei* S-6 TFB in *E. coli*

Zur Expression des Zielproteins wurde der Expressionsvektor mit dem inserierten *tfb* Gen in den *E. coli* Expressionsstamm BL21-CodonPlus™ (DE3)-RIL (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Die Zellen dieses Stammes enthalten im Genom ein T7 RNA-Polymerase-Gen, welches unter der Kontrolle eines *lac*-Promotors steht. Dadurch kann das T7 RNA-Polymerase-Gen durch IPTG induziert werden. Die translatierte T7 RNA-Polymerase erkennt dann die T7 Transkriptionssignale vor dem klonierten Zielgen im Expressionsvektor, womit die Transkription des inserierten Gens erfolgt. Die auf dem Expressionsvektor kodierte Ribosomenbindungsstelle ist so beschaffen, dass eine effektive Translation der synthetisierten RNA des inserierten Gens in *E. coli* erfolgt.

Der Expressionsstamm BL21-CodonPlus™ (DE3)-RIL besitzt außerdem ein Plasmid, auf dem zusätzliche Kopien der *argU*-, *ileY* und *leuW*-tRNA Gene vorhanden sind, welche für tRNAs kodieren, die die Arginin Codons AGA und AGG, das Isoleucin Codon AUA und das Leucin Codon CUA erkennen. Diese tRNAs kommen bei *E. coli* natürlicherweise selten vor und können zum limitierenden Faktor bei der Synthese von Zielproteinen aus anderen Organismen werden, bei denen diese Codons häufig vorkommen. Das *tfb* Gen von *Methanosarcina mazei* weist diese Codons mit einer relativen Häufigkeit von 31% auf, weshalb dieser Zellstamm für die Proteinexpression gewählt wurde.

Nachdem einige Kolonien des transformierten Expressionsstammes erfolgreich auf die Anwesenheit des Expressionsvektors mit dem inserierten *tfb* Gen durch „Kolonie-PCR“ getestet worden waren, erfolgte die Expression des Zielproteins in zwei Erlenmeyerkolben mit je 400 ml Medium. Die Induktion erfolgte mit 0,4 mM IPTG und die Zellen wurden nach 1,5 h Inkubation bei 30 °C geerntet.

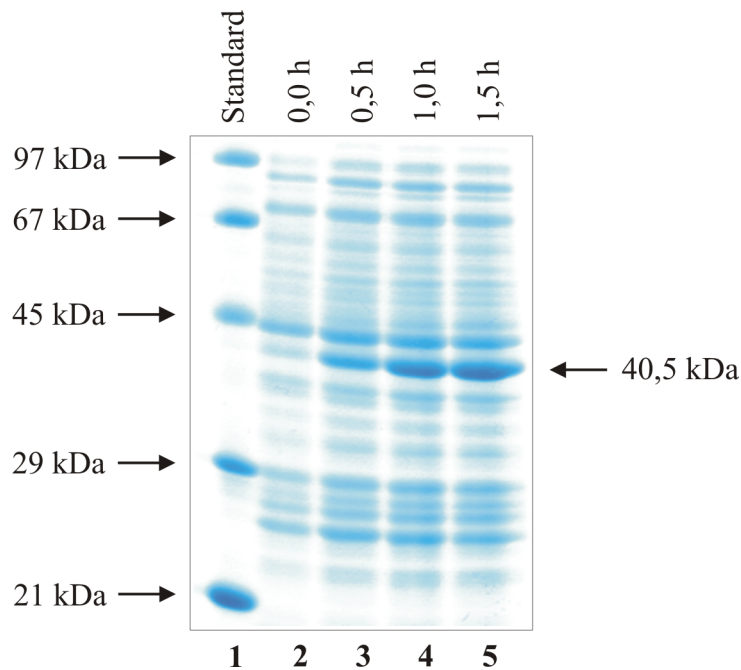


Abb. 5: Expression von *Methanosarcina mazei* TFB in *E. coli* BL21-CodonPlus™ (DE3)-RIL Zellen

12%iges mit Coomassie-Blau gefärbtes SDS-PA-Gel. Über den Spuren ist die Inkubationszeit zur Expression des TFB nach der Induktion mit IPTG angegeben. Der Zellaufschluss erfolgte mit 8 M Harnstoff. Das Molekulargewicht der Proteine des Standards (Protein-Mix 4 und 5 von Serva, Heidelberg) wird durch Pfeile links vom Gel angezeigt. Das Molekulargewicht des *Methanosarcina mazei* TFB mit His₆-Tag wird durch einen Pfeil rechts vom Gel angezeigt.

Der Erfolg der Expression wurde auf einem 12%igen SDS-PA-Gel mit einem durch Harnstoff aufgeschlossenen Aliquot der Probe überprüft. Das berechnete Molekulargewicht des *Methanosarcina mazei* TFB mit His₆-Tag beträgt 40,5 kDa. Die Abb. 5 zeigt, dass ein Protein entsprechenden Molekulargewichts nach Induktion mit IPTG in den *E. coli* Zellen exprimiert wurde. Die Intensität der Bande nimmt dabei mit fortschreitender Inkubationszeit zu. Als Kontrolle war ein Expressionsstamm mit dem Expressionsvektor pet14b ohne Insert transformiert worden. Nach Induktion dieser Kultur war keine verstärkte Expression eines Proteins zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

1.9 Reinigung des rekombinanten TFB von *Methanosarcina mazei* S-6

Die Zellen der Expressionskultur wurden mit einer French-Press-Zelle aufgeschlossen. Mittels Ultrazentrifugation wurden dann die Zelltrümmer entfernt und das Ultrafiltrat (S100) mit den löslichen Proteinen zur Reinigung des Proteins verwendet.

Durch eine Hitzefällung können hitzestabile Zielproteine in einem ersten groben Reinigungsschritt von nicht hitzestabilen *E. coli* Proteinen getrennt werden. Für TFB von *Methanosarcina mazei* konnte gezeigt werden, dass es bei 50 °C noch in Lösung bleibt, aber bereits bei 60 °C eine Denaturierung erfolgt und das Protein ausfällt. Bei 60 °C sind aber auch noch ein Großteil der *E. coli* Proteine in Lösung, so dass auf diese Weise keine effektive Anreicherung des rekombinanten Proteins möglich gewesen wäre. Außerdem wurde auf die Hitzefällung bei der Reinigung verzichtet, um das rekombinante Protein aus dem mesophilen Organismus *Methanosarcina mazei* (optimale Wachstumstemperatur von 37 °C) zu schonen.

Da eine vorangehende Anreicherung des rekombinanten Proteins durch Hitzefällung nicht möglich war, erfolgte der erste Reinigungsschritt durch Affinitätschromatographie über eine Ni-NTA-Säule direkt mit dem S100. Das rekombinante Protein war mit einem Fusionsanteil (His₆-Tag) exprimiert worden und konnte deshalb effektiv an das Säulenmaterial binden und anschließend mit einem Imidazolgradienten wieder eluiert werden. Die gesammelten Fraktionen der Ni-NTA-Säule wurden auf einem 12%igen SDS-PA-Gel analysiert. Es zeigte sich, dass das Zielprotein nicht in einem scharfen Peak, sondern über einen weiten Bereich eluierte. Hierauf hatte auch schon die während der Elution des Proteins gemessene Extinktion bei 280 nm hingewiesen. Ab Fraktion 7 enthielten alle gesammelten Fraktionen das Zielprotein, wobei mit zunehmender Fraktionsnummer die Proteinkonzentration leicht abnahm. Außer der Bande des Zielproteins waren auch noch schwache Nebenbanden zu beobachten, so dass sich ein weiterer Reinigungsschritt anschloss. Es folgte eine Reinigung durch Gelfiltration mit einer Superdex-200-Säule, wobei die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Da auf die Superdex-200-Säule nur 2 ml Proteinlösung aufgetragen werden sollte, um eine gute Auftrennung der Proteine zu erreichen, wurde versucht, das über einen weiten Bereich eluierte Protein aufzukonzrieren. Hierfür wurden Centrex MF-5,0 Ultrafiltratoren (Schleicher & Schüll, Dassel) verwendet. Es zeigte sich jedoch, dass das Protein bei der Konzentrierung ausfiel. Daraufhin wurden für die Gelfiltration nur die Fraktionen 20 bis 23 der Ni-NTA-Säule ausgewählt, die eine relativ hohe Proteinkonzentration mit wenig Nebenbanden aufwiesen.

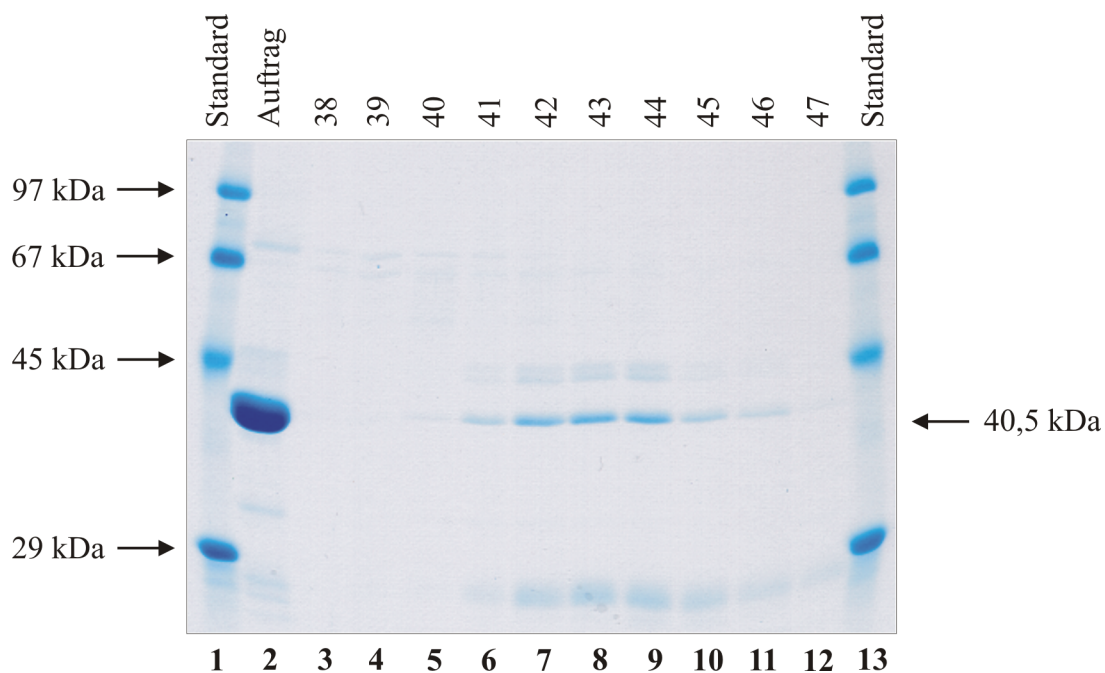


Abb. 6: TFB von *Methanosarcina mazei* nach der Reinigung durch Gelfiltration mit der Superdex-200-Säule

12%iges mit Coomassie-Blau gefärbtes SDS-PA-Gel. Über den Spuren sind die Nummern der Fraktionen nach der Superdex-200-Säule angegeben. Auftrag: vereinigte Fraktionen 20 bis 23 nach der Ni-NTA-Säule. Das Molekulargewicht der Proteine des Standards (Protein-Mix 4 und 5 von Serva, Heidelberg) wird durch Pfeile links vom Gel angezeigt. Das Molekulargewicht des *Methanosarcina mazei* TFB mit His₆-Tag wird durch einen Pfeil rechts vom Gel angezeigt.

Die Abb. 6 zeigt das Ergebnis der Reinigung nach der Gelfiltration. Das Zielprotein konnte durch Gelfiltration zwar weiter gereinigt werden, aber die Proteine zweier Nebenbanden bei ca. 44 kDa und ca. 26 kDa konnten nicht abgetrennt werden. Außerdem erfolgte eine starke

Verdünnung des Proteins. Für *in vitro* Transkriptionsexperimente genügte der Reinheitsgrad des TFB. Daher wurden die Fraktionen 42 bis 44 nach der Gelfiltration vereinigt und die Proteinkonzentration nach BRADFORD (1976) mit 45 ng/μl bestimmt. Auf diese Weise konnten ca. 270 μg Protein gewonnen werden. Das rekombinante TFB von *Methanosarcina mazei* wurde dann aliquotiert bei -70 °C eingefroren.

Bei erneuten Expressionen des rekombinanten TFB von *Methanosarcina mazei* erfolgte die Induktion mit 1 mM IPTG und die Zellen wurden schon nach 1 h Inkubation bei 37 °C geerntet. Für die Reinigungen wurden jeweils nur die Zellen einer 400 ml Kultur aufgeschlossen. Bei der Reinigung des Proteins über die Ni-NTA-Säule eluierte das Protein jeweils wieder über einen weiten Bereich von der Säule. Es erwies sich außerdem bei mehreren Reinigungsversuchen als problematisch, dass bei den Fraktionen mit hohem Proteingehalt am nächsten Tag Protein ausgefallen war. Da aber bei der Elution von der Ni-NTA-Säule über den weiten Bereich die später eluierten Fraktionen weniger Protein aufwiesen und bei diesen Fraktionen auch nur noch schwache Nebenbanden zu beobachten waren, wurde beschlossen, diese Fraktionen ohne weitere Reinigung zu verwenden. Auf diese Weise konnten zwar nicht die Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration verwendet werden, aber bereits nach der Ni-NTA-Säule waren Fraktionen befriedigender Reinheit verfügbar. Allerdings mussten diese Fraktionen noch dialysiert werden, da sie aufgrund der Elution von der Ni-NTA-Säule mit einem Imidazolgradienten noch eine hohe Imidazolkonzentration aufwiesen. Aber auch bei der Dialyse über Nacht gegen TENa10 pH 7.5 bei 4 °C fiel ein Teil des Proteins aus. Dieses Problem wurde gelöst, indem die Dialyse über Nacht bei 20 °C gegen TENa10 pH 6.5 mit 10 mM β-Mercaptoethanol vorgenommen wurde. Außerdem wurde die Dialyse schon am selben Tag angesetzt, an dem auch der Zellaufschluss erfolgt war.

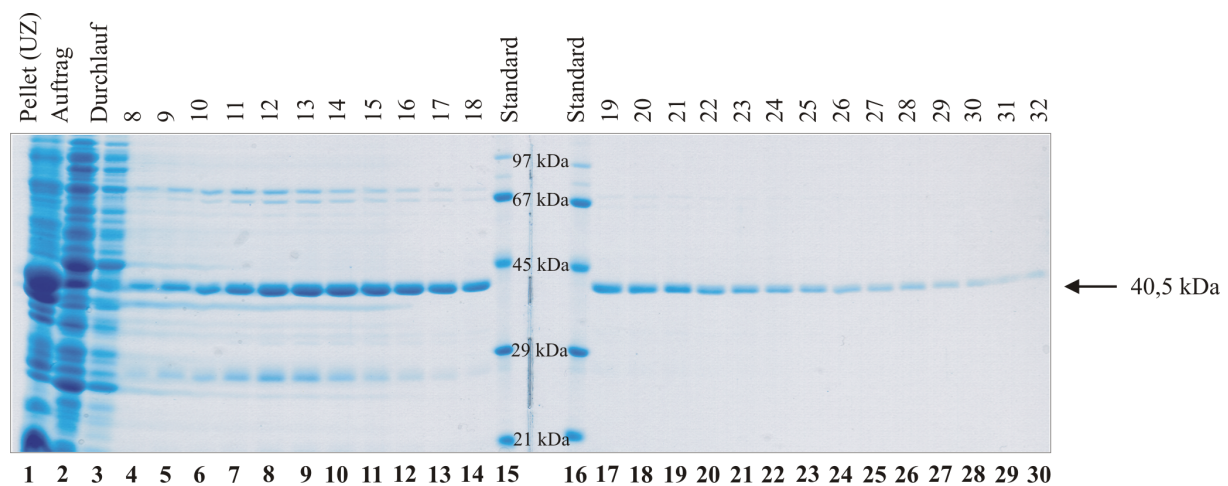


Abb. 7: TFB von *Methanosarcina mazei* nach der Reinigung durch Affinitätschromatographie mit der Ni-NTA-Säule

12%iges mit Coomassie-Blau gefärbtes SDS-PA-Gel. Über den Spuren sind die Nummern der Fraktionen nach der Ni-NTA-Säule angegeben. Pellet (UZ): Harnstoffaufschluss eines Aliquots des Pellets nach der Ultrazentrifugation. Auftrag: S100 (Überstand) nach der Ultrazentrifugation. Durchlauf: Durchlauf vom Auftrag auf die Ni-NTA-Säule. Das Molekulargewicht der Proteine des Standards (Protein-Mix 4 und 5 von Serva, Heidelberg) wird direkt neben den Banden des Standards angezeigt. Das Molekulargewicht des *Methanosarcina mazei* TFB mit His₆-Tag wird durch einen Pfeil rechts vom Gel angezeigt.

Die Abb. 7 zeigt die Fraktionen einer Reinigung mit der Ni-NTA-Säule. In Spur 1 ist zu erkennen, dass im Pellet nach der Ultrazentrifugation eine große Menge *Methanosarcina*

mazei TFB vorhanden ist. Dieses nicht lösliche Protein wurde bei der anschließenden Reinigung nicht verwendet, da im Überstand genug gelöstes Zielprotein vorhanden war. In Spur 2 ist der Auftrag (S100) zu erkennen und in Spur 3 der Durchlauf vom Auftrag auf die Ni-NTA-Säule. Es wird deutlich, dass sich die *E. coli* Proteine im Durchlauf befinden, während das Zielprotein an die Ni-NTA-Säule gebunden hat. Die geringere Intensität der *E. coli* Proteinbanden im Durchlauf im Vergleich zum Auftrag ist auf eine Verdünnung der Probe zurückzuführen. Nach dem Auftrag der Probe auf die Säule wurde Puffer (ohne Imidazol) über die Säule gegeben, bis kein Protein im Durchlauf mehr detektiert werden konnte. Erst danach erfolgte die Elution des Zielproteins. Die Fraktionen 12 bis 14 weisen die höchste Konzentration des Zielproteins auf. Bei diesen Fraktionen und bei den vorherigen Fraktionen sind aber die Nebenbanden deutlich stärker als bei den späteren Fraktionen, bei denen zwar die Nebenbanden schwächer werden, aber auch mit zunehmender Fraktionsnummer die Proteinmenge des Zielproteins abnimmt. Für die weitere Verwendung wurden die Fraktionen 15 bis 19 ausgewählt. Es wurde dabei ein Kompromiss zwischen möglichst hoher Reinheit bei gleichzeitig möglichst hoher Proteinkonzentration gesucht. Die Proteinkonzentration der gegen TENa10 pH 6.5 (10 mM β -Mercaptoethanol) dialysierten vereinigten Fraktionen 15 bis 19 der Ni-NTA-Säule wurde nach BRADFORD (1976) mit 112 ng/ μ l bestimmt. Auf diese Weise konnten ca. 280 μ g Protein gewonnen werden. Das rekombinante TFB von *Methanosarcina mazei* wurde dann aliquotiert bei -70°C eingefroren. In der zellfreien Transkription wies das auf diese Weise gereinigte TFB die gleiche Aktivität auf, wie das bei der ersten Reinigung mit zusätzlicher Gelfiltration gewonnene TFB.

2 Identifizierung, Sequenzierung, Klonierung, Expression und Reinigung von *Methanosarcina mazei tbp* bzw. TBP

Neben TFB sollte zum Aufbau eines zellfreien *Methanosarcina mazei* Transkriptionssystems auch TBP rekombinant hergestellt werden. Zur Identifizierung des *tbp* Gens von *Methanosarcina mazei* war bereits während meiner Diplomarbeit die genomische λ -Genbank von *Methanosarcina mazei* S-6 mittels einer Sonde nach dem *tbp* Gen durchsucht worden (THOMSEN, 1998). Eine Kartierung durch PCR und die Sequenzierung der Phagemide verschiedener positiver Klone ergab jedoch, dass bei allen isolierten Klonen der N-terminale Bereich des *tbp* Gens nicht vorhanden war. Es konnten 492 bp, die für 164 Aminosäuren kodieren, ermittelt werden. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz mit Proteindatenbanken zeigte eine hohe Homologie der ermittelten Teilsequenz mit der TBP Sequenz anderer Organismen. Aufgrund der Sequenzvergleiche wurde vermutet, dass ein N-terminaler Bereich von ca. 60 bp bei den isolierten Klonen fehlte. Eine Überprüfung der λ -Genbank mittels PCR zeigte, dass keine Klone mit der vollständigen *tbp* Sequenz enthalten waren. Bei der Erstellung der λ -Genbank war die genomische DNA von *Methanosarcina mazei* vollständig mit der verwendeten Restriktionsendonuklease, für die eine Erkennungssequenz im *tbp* Gen vorhanden ist, gespalten worden.

Im Rahmen eines Praktikums wurde von Herrn Lutz Thon mittels inverser PCR der fehlende N-terminale Bereich des *tbp* Gens ermittelt und das Gen anschließend kloniert. Dafür wurde zuerst genomische *Methanosarcina mazei* S-6 DNA mit der Restriktionsendonuklease *AvaII* gespalten. Dann erfolgte eine Ligation der erhaltenen einzelnen DNA-Fragmente zur Herstellung von kurzen zirkulären DNA-Molekülen. Diese dienten in einer PCR mit den Oligonukleotiden MMTBP2 und TBPMM3 (THOMSEN, 1998) als Matrize. Die Oligonukleotide waren zur Sequenz des bereits ermittelten Teilbereichs des *tbp* Gens komplementär und zueinander invers orientiert. Aufgrund der zirkulären DNA enthält das auf diese Weise synthetisierte PCR-Produkt auch den unbekanntenen N-terminalen Bereich des *tbp*

Gens, der dann durch Sequenzierung des PCR-Produkts unter Verwendung des Oligonukleotids TBPM3 bestimmt werden konnte. Die Klonierung des *tbp* Gens unter Verwendung der Klonierungsoligonukleotide TBPMmExpF und TBPMmExpR erfolgte analog zum *tfb* Gen. Es wurde der Expressionsvektor pet14b verwendet und die anschließende Transformation erfolgte in *E. coli* JM109 Zellen.

Für den N-terminalen Bereich des Gens konnten zusätzliche 57 bp ermittelt werden. Das offene Leseraster des *tbp* Gens von *Methanosarcina mazei* S-6 enthält somit inklusive Stopcodon 552 bp, die für 183 Aminosäuren kodieren. Die Sequenz des *Methanosarcina mazei* S-6 *tbp* Gens ist in der EMBL Nucleotide Sequence Database des European Bioinformatics Institute (Cambridge, Großbritannien) unter der Accession Number „AJ243798“ hinterlegt worden und wird in der Abb. 8 gezeigt.

Die Expression und Reinigung des *Methanosarcina mazei* TBP war bereits von einer Diplomandin mit meiner Betreuung durchgeführt worden (NAJI, 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurde TBP aber erneut exprimiert und gereinigt. Dabei wurde wie in der Diplomarbeit beschrieben vorgegangen. Es wurde der Expressionsvektor pet14b und der *E. coli* Expressionsstamm BL21-CodonPlus™ (DE3)-RIL verwendet. Zur Reinigung des TBP wurden zwei induzierte 400 ml Kulturen eingesetzt. Nach der Reinigung durch Affinitätschromatographie mit einer Ni-NTA-Säule, die über den vorhandenen His₆-Tag des Proteins erfolgte, wurden die erhaltenen Fraktionen 9 bis 13 zur Auftrennung durch Gelfiltration auf eine Superdex-75-Säule aufgetragen. Eine Analyse der hierbei gewonnenen Fraktionen auf einem 12%igen SDS-PA-Gel zeigte, dass die nach der Ni-NTA-Säule noch vorhandenen Nebenbanden erfolgreich entfernt worden waren. Die Fraktionen 31 und 32 sowie die Fraktionen 30 und 33 wurden jeweils vereinigt und die Proteinkonzentration nach BRADFORD (1976) bestimmt. Die vereinigten Fraktionen 31 und 32 wiesen eine Proteinkonzentration von 515 ng/μl und die vereinigten Fraktionen 30 und 33 wiesen eine Proteinkonzentration von 180 ng/μl auf. Es konnte insgesamt ca. 2,8 mg Protein gewonnen werden. Das rekombinante TBP von *Methanosarcina mazei* wurde dann aliquotiert bei -70 °C eingefroren.

3 Charakterisierung der *tbp* (TBP) und *tfb* (TFB) Sequenz von *Methanosarcina mazei* S-6

```

                                     BRE           TATA-Box
                                     ***           *
-135 GCGAGGACGGCGTTGAAGTAGTCCGTCAGCAGCTCGACAATATGGGGCTTTTATAAGAACCTCAATCTATTAATTATATACCATTTTTC -46
                                     RBS
                                     ****
-45  TGGAAATTAGGTAACCTTACTGGCTTTATATGCTAAEGGTGGACAAATGAGCGAATCTAGTATCAAGATCGAAAATGTGGTTGCATCCACC 45
    1                                     M S E S S I K I E N V V A S T 15

46  AAACCTCGTGAAAGAAATTCGACTTAACTGTTATCGAATCAGAGTTTCGAAGGAGCAGAGTACAACAAGCAGAAGTTCCCGGGCTCGTTTAC 135
16  K L A E E F D L T V I E S E F E G A E Y N K Q K F P G L V Y 45

136 AGGGTTTCAGATCCTAAAGCTGCATTTCTGGTCTTTACTTCCGGCAAGGTTGTCTGTACAGGGACGAAAAATGTTGCCGATGTACACACA 225
46  R V S D P K A A F L V F T S G K V V C T G T K N V A D V H T 75

226 GTTGTAGGCAATTTGGCGAAAAAGCTGAACAGTATAGGGATTAAGACCATAGAGGACCCCTCAGATTACTGTCCAGAATATTGTTGCTTCC 315
76  V V G N L A K K L N S I G I K T I E D P Q I T V Q N I V A S 105

316 GCAGACCTGCATACTATTTTGAACCTTAATGCAATTGCAATAGGGCTTGGACTTGAAAAACATTGAATACGAGCCTGAGCAGTTTCCTGGT 405
106 A D L H T I L N L N A I A I G L G L E N I E Y E P E Q F P G 135

406 CTTGTATACAGAATTGATGAGCCCAAGTAGTTGTGCTTATCTTCAGCTCCGAAAACTGGTAGTTGCAGGCGGTAAGAGCCCTGAAGAT 495
136 L V Y R I D E P K V V V L I F S S G K L V V A G G K S P E D 165

```



```

496 TCGGAGAGGAGCGTGGAAAGTAGTCCGCCAGCAGCTCGACAGTATGGGTCTTTTATAAAATCCTCAAACTTTTTTATCTATTATATCCATTT 585
166 C E R S V E V V R Q Q L D S M G L L □ >>>> > 183
1
586 TAATCTGCCTCATAAAGTACATGGGGAATACTAAAAATAAAAAACGGATTCTGCGGTATTCGTAGAGGCTCCGGCAAAGGATATGTGTGAAA 675
< <<<< >>>>>> <<<<<<
1 2 2

```

Abb. 8: Nukleotidsequenz des *Methanosarcina mazei* S-6 *tbp* Gens und die abgeleitete Aminosäuresequenz von TBP

Die Nummerierung der Nukleotide und Aminosäuren erfolgt relativ zum Translationsstart. Das Startcodon und das Stopcodon sind fett gedruckt. Das vermutliche BRE, die vermutliche TATA-Box und die vermutliche Ribosomenbindungsstelle (RBS) sind eingerahmt und benannt. Nukleotide die mit der entsprechenden Konsensussequenz übereinstimmen sind mit einem Stern gekennzeichnet. Das potentielle Terminationssignal ist unterstrichen und mit 1 und 2 bezeichnete „inverted repeats“ werden durch Pfeile markiert.

Die Abb. 8 zeigt die ermittelte Sequenz des *tbp* Gens von *Methanosarcina mazei* S-6. Das Startcodon des *tbp* Gens ist ATG und das Stopcodon ist TAA. Die Konsensussequenz für das BRE methanogener Archaea beginnt drei Nukleotide stromaufwärts der TATA-Box und lautet 5'-CGAAA-3' (SOPPA, 1999a). Eine Sequenz mit Ähnlichkeit zur Konsensussequenz konnte jedoch nur etwas weiter stromaufwärts gefunden werden. Die Konsensussequenz für die TATA-Box methanogener Archaea lautet 5'-YTTATATA-3' (SOPPA, 1999a) und die identifizierte vermutliche TATA-Box hat die Sequenz 5'-ATTATATA-3'. Von der Konsensussequenz der Ribosomenbindungsstelle methanogener Archaea kommt meistens zumindest das Hexanukleotid 5'-AGGTGA-3' vor (BROWN et al., 1989). Es konnte ein Sequenzbereich der vermutlichen Ribosomenbindungsstelle mit der Sequenz 5'-GGGTGG-3' gefunden werden. Eine Folge von fünf Thymin-Resten zwölf Nukleotide stromabwärts des Stopcodons könnte ein Terminationssignal der Transkription darstellen. Außerdem konnten stromabwärts des Stopcodons zwei mit 1 und 2 bezeichnete „inverted repeats“ gefunden werden, die im Transkript Haarnadelschleifen ausbilden können. Der Bereich zwischen dem „inverted repeat“, der die Schleife bildet, ist allerdings bei beiden „inverted repeats“ länger als üblich.

Das *tbp* Gen von *Methanosarcina mazei* S-6 kodiert ein Protein mit 183 Aminosäuren. Das Protein besitzt ein berechnetes Molekulargewicht von 19,8 kDa und einen isoelektrischen Punkt von 4,7. Aufgrund der Verwendung des Expressionsvektors pet14b besitzt das rekombinante Protein einen His₆-Tag als Fusionsanteil. Das rekombinante Protein besteht aus 203 Aminosäuren, hat ein berechnetes Molekulargewicht von 22,0 kDa und einen isoelektrischen Punkt von 6,0.

```

                                     BRE                               TATA-Box
                                     ***                               *****
-165 TAATCCTTCGTTATGGTTAAACTTTAAACCCGTTTATAAGTTTTTCGCTAGTCATAGCCG CGAGTTTTCTTCTCCCTTCT TTTATATATAT -76
                                     RBS
                                     *****
-75 TCTGTGATTTATATCGTACAGGCTTGAAATTCAGGGATAGACATATGGTCATGTTAATTTGTA AGGTGATATAATATGGTAGAAGTCGAA 15
1 M V E V E 5

16 AGAGTTCGCTATTTCGGACACCCCTTGAAAGGGAAAAAATACGTGCCATGATTAAAGCTCGCAAAGAAAAACAAAAGAGCAAACCTGTTGAG 105
6 R V R Y S D T L E R E K I R A M I K A R K E K Q K E Q T V E 35

106 AATGAAAAGCCGTGTGTCCAGAATGCGGTAGCAGAAACCTAGTGCACGACTATGAGAGAGCGGAGCTCGTGTGTGGGGACTGCGGACTT 195
36 N E K A V C P E C G S R N L V H D Y E R A E L V C G D C G L 65

196 GTCATTGATGCCGACTTTGTGATGAAGGACCGGAATGGCGAGCTTTTCGATCACGATCAGCGCATGAAGCGTTCCCGTGTGGGCGCGCCC 285
66 V I D A D F V D E G P E W R A F D H D Q R M K R S R V G A P 95

286 ATGACATATACAATCCACGACAAAGGGCTTTCCACAATGATTGACTGGAGAAACCGTGACTCCTACGGAAAGTCTATCTCTCCAAAAAC 375
96 M T Y T I H D K G L S T M I D W R N R D S Y G K S I S S K N 125

376 CGTGCCAGCTTTACCGTTTAAAGAAAATGGCAGCGTAGAATCCGTGTAAGTAACGCAACCGAAAGAAACCTGGCTTTTCGACTTTCAGAA 465
126 R A Q L Y R L R K W Q R R I R V S N A T E R N L A F A L S E 155

```

```

466 CTTGACAGGATGGCTTCGGCTCTCGGTCTCCGAGGACTGTCAGGGAGACAGCAGCAGTTGTCTATAGAAAAGCTGTGGACAAGAACCTC 555
156 L D R M A S A L G L P R T V R E T A A V V Y R K A V D K N L 185

556 ATCCGTGGAAGAAGCATTGAAGGTGTAGCCGAGCAGCACTATATGCAGCCTGCCGCCAGTGCAGTGTCCCGAGGACCCCTTGACGAGATC 645
186 I R G R S I E G V A A A A L Y A A C R Q C S V P R T L D E I 215

646 GAAGAGGTTTCCAGGGTAAGCAGGAAAGAAATCGGAAGAACTTACCGTTTTATTCCAGAGAACTTGCCCTGAAGCTCATGCCACCTCT 735
216 E E V S R V S R K E I G R T Y R F I S R E L A L K L M P T S 245

736 CCAATCGACTATGTCCCAAGGTTCTGCTCCGGGCTTAACCTGAAAGGAGAAGTCCAGTCCAAGAGCGTTGAGATCCTCAGGCAGGCTTCG 825
246 P I D Y V P R F C S G L N L K G E V Q S K S V E I L R Q A S 275

826 GAAAAAGAAGCTACAAGCGGAAGAGGCCACAGGAGTTGCCGCAGCAGCAATTTACATTGCATCCATTCTTTGCCGGAGAGCGCAGGACT 915
276 E K E L T S G R G P T G V A A A A I Y I A S I L C G E R R T 305

916 CAGCGTGAAGTTGCAGATGTTGCCGGGGTCACGGAAGTCACCATCAGGAACAGGTATAAAGAGCTTGCAGAAGAAGCTGGATATCGAGATT 1005
306 Q R E V A D V A G V T E V T I R N R Y K E L A E E L D I E I 335

1006 ATCCTCTAAATCTTTCTTCTTTTTTTTTCAGCCAGGCTGATTGATGTTCTTCAGGCAGACAGAGGGTTGAATGTGCCCTCTTTTTCTTCCC 1095
336 I L □ >>>> <<<<<
1 1
> >>>> <<<<< <
2 2

```

Abb. 9: Nukleotidsequenz des *Methanosarcina mazei* S-6 *tfb* Gens und die abgeleitete Aminosäuresequenz von TFB

Die Nummerierung der Nukleotide und Aminosäuren erfolgt relativ zum Translationsstart. Das Startcodon und das Stopcodon sind fett gedruckt. Das vermutliche BRE, die vermutliche TATA-Box und die vermutliche Ribosomenbindungsstelle (RBS) sind eingerahmt und benannt. Nukleotide die mit der entsprechenden Konsensussequenz übereinstimmen sind mit einem Stern gekennzeichnet. Das potentielle Terminationssignal ist unterstrichen und mit 1 und 2 bezeichnete „inverted repeats“ werden durch Pfeile angezeigt. Die Elemente des Zinkfinger-Motivs sind durch dunkle Schattierung und das Helix-Turn-Helix-Motiv ist durch helle Schattierung markiert.

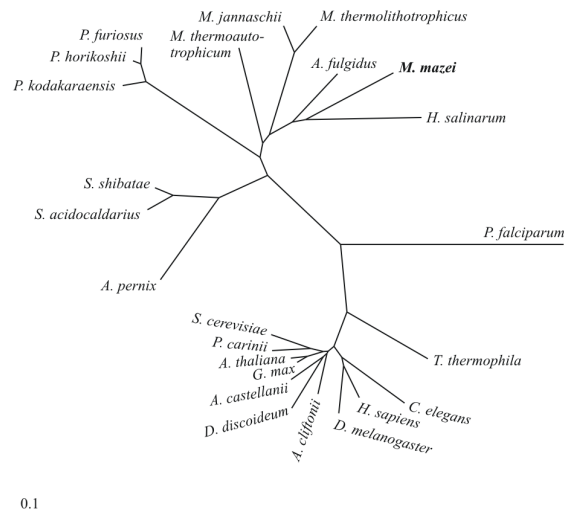
Die ermittelte Sequenz des *tfb* Gens von *Methanosarcina mazei* S-6 wird in Abb. 9 gezeigt. Das Startcodon des *tfb* Gens ist ATG und das Stopcodon ist TAA. Die Sequenz des vermutlichen BRE lautet 5'-CGAGT-3' und liegt wie beim *thp* Gen von *Methanosarcina mazei* S-6 etwas weiter stromaufwärts der TATA-Box als es die Konsensussequenz angibt. Die Sequenz der vermutlichen TATA-Box entspricht mit 5'-TTTATATA-3' exakt ihrer Konsensussequenz und die vermutliche Ribosomenbindungsstelle mit der Sequenz 5'-AGGTGA-3' entspricht ebenfalls genau ihrer Konsensussequenz. Elf Nukleotide stromabwärts des Stopcodons beginnt eine Folge von acht Thymin-Resten, die ein Terminationssignal der Transkription darstellen könnte. Stromabwärts des Stopcodons konnten auch zwei mit 1 und 2 bezeichnete „inverted repeats“ gefunden werden, die ebenfalls als Terminationssignal fungieren könnten.

Das *tfb* Gen von *Methanosarcina mazei* S-6 kodiert ein Protein mit 337 Aminosäuren. Das Protein besitzt ein berechnetes Molekulargewicht von 38,3 kDa und einen isoelektrischen Punkt von 9,6. Das rekombinante TFB mit His₆-Tag besteht aus 357 Aminosäuren, hat ein berechnetes Molekulargewicht von 40,5 kDa und einen isoelektrischen Punkt von 9,8. In der Nähe des N-Terminus des TFB Proteins konnte das Zinkfinger-Motiv CxxC-N₁₅-CxxC identifiziert werden und in der Nähe des C-Terminus wurde ein Helix-Turn-Helix-Motiv detektiert.

Zur Bestimmung der evolutiven Distanz zwischen *Methanosarcina mazei* TBP bzw. TFB und dem TBP bzw. TFB/TFIIB verschiedener Archaea und Eukarya wurden Sequenzvergleiche auf Aminosäureebene durchgeführt. Diese Sequenzvergleiche wurden dann jeweils zur Berechnung eines phylogenetischen Stammbaums verwendet. Der variable N-terminale Bereich der eukaryellen TBP Sequenz, der bei den archaellen TBP Sequenzen nicht vorhanden ist, wurde bei den Sequenzvergleichen zur Erstellung des TBP Stammbaums nicht berücksichtigt. Zur Anfertigung des TFB/TFIIB Stammbaums wurden die vollständigen Sequenzen verwendet, bis auf den großen C-terminalen Bereich der TFIIB Sequenz von

Caenorhabditis elegans, der bei keinem anderen TFB/TFIIB vorkommt. Das *tfb* Gen von *Methanococcus jannaschii* enthält innerhalb der Sequenz für das TFB Protein die Sequenz eines Inteins. Die Sequenz des Inteins wurde bei den Sequenzvergleichen nicht mit einbezogen.

TBP



TFB/TFIIB

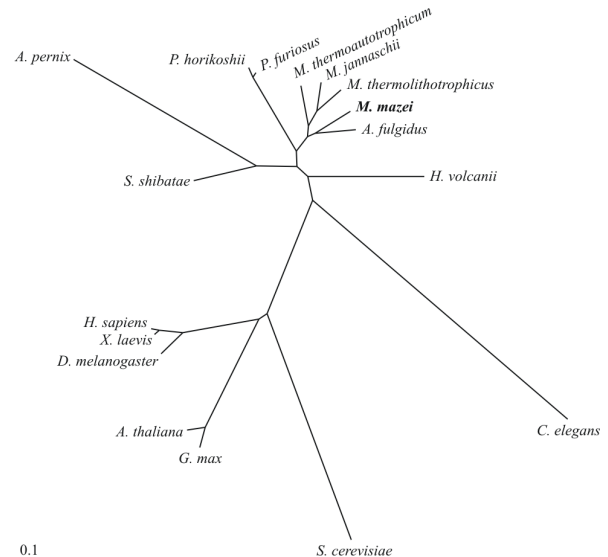


Abb. 10: Phylogenetische Stammbäume von TBP und TFB/TFIIB

Die phylogenetischen Stammbäume wurden mit dem Programmpaket HUSAR 5.0 (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) unter Verwendung der Programme CLUSTAL, EPROTDIST und EFITCH konstruiert und mit dem Programm TREEVIEW dargestellt. Die vollständigen Namen der Organismen und die verwendeten Accession Numbers sind in Material und Methoden aufgeführt (II.2.4). Die Maßstäbe geben 0,1 ausgetauschte Aminosäuren pro Position an.

Die Abb. 10 zeigt die phylogenetischen Stammbäume von TBP und TFB/TFIIB einiger Archaea und Eukarya. Es sind die ersten Stammbäume dieser Proteine, die mit den Molekülen von *Methanosarcina mazei* auch Vertreter eines mesophilen methanogenen Archaea enthalten. Es ist deutlich zu erkennen, dass die archaellen Moleküle jeweils eine Gruppe bilden, die sich jeweils von der Gruppe der eukaryellen Homologe abgrenzt. *Methanosarcina mazei* TBP und TFB gliedern sich innerhalb des Zweigs der Archaea in die Untergruppe der Moleküle anderer Euryarchaeota ein. Die größte Übereinstimmung weisen die *Methanosarcina mazei* Moleküle mit den Homologen von *Archaeoglobus fulgidus* auf.

4 Nachweis der funktionellen Aktivität des rekombinanten *Methanosarcina mazei* TBP und TFB in der *in vitro* Transkription

Es sollte gezeigt werden, dass die zuvor rekombinant hergestellten Proteine TBP und TFB von *Methanosarcina mazei* im *in vitro* Transkriptionssystem funktionell aktiv sind. Hierfür wurde das zellfreie *Methanococcus thermolithotrophicus* Transkriptionssystem verwendet (FREY et al., 1990; HAUSNER & THOMM, 1993). Es wurde jeweils 99 ng rekombinantes TBP und 75 ng rekombinantes TFB von *Methanococcus thermolithotrophicus* bzw. 97 ng rekombinantes TBP und 45 ng rekombinantes TFB von *Methanosarcina mazei* wie in der Tabelle der Abb. 11 angegeben eingesetzt. Als Matrize diente linearisiertes Plasmid pIC31/2, welches die Region von - 58 bis + 131 des tRNA^{Val} Gens von *Methanococcus vannielii*

enthält (HAUSNER et al., 1991). Das Plasmid wurde mit der Restriktionsendonuklease *SfuI*, für die nur eine Schnittstelle vorhanden ist, im Bereich des tRNA^{Val} Gens geschnitten, was zu einem „run-off“ Transkript von 89 nt führt.

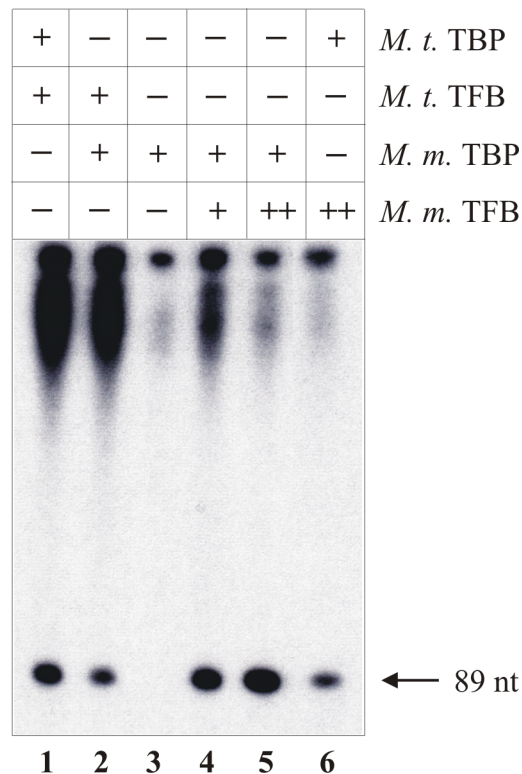


Abb. 11: Nachweis der funktionellen Aktivität des rekombinanten *Methanosarcina mazei* TBP und TFB im *in vitro* Transkriptionssystem von *Methanococcus thermolithotrophicus*

Autoradiogramm eines 15%igen PA-Harnstoff-Gels. Als Matrice diente linearisiertes Plasmid pIC31/2, welches das tRNA^{Val} Gen von *Methanococcus vannielii* enthält. Die Größe des „run-off“ Transkripts wird durch einen Pfeil angezeigt. Im Transkriptionsansatz vorhandene Transkriptionsfaktoren werden in der Tabelle über den Spuren durch ein „+“ angegeben. „++“ zeigt an, dass die doppelte Menge verwendet wurde. *M. t.*: *Methanococcus thermolithotrophicus*; *M. m.*: *Methanosarcina mazei*.

Die Abb. 11 zeigt das Ergebnis der *in vitro* Transkription mit rekombinanten *Methanosarcina mazei* TBP und TFB im zellfreien *Methanococcus thermolithotrophicus* Transkriptionssystem. Beim Einsatz von *Methanococcus thermolithotrophicus* TBP und TFB in der *in vitro* Transkription wird ein spezifisches 89 nt langes Transkript gebildet (Spur 1). Beim Austausch des *Methanococcus thermolithotrophicus* TBP gegen das *Methanosarcina mazei* TBP wird ebenfalls ein 89 nt langes Transkript synthetisiert (Spur 2). Die Verwendung des *Methanosarcina mazei* TFB anstelle des *Methanococcus thermolithotrophicus* TFB ergibt gleichfalls ein Transkript korrekter Größe (Spur 6). Auch wenn beide Transkriptionsfaktoren von *Methanococcus thermolithotrophicus* gegen TBP und TFB von *Methanosarcina mazei* ausgetauscht werden, ist die *Methanococcus thermolithotrophicus* RNA-Polymerase in der Lage ein spezifisches RNA-Produkt von 89 nt Länge zu synthetisieren (Spur 4). Eine Verdopplung der *Methanosarcina mazei* TFB Menge führt zu einer gesteigerten Synthese von Transkript (Spur 5). Ohne TFB wird kein spezifisches Transkript gebildet (Spur 3).

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl das rekombinante TBP, als auch das rekombinante TFB von *Methanosarcina mazei* gegen das jeweilige homologe Protein von *Methanococcus thermolithotrophicus* austauschbar ist. Außerdem wurde nachgewiesen, dass auch beim

Einsatz von *Methanosarcina mazei* TBP und TFB in der *in vitro* Transkription eine korrekte Initiation der Transkription mit effizienter Bildung spezifischer Transkripte stattfindet. Damit ist die funktionelle Aktivität der rekombinanten Transkriptionsfaktoren TBP und TFB von *Methanosarcina mazei* nachgewiesen.

5 *In vitro* Transkription mit *Methanosarcina mazei* RNA-Polymerase

Nachdem die Transkriptionsfaktoren TBP und TFB von *Methanosarcina mazei* zur Verfügung standen und ihre Aktivität nachgewiesen worden war, sollte das zellfreie Transkriptionssystem mit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase aus *Methanosarcina mazei* vervollständigt werden. Die RNA-Polymerase war bereits von einer Diplomandin unserer Arbeitsgruppe gereinigt worden (NAJI, 2000). Obwohl dabei die RNA-Polymerase im TCA-Test eine unspezifische Aktivität aufwies, konnte in *in vitro* Transkriptionen keine spezifische Transkription nachgewiesen werden. Bei Transkriptionsansätzen mit *Methanococcus thermolithotrophicus* und *Methanosarcina mazei* RNA-Polymerase zusammen wurde jedoch ein stärkeres Signal beobachtet, als mit *Methanococcus thermolithotrophicus* RNA-Polymerase allein. Es wurde vermutet, dass bei der Reinigung eine Untereinheit der RNA-Polymerase abgetrennt wurde, die durch die *Methanococcus thermolithotrophicus* RNA-Polymerase wieder zur Verfügung gestellt wird.

Die erneute Reinigung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase von *Methanosarcina mazei* Goe1 (DSM-Stamm-Nr. 3647) erfolgte wie in der Diplomarbeit beschrieben (NAJI, 2000). Es wurde 18,4 g Zellmaterial (Feuchtwicht) aus in der logarithmischen Wachstumsphase geernteten Einzelzellen eingesetzt. Die Zellen wurden mit einer French-Press-Zelle aufgeschlossen und die unlöslichen Bestandteile durch Ultrazentrifugation entfernt. Die Reinigung der RNA-Polymerase erfolgte über Anionen-Austausch-Chromatographie mit einer DEAE-Cellulose-Säule, Affinitätschromatographie mit einer Heparin-Sepharose-Säule und Anionen-Austausch-Chromatographie mit einer MonoQ-Säule unter anaeroben Bedingungen. Eine abschließende Gelfiltration mit einer Superdex-200-Säule wurde nicht durchgeführt, um die Abtrennung einer Untereinheit der RNA-Polymerase zu verhindern, wie es zuvor bei der Gelfiltration beobachtet worden war. Nach den einzelnen Reinigungsschritten wurden die gesammelten Fraktionen mittels TCA-Test auf unspezifische RNA-Polymerase-Aktivität getestet und die aktivsten Fraktionen jeweils vereinigt und für den nächsten Reinigungsschritt eingesetzt. Nach jedem Reinigungsschritt wurde ein Aliquot der Probe zur späteren Untersuchung auf spezifische RNA-Polymerase-Aktivität in der *in vitro* Transkription abgenommen. Abschließend wurden die MonoQ-Fraktionen positiv auf unspezifische RNA-Polymerase-Aktivität getestet (Daten nicht gezeigt).

Für die *in vitro* Transkriptionen mit der RNA-Polymerase von *Methanosarcina mazei* wurden die für unspezifische Transkription in TCA-Tests ermittelten optimierten Bedingungen eingestellt (NAJI, 2000). Die Inkubation erfolgte also bei 45 °C mit 20 mM MgCl₂ und 20 mM KCl. Da die Elution des Proteins von der MonoQ-Säule mit einem KCl-Gradienten erfolgte, wurde für jede Fraktion die KCl Konzentration berechnet und berücksichtigt. Es wurde weiterhin je 25 µl Transkriptionsansatz 97 ng rekombinantes TBP und 45 ng rekombinantes TFB von *Methanosarcina mazei* eingesetzt. Als Matrize diente linearisiertes Plasmid pIC31/2, welches das tRNA^{Val} Gen von *Methanococcus vannielii* enthält. Das Plasmid wurde mit der Restriktionsendonuklease *SfuI* im Bereich des tRNA^{Val} Gens geschnitten, woraus ein „run-off“ Transkript von 89 nt resultiert.

In der *in vitro* Transkription wurde jeweils 1,0 µl des S100 (nach der Ultrazentrifugation), vereinigte Fraktionen nach der DEAE-Säule, vereinigte Fraktionen nach der Heparin-Säule und die MonoQ-Fractionen 12 bis 21 getestet. Als Positivkontrolle diente 1000 ng *Methanococcus thermolithotrophicus* RNA-Polymerase. Es konnte jedoch nur bei der Positivkontrolle spezifisches Transkript detektiert werden. Bei allen untersuchten Proben mit *Methanosarcina mazei* RNA-Polymerase war kein spezifisches RNA-Produkt zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Es konnte also, obwohl die abschließende Gelfiltration bei der Reinigung der RNA-Polymerase nicht durchgeführt worden war und eine unspezifische RNA-Polymerase-Aktivität vorhanden war, keine spezifische RNA-Polymerase-Aktivität gezeigt werden.

Daraufhin wurden verschiedene Parameter bei der *in vitro* Transkription mit den MonoQ-Fractionen einzeln verändert. Es wurden größere Mengen der MonoQ-Fractionen eingesetzt, das *grpE* Gen von *Methanosarcina mazei* als Matrize verwendet, die MgCl₂ Konzentration von 2 mM bis 50 mM und die KCl Konzentration von 11 mM bis 150 mM variiert. Die TBP Menge wurde bis zu 970 ng erhöht und die TFB Menge wurde bis zu 225 ng erhöht. Außerdem wurden *in vitro* Transkriptionen mit TBP von *Methanococcus thermolithotrophicus*, TFB von *Methanococcus thermolithotrophicus* und TBP und TFB von *Methanococcus thermolithotrophicus* durchgeführt. Aber bei allen durchgeführten Experimenten konnte bis auf die Positivkontrolle mit *Methanococcus thermolithotrophicus* RNA-Polymerase kein spezifisches Transkript beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Eine RNase-Aktivität der *Methanosarcina mazei* Proben konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. Bei der *in vitro* Transkription mit *Methanococcus thermolithotrophicus* und *Methanosarcina mazei* RNA-Polymerase zusammen im Ansatz konnte bei den MonoQ-Fractionen und den vereinigten Heparin-Säulen-Fractionen spezifisches Transkript detektiert werden. Lediglich der S100 und die vereinigten DEAE-Säulen-Fractionen lieferten zusammen mit *Methanococcus thermolithotrophicus* RNA-Polymerase kein spezifisches RNA-Produkt, was auf eine RNase-Aktivität dieser nur sehr grob gereinigten Proben schließen lässt (Daten nicht gezeigt).

Da die *Methanosarcina mazei* RNA-Polymerase keine spezifische Aktivität aufwies, wurde beschlossen, für die weiteren Versuche die *Methanococcus thermolithotrophicus* RNA-Polymerase einzusetzen, für die schon gezeigt worden war, dass sie mit den *Methanosarcina mazei* Transkriptionsfaktoren TBP und TFB mit guter Effizienz spezifische Transkripte synthetisiert.

6 Optimierung der *in vitro* Transkription mit *Methanococcus thermolithotrophicus* RNA-Polymerase und *Methanosarcina mazei* TBP und TFB

Für *in vitro* Transkriptionsanalysen zur Untersuchung der Regulation der Transkription bei *Methanosarcina mazei* sollte die gereinigte *Methanococcus thermolithotrophicus* RNA-Polymerase mit den rekombinanten Transkriptionsfaktoren TBP und TFB von *Methanosarcina mazei* eingesetzt werden. Um eine optimale Ausbeute an spezifischen Transkripten zu erhalten wurden die Versuchsbedingungen für dieses zellfreie Transkriptionssystem optimiert.

Zunächst wurde die DNA-abhängige RNA-Polymerase von *Methanococcus thermolithotrophicus*, wie von FREY et al. (1990) und HAUSNER und THOMM (1993) beschrieben, säulenchromatographisch gereinigt (Daten nicht gezeigt). In einer *in vitro*

Transkription mit dem tRNA^{Val} Gen von *Methanococcus vannielii* als Matrize, 96 ng TBP von *Methanosarcina mazei* und 112 ng TFB von *Methanosarcina mazei* wurde je 1,0 µl der erhaltenen Superdex-200-Säulen Fraktionen aus dem letzten Reinigungsschritt auf spezifische RNA-Polymerase-Aktivität getestet. Die Proben waren zuvor schon mittels TCA-Test positiv auf unspezifische RNA-Polymerase-Aktivität untersucht worden und durch SDS-PA-Gelelektrophorese analysiert worden (Daten nicht gezeigt). Die in der *in vitro* Transkription aktivsten Fraktionen 30 bis 33 wurden vereinigt und die Proteinkonzentration nach BRADFORD (1976) mit 400 ng/µl bestimmt.

Für die Optimierung der *in vitro* Transkription diente linearisiertes Plasmid pUC19, in welches der Promotor und der Anfang des *grpE* Gens von *Methanosarcina mazei* inseriert worden war als Matrize. Das Plasmid wurde mit der Restriktionsendonuklease *HincII*, für die nur eine Schnittstelle vorhanden ist, hinter dem Insert geschnitten. Die einzelnen Parameter der *in vitro* Transkription wurden variiert und die Transkriptionsansätze auf 10%igen PA-Harnstoff-Gelen analysiert. Das ermittelte Optimum wurde bei der Analyse des nächsten Parameters jeweils schon berücksichtigt. Die Reihenfolge bei der Analyse der Parameter entsprach der Reihenfolge in der folgenden Tabelle 3.

Parameter	Optimum
MgCl ₂	4 mM
KCl	80 mM
Tris/HCl	20 mM
pH	9.0
EDTA	0,2 mM
DTT	6 mM
<i>M. m.</i> TBP	125 ng
<i>M. m.</i> TFB	84 ng
DNA (2988 bp)	150 ng
<i>M. t.</i> RNA-Polymerase	400 ng
ATP/CTP/GTP	je 20 µM
UTP	1 µM
Zeit	30 min

Tab. 3: Ermittelte Optima für die Versuchsbedingungen der *in vitro* Transkription mit *Methanococcus thermolithotrophicus* RNA-Polymerase und *Methanosarcina mazei* TBP und TFB

In der linken Spalte ist jeweils der untersuchte Parameter und in der rechten Spalte das für diese Variable ermittelte Optimum angegeben. Die Angaben beziehen sich auf einen mit Milli-Q H₂O auf 25 µl aufgefüllten Transkriptionsansatz. *M. t.*: *Methanococcus thermolithotrophicus*; *M. m.*: *Methanosarcina mazei*.

Eine längere Inkubation als 30 min ergab zwar eine erhöhte Menge Transkript, aber eine Inkubation für 30 min wurde als ausreichend erachtet. Der Austausch von KCl gegen NaCl ergab eine verringerte Ausbeute an Transkript. Bei allen Reaktionen wurde 1,5 µCi [α -³²P]UTP (3000 Ci/mmol) eingesetzt. Die Transkriptionsansätze wurden bei 37 °C inkubiert. Das Temperaturoptimum der *Methanococcus thermolithotrophicus* RNA-Polymerase beträgt zwar 55 °C (FREY et al., 1990; HAUSNER & THOMM, 1993), aber die Transkriptionsfaktoren stammen von *Methanosarcina mazei* und die optimale Wachstumstemperatur dieses Archaeons beträgt 37 °C. Deshalb sollten auch die anschließenden Studien zur Regulation der Transkription bei *Methanosarcina mazei* bei 37 °C

durchgeführt werden. Alle folgenden *in vitro* Transkriptionen wurden mit den ermittelten optimalen Bedingungen durchgeführt.

7 *In vitro* Transkription der Hitzeschockgene *grpE*, *dnaK* und *dnaJ* von *Methanosarcina mazei*

Es sollte untersucht werden, ob die Hitzeschockgene *grpE*, *dnaK* und *dnaJ* von *Methanosarcina mazei* im zellfreien Transkriptionssystem mit rekombinanten *Methanosarcina mazei* TBP und TFB sowie gereinigter *Methanococcus thermolithotrophicus* RNA-Polymerase transkribiert werden. Die Gene liegen im Genom in der Reihenfolge 5'-*grpE-dnaK-dnaJ*-3' direkt hintereinander, werden aber *in vivo* monocistronisch transkribiert. Die drei Hitzeschockgene werden *in vivo* unter optimalen Wachstumsbedingungen auf niedrigem Niveau konstitutiv transkribiert. Nach einem Hitzeschock wird die Transkription dieser Gene jedoch stark heraufreguliert (CONWAY DE MACARIO et al., 1995; CLARENS et al., 1995).

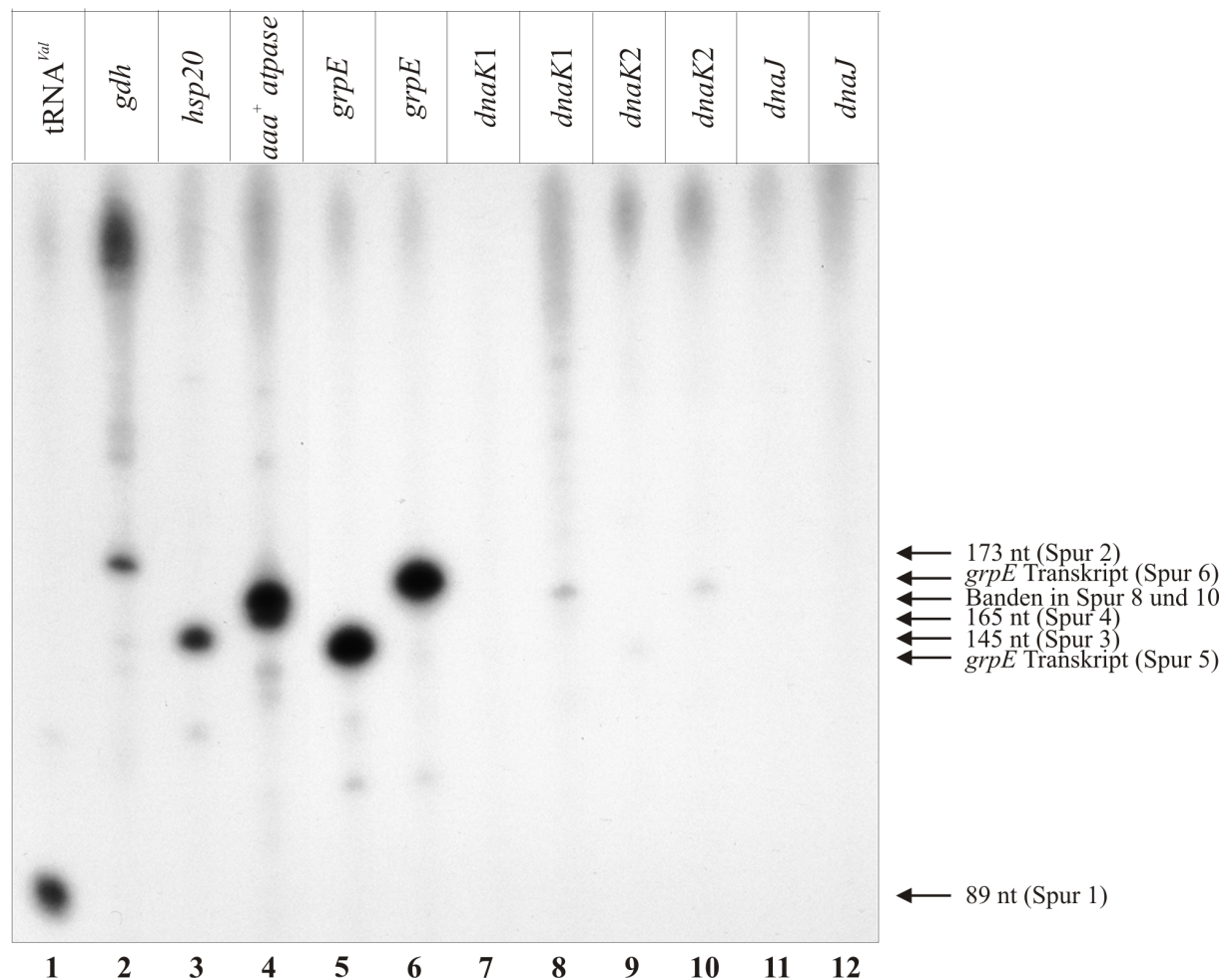


Abb. 12: *In vitro* Transkription der Hitzeschockgene *grpE*, *dnaK* und *dnaJ* von *Methanosarcina mazei*
 Autoradiogramm eines 10%igen PA-Harnstoff-Gels. Die Größe der tRNA^{Val}, *gdh*, *hsp20* und *aaa⁺ atpase* Transkripte wird durch Pfeile angezeigt. Ebenfalls durch Pfeile angezeigt werden die *grpE* Transkripte und die Bands in Spur 8 und 10. Die eingesetzte Matrizen-DNA ist über den Spuren angegeben.

Die Promotoren und der jeweilige Anfang der Gene *grpE*, *dnaK* und *dnaJ* waren, wie in Material und Methoden beschrieben (II.2.7), in den Vektor pUC19 kloniert worden. Die eingesetzte Matrizen-DNA war mit Insert jeweils ca. 3 kb groß, und es wurde bei allen Transkriptionsansätzen die gleiche Menge DNA eingesetzt. Die Plasmide wurden jeweils durch Restriktionshydrolyse linearisiert, so dass es sich bei allen Transkripten um ein „run-off“ Transkript handelt. Die folgende Tabelle 4 charakterisiert die eingesetzten Matrizen genauer.

Spur	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Gen	tRNA ^{Val}	<i>gdh</i>	<i>hsp20</i>	<i>aaa+ atpase</i>	<i>grpE</i>	<i>grpE</i>	<i>dnaK1</i>	<i>dnaK1</i>	<i>dnaK2</i>	<i>dnaK2</i>	<i>dnaJ</i>	<i>dnaJ</i>
Organismus	<i>M. v.</i>	<i>P. f.</i>	<i>P. f.</i>	<i>P. f.</i>	<i>M. m.</i>	<i>M. m.</i>	<i>M. m.</i>	<i>M. m.</i>	<i>M. m.</i>	<i>M. m.</i>	<i>M. m.</i>	<i>M. m.</i>
Plasmid	pIC31/2	pLUW479	uphsp20	upatpase	pUC19	pUC19	pUC19	pUC19	pUC19	pUC19	pUC19	pUC19
RE	<i>SfuI</i>	<i>BamHI</i>	<i>XbaI</i>	<i>KpnI</i>	<i>HincII</i>	<i>HindIII</i>	<i>HincII</i>	<i>HindIII</i>	<i>HincII</i>	<i>HindIII</i>	<i>HincII</i>	<i>PaeI</i>
Transkriptlänge [nt]	89	173	145	165	ca. 146	ca. 166	ca. 186	ca. 206	ca. 186	ca. 206	ca. 169	ca. 179

Tab. 4: Matrizen-DNA

In der ersten Zeile ist die entsprechende Spur des Autoradiogramms angegeben, in der zweiten Zeile ist das verwendete Gen genannt, in der dritten Zeile wird der Organismus erwähnt aus dem das Gen stammt und in der vierten Zeile ist das Plasmid angegeben, in welches der Promotor und der Anfang des Gens inseriert wurden. In der fünften Zeile wird die Restriktionsendonuklease angegeben mit der das Plasmid geschnitten wurde, und in der sechsten Zeile ist die daraus resultierende Transkriptlänge erwähnt. *M. t.*: *Methanococcus vannielii*; *P. f.*: *Pyrococcus furiosus*; *M. m.*: *Methanosarcina mazei*; RE: Restriktionsendonuklease.

Die Transkriptionsstartpunkte der Gene tRNA^{Val} (HAUSNER et al., 1991), *gdh* (HETHKE et al., 1996), *hsp20* und *aaa+ atpase* (VIERKE et al., 2003) waren bekannt. Für diese Gene konnte die Transkriptlänge genau bestimmt werden. Deshalb dienen diese Transkripte als Größenstandard auf dem Autoradiogramm. Die Transkriptionsstartpunkte der Gene *grpE*, *dnaK* und *dnaJ* waren bisher nur *in vivo* bestimmt worden (CONWAY DE MACARIO et al., 1995; CLARENS et al., 1995). Zur Ermittlung der ungefähr zu erwartenden Transkriptlängen wurden die *in vivo* Transkriptionsstartpunkte herangezogen. Es wurde in zwei getrennten Ansätzen mit zwei unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen linearisierte Matrize für die *in vitro* Transkription der Gene *grpE*, *dnaK* und *dnaJ* verwendet. Ein spezifisches Transkript besitzt damit auch bei unbekanntem Transkriptionsstart einen bekannten Größenunterschied und kann so leichter von unspezifischen Produkten unterschieden werden.

82 bp stromaufwärts des *in vivo* Transkriptionsstarts des *dnaK* Gens konnte eine auffällige fünffache direkte Sequenzwiederholung mit der Sequenz 5'-ATGGAAATAACCGGCTAAACCAAAGAATTG-3' festgestellt werden. Eine Datenbankrecherche ergab für diese Sequenz zwar keine signifikante Übereinstimmung mit einer bekannten Sequenz, aber diese fünffache direkte Sequenzwiederholung kurz vor dem Promotor lässt vermuten, dass es sich hierbei um ein regulatorisches Element handeln könnte. Deswegen wurden für die *in vitro* Transkription des *dnaK* Gens zwei Matrizen konstruiert. Die Matrize *dnaK1* (Spur 7 und 8) enthält diese Sequenzwiederholung, während die Matrize *dnaK2* (Spur 9 und 10) diese Sequenzwiederholung nicht aufweist.

In Spur 1 ist das tRNA^{Val} Transkript, in Spur 2 das *gdh* Transkript, in Spur 3 das *hsp20* Transkript und in Spur 4 das *aaa+ atpase* Transkript zu erkennen. Die Lage der Transkripte zueinander im Gel korreliert gut mit ihrer berechneten Größe. In Spur 5 und 6 sind jeweils zwei starke Signale zu beobachten. In Spur 5 läuft die Bande ungefähr auf der Höhe des 145 nt langen *hsp20* Transkripts (Spur 3). In Spur 6 läuft die Bande zwischen dem 165 nt langen

aaa+ atpase Transkript (Spur 4) und dem 173 nt langen *gdh* Transkript (Spur 2). Die Größe der Transkripte in Spur 5 und 6 entspricht ungefähr der für das *grpE* Transkript mit dem *in vivo* Transkriptionsstart berechneten Größe (Tab. 4). Außerdem ist die für Spur 5 und 6 auch bei unbekanntem Transkriptionsstart bekannte Größendifferenz der *grpE* Transkripte von 20 nt gegeben (Tab. 4). Aufgrund der guten Transkriptionseffizienz, der zutreffenden Größe und der korrekten Größendifferenz ist davon auszugehen, dass es sich bei den Transkripten in Spur 5 und 6 jeweils um das *grpE* Transkript handelt.

In Spur 7 bis 10 mit der *dnaK* Matrizen-DNA im Transkriptionsansatz kann kein starkes Signal detektiert werden. In Spur 8 und 10 sind jedoch schwache Signale auf der Höhe des *aaa+ atpase* Transkripts (Spur 4) zu erkennen. In Spur 9 läuft ein sehr schwaches Signal auf der Höhe des *hsp20* Transkripts (Spur 3). Die Größendifferenz von 20 nt (Tab. 4) für die Transkripte in Spur 9 und 10 wäre also gegeben. Allerdings stimmen die Größen der Transkripte in den Spuren 8, 9 und 10 nicht mit den für die *dnaK* Transkripte mit dem *in vivo* Transkriptionsstart berechneten Größen überein (Tab. 4). Die Verwendung der Matrizen-DNA mit der fünffachen direkten Sequenzwiederholung stromaufwärts des Promotors (Spur 7 und 8) hatte keinen nennenswerten Einfluss im Vergleich zur Matrizen-DNA ohne diese Sequenzwiederholung (Spur 9 und 10). Aufgrund der schwachen Transkriptionseffizienz und der abweichenden Größe der Transkripte könnte es sich bei den in den Spuren 7 bis 10 detektierten Signalen auch um unspezifische Produkte handeln. In den Spuren 11 und 12 kann kein Transkript detektiert werden. Das *dnaJ* Gen lässt sich also *in vitro* nicht transkribieren.

Es konnte gezeigt werden, dass sich das *grpE* Gen im zellfreien Transkriptionssystem mit guter Effizienz transkribieren lässt. Beim *dnaK* Gen lässt sich nur ein sehr schwaches Transkript beobachten, wobei es sich hierbei auch um ein unspezifisches Produkt handeln könnte. Das *dnaJ* Gen lässt sich im *in vitro* Transkriptionssystem nicht transkribieren.

8 Vorversuch zur Affinitätsreinigung von Proteinen mit immobilisierter DNA

Aus zellfreiem Extrakt von hitzegeschockten und nicht hitzegeschockten *Methanosarcina mazei* Zellen sollten mit immobilisierter doppelsträngiger DNA potentielle Repressor- oder Aktivatorproteine der Transkription der *Methanosarcina mazei* Hitzeschockgene isoliert werden. Potentielle Regulatorproteine könnten aufgrund einer eventuell vorhandenen Bindungsstelle direkt an die DNA binden, wenn die Bindung an den DNA-TBP-TFB Komplex oder DNA-TBP-TFB-RNA-Polymerase Komplex erfolgen sollte, könnte auch ein solcher Komplex angeboten werden. Die DNA mit dem Promotor eines Hitzeschockgens und einem Bereich stromauf- und stromabwärts des Promotors wird mittels PCR hergestellt. Jeweils ein Oligonukleotid bei der PCR ist am 5'-Ende mit Biotin markiert, dadurch kann das PCR-Produkt anschließend an Streptavidin-Magnetpartikel (Roche, Mannheim) gekoppelt werden. Über die Magnetpartikel ist dann mit einem Magnetpartikel-Separator (Roche, Mannheim) eine selektive Pelletierung der markierten DNA mit daran gebundenen Proteinen möglich. Der Überstand mit allen nicht an die DNA bindenden Bestandteilen kann entfernt und das Pellet in Waschpuffer resuspendiert werden. Nach mehrfacher Pelletierung und anschließender Resuspendierung sollte nur die immobilisierte DNA mit spezifisch gebundenen Proteinen im Ansatz verbleiben.

Zur Überprüfung der Durchführbarkeit dieses Versuchs wurde DNA des *Methanosarcina mazei grpE* Promotors von Position – 173 bis + 129 verwendet. Es sollte versucht werden TBP und TFB durch Bindung an die Promotor-DNA aus einem Ansatz zu isolieren. Die

erfolgreiche Bindung von TBP und TFB an diese DNA wird später durch Gel-Retardationsexperimente gezeigt. Als Negativkontrolle wurde ein 293 bp langes PCR-Produkt des Vektors pUC19 verwendet. Die PCR-Produkte wurden mit dem „High Pure PCR Product Purification Kit“ (Roche, Mannheim) von nicht inkorporierten Oligonukleotiden gereinigt und anschließend nach Anleitung des Herstellers mit Streptavidin-Magnetpartikeln gekoppelt. Die erfolgreiche Kopplung der Biotin-markierten DNA an die Streptavidin-Magnetpartikel wurde auf einem Agarosegel überprüft.

Je 5 µg TBP und TFB wurden mit 1,7 mg Streptavidin-Magnetpartikeln, an die ca. 17 pmol DNA gekoppelt war, in 100 µl Transkriptionspuffer für 30 min bei 37 °C inkubiert. Als Kontrollprotein wurde den Versuchsansätzen 5 µg BSA zugegeben, und als Kompetitor-DNA war 1 µg poly (dA-dT) im Ansatz vorhanden. Die Reinigung der Proteine aus dem Ansatz mittels der immobilisierten DNA erfolgte wie eingangs beschrieben. Die Elution der gebundenen Proteine sollte durch eine hohe Salzkonzentration (bis zu 3 M NaCl) erfolgen, wie es z. B. im Protokoll des „DNA-binding Protein Purification Kit“ (Roche, Mannheim) oder für einen Transkriptionsfaktor der Hefe (GABRIELSEN & HUET, 1993) beschrieben ist. Einige Eluate wurden anschließend einer Mikrodialyse unterzogen, um die hohe Salzkonzentration wieder zu beseitigen. Das Eluat wurde dann mit einer Vakuum-Zentrifuge konzentriert, damit die gesamte Probe gelelektrophoretisch analysiert werden konnte. Es ließ sich aber bei den auf 12%igen SDS-PA-Gelen analysierten Eluaten durch Coomassie-Blau-Färbung und auch durch die sensitivere Silberfärbung keine signifikante Menge eingesetztes TBP und TFB nachweisen. Auch ein Elutionsversuch mittels eines niedrigen pH-Wertes mit 100 mM NaAc pH 4.2 (REN et al., 1994) oder eine Inkubation bei 94 °C für 5 min führte nicht zum Erfolg. Erst nach einer Inkubation bei 94 °C für 5 min mit Auftragspuffer für SDS-PA-Gele (enthält 1% SDS), bei der auch die Bindung zwischen Streptavidin und Biotin getrennt wird und die einzelnen Bestandteile des gesamten Komplexes frei werden, konnte auf einem 12%igen SDS-PA-Gel neben Bestandteilen des Komplexes auch eluiertes Zielprotein detektiert werden. Es zeigte sich jedoch, dass das Zielprotein sowohl mit der *grpE* Promotor-DNA, als auch mit der pUC19 Kontroll-DNA isoliert werden konnte. BSA hingegen konnte erwartungsgemäß nicht mit der immobilisierten DNA aus dem Ansatz isoliert werden. Die Isolierung des Zielproteins auch im Kontrollexperiment mit der pUC19 DNA und die nicht durchführbare Elution des Proteins, ohne den gesamten Komplex zu zerstören, deutet auf eine unspezifische Bindung des Zielproteins an eine Komponente der Streptavidin-Magnetpartikel hin. Dieser Versuchsaufbau war jedenfalls unter den gewählten Bedingungen nicht zur Reinigung potentieller Regulatorproteine geeignet, und es musste auf die Untersuchung des zellfreien Extrakts hitzegeschockter und nicht hitzegeschockter Zellen verzichtet werden.

9 Bestimmung des Startnukleotids der *in vitro* Transkription des *grpE* Gens durch Primer Extension

Bei der *in vitro* Transkription des *grpE* Gen von *Methanosarcina mazei* konnte ein starkes Signal erhalten werden. Es sollte in diesem Versuch das Startnukleotid der *in vitro* Transkription des *grpE* Gens von *Methanosarcina mazei* durch Primer Extension bestimmt werden. Nach der Bestimmung des Startpunkts der Transkription lässt sich auch die Länge des Transkripts bei *in vitro* Transkriptionsversuchen genau berechnen.

cDNA gebildet werden. Da in Spur 2 kein Signal zu detektieren ist, ist somit nachgewiesen, dass es sich bei dem Signal in Spur 1 tatsächlich um cDNA handelt.

Der Startpunkt der *in vitro* Transkription des *grpE* Gens von *Methanosarcina mazei* liegt 20 bp stromabwärts der TATA-Box und 45 bp stromaufwärts des Translationsstarts (Abb. 13B).

10 Klonierung, Expression und Reinigung von *Methanosarcina mazei tfe* bzw. TFE

Zur Untersuchung des Einflusses von *Methanosarcina mazei* TFE auf die *in vitro* Transkription sollte das Protein rekombinant hergestellt werden. Zu diesem Zeitpunkt der Arbeit waren die Daten der Sequenzierung des *Methanosarcina mazei* Goel Genoms bereits veröffentlicht (DEPPENMEIER et al., 2002). Die Sequenz des *Methanosarcina mazei tfe* Gens ist in der EMBL Nucleotide Sequence Database des European Bioinformatics Institute (Cambridge, Großbritannien) unter der Accession Number „AE013294“ verfügbar. Zur Überprüfung wurde die Aminosäuresequenz mit Proteindatenbanken abgeglichen. Es zeigte sich, dass die verwendete Sequenz die höchste Übereinstimmung mit dem vermutlichen TFE von *Halobacterium sp.* aufweist. Folgend wurden weitere TFE Proteine verschiedener Organismen angegeben. Als Startcodon des *Methanosarcina mazei tfe* Gens ist ein TTG Triplet angeben. Im korrekten Leseraster neun Nukleotide vor diesem Triplet liegt ein weiteres potentiell Startcodon mit der Sequenz GTG. Da nicht eindeutig ist, welches Triplet das korrekte Startcodon darstellt, wurde das GTG Triplet gewählt. Die für die Klonierung verwendete Sequenz des *tfe* Gens besitzt also am 5'-Ende zusätzlich zu der in der Datenbank angegeben Sequenz den Sequenzabschnitt 5'-GTGAACACT-3'.

Aufgrund der bekannten Sequenz des *tfe* Gens war es möglich Klonierungsoligonukleotide zu entwickeln, mit denen das *tfe* Gen direkt aus genomischer *Methanosarcina mazei* DNA mittels PCR amplifiziert werden konnte. Es wurden die Klonierungsoligonukleotide mmtfe-exp-f, mit einer Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *NdeI* in Richtung 5'-Ende, und mmtfe-exp-r, mit einer Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *BamHI* in Richtung 5'-Ende, eingesetzt. Zur selektiven Amplifikation des *tfe* Gens aus genomischer *Methanosarcina mazei* S-6 DNA mit den Klonierungsoligonukleotiden wurde die Platinum[®] Pfx DNA-Polymerase (Gibco[™] Invitrogen, Carlsbad, USA), welche eine Proofreading-Aktivität aufweist, nach Anleitung des Herstellers verwendet. Die Klonierung des PCR-Produkts erfolgte wie für das *tfb* Gen von *Methanosarcina mazei* beschrieben. Es wurde der Expressionsvektor pet14b benutzt und die Transformation des Expressionsvektors mit dem inserierten *tfe* Gen erfolgte in *E. coli* JM109 Zellen. Von zwei positiv durch „Kolonie-PCR“ auf das *tfe* Gen getesteten Klonen wurde das Plasmid mit dem E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kit I (Peqlab, Erlangen) präpariert.

Die anschließende Sequenzierung des inserierten *tfe* Gens zeigte für beide Klone, dass die Insertion an der gewünschten Position erfolgt war, und dass die Sequenz mit der bei der Genomsequenzierung von *Methanosarcina mazei* Goel ermittelten Sequenz für das *tfe* Gen übereinstimmt. Es ist zu beachten, dass für die Sequenzierung des Genoms der Stamm *Methanosarcina mazei* Goel verwendet wurde, aber für die Klonierung des *tfe* Gens DNA des Stamms *Methanosarcina mazei* S-6 eingesetzt wurde. Die ermittelte Sequenz des *tfe* Gens des Stamms *Methanosarcina mazei* S-6 stimmt vollständig mit der des Stamms *Methanosarcina mazei* Goel überein und wird in Abb. 14 gezeigt. Das klonierte *tfe* Gen besteht inklusive Stopcodon aus 504 bp, die für 167 Aminosäuren kodieren. Das Protein besitzt ein berechnetes Molekulargewicht von 19,4 kDa und einen isoelektrischen Punkt von 5,2. Das rekombinante

TFE mit His₆-Tag besteht aus 187 Aminosäuren, hat ein berechnetes Molekulargewicht von 21,6 kDa und einen isoelektrischen Punkt von 6,7. Bei der näheren Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz von TFE wurde im N-terminalen Bereich des Proteins ein Helix-Turn-Helix-Motiv entdeckt. Außerdem konnte im C-terminalen Bereich des Proteins das Zinkfinger-Motiv CxxxC-N₁₄-CxxC gefunden werden.

```

1  GTGAACACTTTGGTCGATTTAAATGACAAGGTAATTAGAGGATACCTCAGGAGCCTTGTAGGGGATGACGGGCTTAAAAATGATAGAACAG 90
1  M N T L V D L N D K V I R G Y L R S L V G D D G L K M I E Q 30

91  ATGCCCGAAGGCAATGTCACGGATGAAGAAATGCGGCGAAGACCGGAGTTCTGCTGAATACCGTGAGAAGAACTCTTTTATACTTTAT 180
31  M P E G N V T D E E I A A K T G V L L N T V R R T L F I L Y 60

181 GAGAATAAAATTTGCAATAGTTGTAAGGGAAAAGAGATTCAAATAGCGGATGGCTGACTTATCTCTGGCATCTGGACTTTTCCGACATAGAG 270
61  E N K F A I V V R E R D S N S G W L T Y L W H L D F S D I E 90

271 CACCAGCTTATGAGGGAAAAGAAAGACTGCTAAGGAATCTGAAGACCCGCTTGAATTTGAAGAAAATCATGTATTTTACGTTTGTCTCT 360
91  H Q L M R E K K R L L R N L K T R L E F E E N H V F Y V C P 120

361 CAGGTTTGTGTTTCGCCCTTCTTTTGTACGAAGCAACGGAAACGGAAATTTCTCTGCCCAATGTGCGGAGAAGACCTGGTTTACTATGACAAC 450
121 Q G C V R L L F D E A T E T E F L C P M C G E D L V Y Y D N 150

451 TCCCGTTTTGTGGGAGTTCTGAAAAAGCGCGTAGAAGCTTTGAGTTCCGCATAA 504
151 S R F V G V L K K R V E A L S S A □ 167

```

Abb. 14: Nukleotidsequenz des *Methanosarcina mazei* S-6 *tfe* Gens und die abgeleitete Aminosäuresequenz von TFE

Die Nummerierung der Nukleotide und Aminosäuren beginnt am vermutlichen Translationsstart. Die beiden potentiellen Startcodons und das Stopcodon sind fett gedruckt. Das Helix-Turn-Helix-Motiv ist durch helle Schattierung markiert. Die Elemente des Zinkfinger-Motivs sind durch dunkle Schattierung gekennzeichnet.

Zur Expression von TFE wurde der Expressionsvektor pet14b mit dem inserierten *tfe* Gen in den *E. coli* Expressionsstamm BL21-CodonPlus™ (DE3)-RIL transformiert. Dieser Zellstamm mit den zusätzlichen Kopien der Gene für tRNAs, die bei *E. coli* selten vorkommen, wurde gewählt, weil das *tfe* Gen von *Methanosarcina mazei* S-6 die von diesen tRNAs erkannten Codons mit einer relativen Häufigkeit von 33% aufweist. Die Expression des Zielproteins wurde in zwei Erlenmeyerkolben mit je 400 ml Medium durchgeführt. Die Induktion erfolgte mit 0,4 mM IPTG und die Zellen wurden nach 3 h Inkubation bei 37 °C geerntet. Die Analyse eines mit 8 M Harnstoff aufgeschlossenen Aliquots der Probe auf einem 12%igen SDS-PA-Gel zeigte, dass das Zielprotein erfolgreich exprimiert worden war (Daten nicht gezeigt). Das rekombinante *Methanosarcina mazei* TFE wurde dann über den vorhandenen His₆-Tag durch Affinitätschromatographie mit einer Ni-NTA-Säule aus dem Ultrafiltrat (S100) der mit einer French-Press-Zelle aufgeschlossenen Zellen gereinigt.

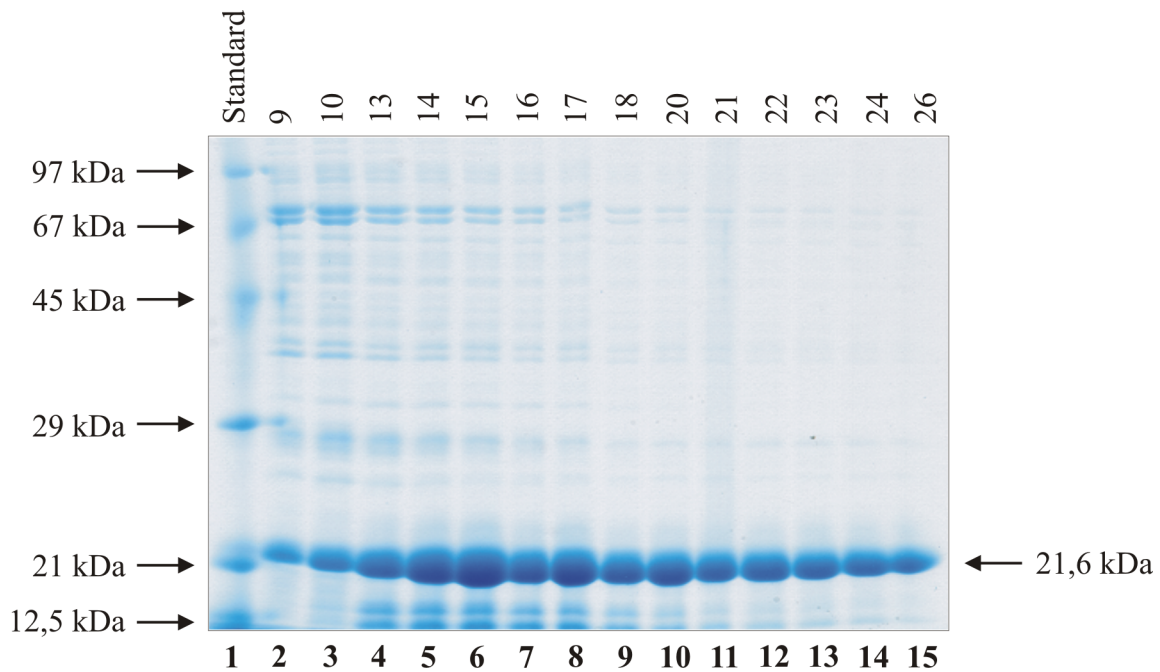


Abb. 15: TFE von *Methanosarcina mazei* nach der Reinigung durch Affinitätschromatographie mit der Ni-NTA-Säule

12%iges mit Coomassie-Blau gefärbtes SDS-PA-Gel. Über den Spuren sind die Nummern der Fraktionen nach der Ni-NTA-Säule angegeben. Die Fraktionen 11, 12, 19 und 25 wurden vom Fraktionskollektor nicht gesammelt. Das Molekulargewicht der Proteine des Standards (Protein-Mix 4 und 5 von Serva, Heidelberg) wird durch Pfeile links vom Gel angezeigt. Das Molekulargewicht des *Methanosarcina mazei* TFE mit His₆-Tag wird durch einen Pfeil rechts vom Gel angezeigt.

Die Abb. 15 zeigt das Ergebnis der Reinigung von TFE mit der Ni-NTA-Säule. Das berechnete Molekulargewicht des *Methanosarcina mazei* TFE mit His₆-Tag beträgt 21,6 kDa. Es ist zu erkennen, dass die Elution des Zielproteins von der Ni-NTA-Säule über einen weiten Bereich erfolgte. Alle auf dem SDS-PA-Gel analysierten Fraktionen enthalten das Zielprotein. Die höchste Proteinkonzentration liegt in Fraktion 15 vor. In den davor und danach gesammelten Fraktionen sinkt die Proteinkonzentration mit abnehmender bzw. zunehmender Fraktionsnummer. Bis Fraktion 17 sind starke Nebenbanden zu beobachten, ab Fraktion 18 sind die Nebenbanden deutlich schwächer, und ab Fraktion 22 sind kaum noch Nebenbanden zu detektieren. In den Fraktionen mit den höchsten Proteinkonzentrationen war am nächsten Tag Protein ausgefallen. Diese Fraktionen wurden zentrifugiert und die im Überstand gelöste Proteinmenge nach BRADFORD (1976) bestimmt. Es zeigte sich, dass nur ein Teil des Proteins ausgefallen war. Auch eine Analyse des Überstands dieser Fraktionen auf einem 12%igen SDS-PA-Gel ergab, dass sich bei allen analysierten Fraktionen noch ungefähr gleich viel TFE im Überstand nachweisen lässt (Daten nicht gezeigt), während einen Tag zuvor unterschiedliche Mengen TFE vorhanden gewesen waren. Unter den gewählten Bedingungen war die Menge des Proteins, das sich in Lösung befindet offenbar stark begrenzt. Dieser Effekt war zuvor auch schon beim *Methanosarcina mazei* TFB beobachtet worden.

Da das Zielprotein in den Fraktionen 22, 23, 24, 26 und 27 weitgehend rein vorliegt und in diesen Fraktionen auch kein ausgefallenes Protein zu beobachten war, wurde entschieden, diese Fraktionen für die *in vitro* Transkriptionsexperimente zu verwenden. Die Fraktion 27 ist in der Abb. 15 nicht enthalten, sie wurde auf einem weiteren nicht gezeigten SDS-PA-Gel analysiert. Sie wies annähernd die gleiche Proteinkonzentration und Reinheit wie die Fraktion 26 auf. Die Fraktion 25 war vom Fraktionskollektor nicht gesammelt worden. Aufgrund der mit einem Imidazolgradienten durchgeführten Elution von der Ni-NTA-Säule wurden die

vereinigten Fraktionen 22, 23, 24, 26 und 27 zur Entfernung des Imidazols gegen TENa10 pH 7.5 dialysiert. Die Proteinkonzentration der gegen TENa10 pH 7.5 vereinigten Fraktionen 22, 23, 24, 26 und 27 wurde nach BRADFORD (1976) mit 335 ng/ μ l bestimmt. Es konnte insgesamt ca. 840 μ g Protein gewonnen werden. Das rekombinante TFE von *Methanosarcina mazei* wurde dann aliquotiert bei -70 °C eingefroren.

11 *In vitro* Transkription mit *Methanosarcina mazei* TFE

Es sollte der Einfluss des rekombinanten Transkriptionsfaktors TFE aus *Methanosarcina mazei* auf die *in vitro* Transkription untersucht werden. Es konnte bisher für das TFE einiger Archaea gezeigt werden, dass es die *in vitro* Transkription stimulieren kann, so z. B. bei *Sulfolobus solfataricus* und *Methanobacterium thermoautotrophicum* (BELL et al. 2001; HANZELKA et al. 2001). Es sollte nun untersucht werden, ob TFE aus *Methanosarcina mazei* die *in vitro* Transkription ebenfalls stimulieren kann.

11.1 Wirkung des Transkriptionsfaktors TFE aus *Methanosarcina mazei* auf die *in vitro* Transkription

Als Matrize für die *in vitro* Transkription diente linearisiertes Plasmid pUC19, in welches der Promotor und der Anfang des *grpE* Gens von *Methanosarcina mazei* inseriert worden war. Der Transkriptionsstartpunkt des untersuchten *grpE* Gens war vorher durch Primer Extension bestimmt worden, so dass bei einer Restriktionshydrolyse der Matrize mit *HincII* ein „run-off“ Transkript mit 146 nt erwartet wurde. Es wurde bei den Ansätzen jeweils ein Pufferausgleich mit dem Puffer, in dem TFE vorliegt, vorgenommen, so dass die Bedingungen in den Ansätzen bis auf die TFE Menge identisch waren.

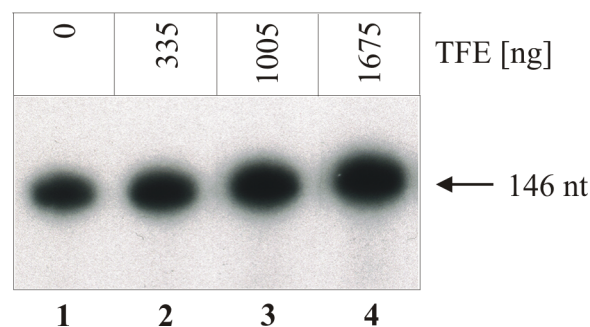


Abb. 16: Wirkung unterschiedlicher Mengen des Transkriptionsfaktors TFE aus *Methanosarcina mazei* auf die *in vitro* Transkription des *grpE* Gens

Autoradiogramm eines 10%igen PA-Harnstoff-Gels. Die Menge des eingesetzten TFE ist über den Spuren angegeben. Die Größe des Transkripts wird durch einen Pfeil angezeigt.

In Abb. 16 ist der Einfluss einer steigenden Menge rekombinanten TFEs auf die *in vitro* Transkription des *grpE* Gens aus *Methanosarcina mazei* dargestellt. In Spur 1 ist zu erkennen, dass auch ohne den Einsatz von TFE eine gute Transkriptionseffizienz erreicht werden konnte. Der Einsatz von 335 ng TFE führte aber dennoch zu einer leichten Stimulierung der Transkription (Spur 2). Die Zugabe der dreifachen und fünffachen Menge TFE mit 1005 ng TFE und 1675 ng TFE führte jeweils zu einer weiteren leichten Stimulierung der Transkription (Spur 3 und 4). Es konnte also gezeigt werden, dass die *in vitro* Transkription

des *grpE* Gens, welches auch ohne TFE mit guter Effizienz transkribiert wird, durch die Zugabe von TFE leicht stimuliert wird.

11.2 Nachweis der Aktivität des Transkriptionsfaktors TFE

Es wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt, um nachzuweisen, dass die Stimulierung der Transkription in den Transkriptionsansätzen mit TFE tatsächlich auf eine Aktivität des TFE Proteins zurückzuführen ist. Dazu wurde die *in vitro* Transkription mit nativen TFE und mit denaturierten TFE durchgeführt. Es wurde jeweils 2100 ng TFE eingesetzt. Zur Denaturierung des TFE erfolgte eine Inkubation bei 94 °C für 15 min. Vor der Zugabe des denaturierten TFE zum Transkriptionsansatz wurde der Denaturierungsansatz heruntergekühlt. Als Matrize diente die auch im vorigen Versuch eingesetzte *grpE*-DNA. Es wurde bei dem Ansatz ohne TFE ein Pufferausgleich mit dem Puffer in dem TFE vorliegt vorgenommen, so dass die Bedingungen in den Ansätzen mit und ohne TFE identisch waren. Die Werte der relativen Transkriptionsaktivität stellen die Mittelwerte aus den Daten von zwei Experimenten dar.

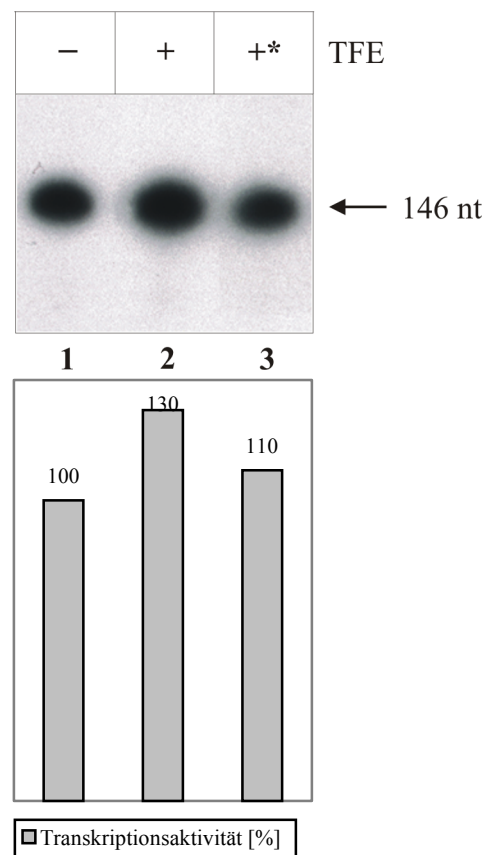


Abb. 17: Nachweis der Aktivität des Transkriptionsfaktors TFE

Autoradiogramm eines 10%igen PA-Harnstoff-Gels. Die Zugabe von 2100 ng TFE zur *in vitro* Transkription des *grpE* Gens wird über den Spuren mit einem „+“ angegeben. Das mit einem Stern (*) markierte TFE wurde vor der Zugabe zum *in vitro* Transkriptionsansatz für 15 min bei 94 °C inkubiert. Die Größe des Transkripts wird durch einen Pfeil angezeigt. Das Diagramm unter den Spuren gibt die relative Transkriptionsaktivität in Abhängigkeit von der TFE Zugabe an, wobei der Wert für die Spur ohne TFE gleich 100% gesetzt wurde.

In Spur 1 wurde der Transkriptionsansatz ohne TFE aufgetragen. Bei dieser Spur wurde der Wert für die relative Transkriptionsaktivität gleich 100% gesetzt. Beim Einsatz von 2100 ng nativen TFE ist eine leichte Stimulierung der Transkription zu beobachten (Spur 2). Die relative Transkriptionsaktivität steigt auf 130%. Beim Einsatz von 2100 ng TFE, das vorher für 15 min bei 94 °C inkubiert wurde, ist hingegen kaum eine Stimulierung der Transkription zu detektieren (Spur 3). Der Wert für die relative Transkriptionsaktivität beträgt nur 110%. Das der Wert für die relative Transkriptionsaktivität beim Ansatz mit dem denaturierten TFE nicht 100%, sondern 110% beträgt, könnte daran liegen, dass nicht die gesamte TFE Menge inaktiviert wurde oder ein Teil des TFE sich korrekt zurückfalten konnte. Durch die Inkubation bei 94 °C für 15 min ist das TFE also zum Großteil inaktiviert worden, und damit nicht mehr in der Lage die Transkription zu stimulieren. Die Ansätze von Spur 3 und 4 sind bis auf das inaktivierte TFE absolut identisch. Die Ansätze wurden aus einem Master Mix pipettiert und es musste auch kein Pufferausgleich vorgenommen werden, da die gleiche Menge TFE eingesetzt wurde. Es konnte also gezeigt werden, dass eine leichte Stimulierung der *in vitro* Transkription auf die Aktivität des nativen TFE zurückzuführen ist.

11.3 Einfluss des Transkriptionsfaktors TFE auf die *in vitro* Transkription bei suboptimalen TBP Mengen

Es sollte untersucht werden, ob TFE die *in vitro* Transkription bei suboptimalen TBP Mengen stärker stimuliert als bei optimalen Transkriptionsbedingungen mit 125 ng TBP. Dazu wurden *in vitro* Transkriptionen mit unterschiedlichen TBP Mengen jeweils ohne und mit 75 ng TFE durchgeführt. Die Zunahme der relativen Transkriptionsaktivität beim Einsatz von TFE wurde für jede verwendete TBP Menge einzeln berechnet, wobei die Werte für die Spuren ohne TFE jeweils gleich 100 % gesetzt wurden. Als Matrize diente wieder die auch in den vorigen beiden Versuchen verwendete *grpE*-DNA. Es wurde bei den Ansätzen jeweils ein Pufferausgleich mit dem Puffer in dem TFE und TBP vorliegen vorgenommen, so dass die Bedingungen in den Ansätzen bis auf die TFE und TBP Menge identisch waren.

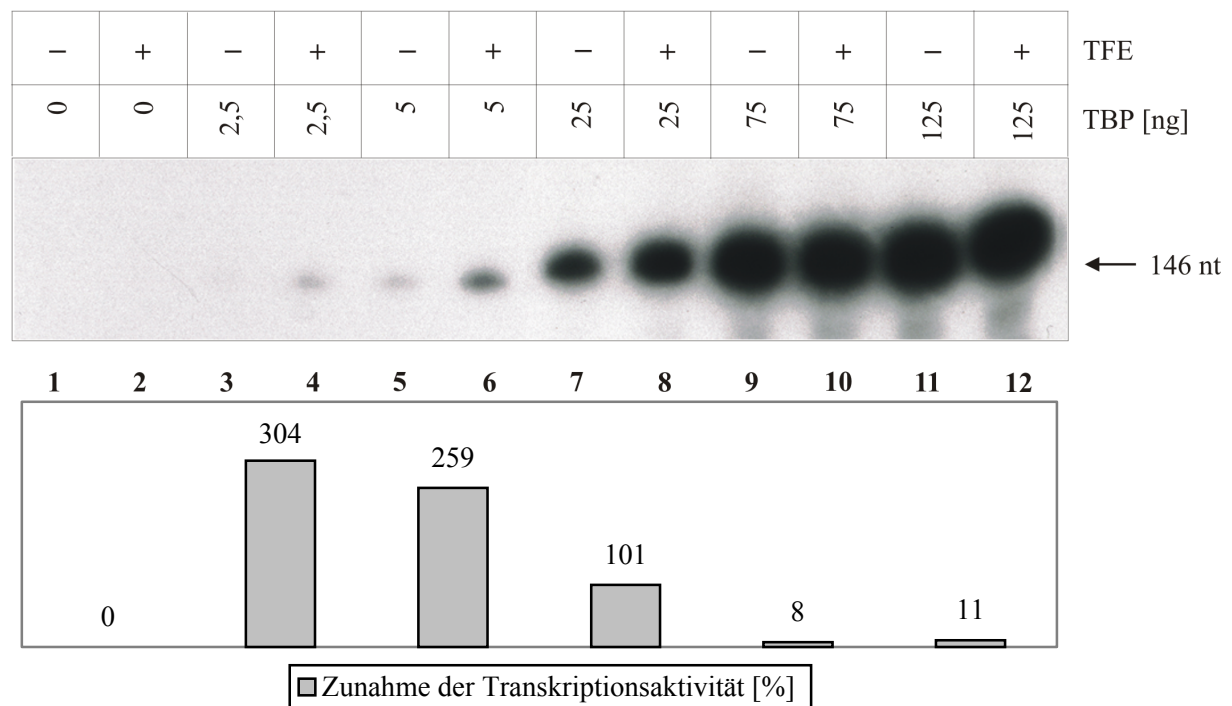


Abb. 18: Einfluss des Transkriptionsfaktors TFE auf die *in vitro* Transkription des *grpE* Gens bei suboptimalen TBP Mengen

Autoradiogramm eines 10%igen PA-Harnstoff-Gels. Die Menge des eingesetzten TBP ist über den Spuren angegeben. Darüber wird die Zugabe von 75 ng TFE mit einem „+“ angezeigt. Die Größe des Transkripts ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Das Diagramm unter den Spuren gibt für jede TBP Menge die Zunahme der relativen Transkriptionsaktivität beim Einsatz von TFE an. Die Werte für die Spuren ohne TFE wurden bei der Berechnung jeweils gleich 100% gesetzt.

Die Abb. 18 zeigt *in vitro* Transkriptionen mit suboptimalen TBP Mengen jeweils in An- und Abwesenheit von TFE. Bei den Transkriptionsansätzen ohne TBP kann weder mit noch ohne TFE eine Bande beobachtet werden (Spur 1 und 2). Auch nach längerer Exposition des Films war kein Transkript zu detektieren (Daten nicht gezeigt). TBP ist also essentiell für die *in vitro* Transkription und kann nicht durch TFE ersetzt werden. Da kein Transkript synthetisiert wird ist gleichzeitig nachgewiesen, dass das eingesetzte rekombinante TFE keine TBP Verunreinigung aufweist (Spur 2).

Beim Einsatz von 2,5 ng TBP steigt die relative Transkriptionsaktivität durch die Zugabe von TFE um 304% im Vergleich zum Transkriptionsansatz ohne TFE (Spur 3 und 4). Die Bande in Spur 3 ist auf dem präsentierten Autoradiogramm schwer zu erkennen, konnte aber auf einem länger exponierten Film und bei der Auswertung mit dem PhosphorImager (FLA-5000, Fujifilm) und dazugehöriger Software (Aida Image Analyzer, Raytest) eindeutig detektiert werden. Bei 5 ng TBP steigert TFE die relative Transkriptionsaktivität um 259% (Spur 5 und 6) und bei 25 ng TBP steigert TFE die relative Transkriptionsaktivität noch um 101% (Spur 7 und 8). Eine Zunahme der relativen Transkriptionsaktivität ist bei 75 ng TBP mit 8% (Spur 9 und 10) und 125 ng TBP mit 11% (Spur 11 und 12) jedoch kaum noch festzustellen. Es wurde also nachgewiesen, dass TFE die *in vitro* Transkription bei suboptimalen TBP Mengen deutlich stärker stimuliert als bei optimaler TBP Menge.

Eine drastisch stärkere Stimulierung der Transkription durch TFE ist vor allem bei den sehr geringen TBP Mengen 2,5 ng und 5 ng zu beobachten (Spur 3 bis 6). Die Transkription wird um den Faktor 3 bzw. 2,6 stimuliert. Bei 25 ng TBP verdoppelt sich die Transkriptionsaktivität noch (Spur 7 und 8), während bei der immer noch suboptimalen TBP Menge von 75 ng TBP kaum noch eine Stimulierung zu beobachten ist (Spur 9 und 10), genauso wie bei der optimalen TBP Menge von 125 ng (Spur 11 und 12). Es konnte also gezeigt werden, dass der Stimulierungseffekt durch TFE mit abnehmender TBP Menge zunimmt.

12 *In vitro* Transkription und Gel-Retardation mit dem potentiellen Repressor AmtR aus *Methanosarcina mazei*

In dem etablierten zellfreien *in vitro* Transkriptionssystem mit den rekombinant hergestellten basalen Transkriptionsfaktoren TBP und TFB aus *Methanosarcina mazei* und der gereinigten RNA-Polymerase aus *Methanococcus thermolithotrophicus* sollte der Einfluss des potentiellen Regulatorproteins AmtR aus *Methanosarcina mazei* auf die Transkription des *in vivo* in Abhängigkeit vom Stickstoffangebot transkribierten *glnK* Gens aus *Methanosarcina mazei* untersucht werden. Bei den ersten mit AmtR durchgeführten *in vitro* Transkriptionen konnte allerdings unabhängig vom untersuchten Gen mit zunehmender AmtR Konzentration im Transkriptionsansatz eine Abnahme der Transkriptmenge beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Um die Möglichkeit auszuschließen, dass der beobachtete Effekt auf einer RNase Kontamination der AmtR Charge beruht und nicht auf eine Hemmung der Transkription

zurückzuführen ist, sollte AmtR unter Transkriptionsbedingungen mit der RNA des *grpE* Transkripts inkubiert werden. Außerdem war auf dem Autoradiogramm einiger *in vitro* Transkriptionen, bei denen die Ansätze AmtR enthielten, eine Bande höheren Molekulargewichts deutlich oberhalb der Bande des freien Transkripts zu detektieren (Daten nicht gezeigt). Es wurde deshalb vermutet, dass AmtR in der Lage ist an die RNA zu binden und eine Retardation erzeugt. Mit dem folgenden Versuch kann geklärt werden, ob die AmtR Charge eine RNase Aktivität aufweist und ob AmtR eine Retardation induzieren kann.

12.1 Test auf RNase Aktivität der AmtR Charge und Gel-Retardation von RNA durch AmtR

Als Matrize für die *in vitro* Transkription diente linearisiertes Plasmid pUC19, in welches die Region stromaufwärts des *grpE* Gens von *Methanosarcina mazei* mit dem Promotor und dem Anfang des Gens inseriert worden war. Das Plasmid war mit der Restriktionsendonuklease *HincII*, für die nur eine Schnittstelle vorhanden ist, hinter dem Insert geschnitten, was zu einem 146 nt „run-off“ Transkript führt. Das rekombinante AmtR Protein wurde von Frau Dr. Schmitz-Streit gereinigt zur Verfügung gestellt. Durch SDS-PA-Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie-Blau-Färbung des Gels wurde die Reinheit überprüft. Es konnten keine weiteren Banden als die 22 kDa Bande des AmtR Proteins detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

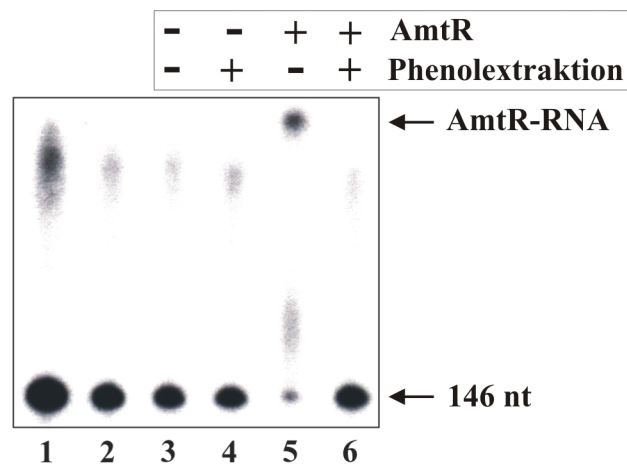


Abb. 19: Test der AmtR Charge auf RNase Aktivität und Gel-Retardation von RNA durch AmtR

Autoradiogramm eines 10%igen PA-Harnstoffgels. Die Zugabe von AmtR und die Durchführung einer Phenolextraktion nach Inkubation ist über den Spuren angegeben. Die Größe des Transkripts wird durch einen Pfeil angezeigt. Der AmtR-RNA Komplex ist ebenfalls mit einem Pfeil gekennzeichnet.

- Spur 1: Transkriptionsansatz
- Spur 2: Transkriptionsansatz aus Spur 1 nach Phenol-Chloroform-Extraktion, Ethanol-Fällung und Resuspendierung im Ausgangsvolumen Transkriptionspuffer
- Spur 3: Aliquot des *grpE* Transkripts aus Spur 2 nach Inkubation für 30 min bei 37 °C mit Puffer
- Spur 4: Aliquot des Ansatzes aus Spur 3 nach Phenolextraktion
- Spur 5: Aliquot des *grpE* Transkripts aus Spur 2 nach Inkubation für 30 min bei 37 °C mit 377 ng/μl AmtR
- Spur 6: Aliquot des Ansatzes aus Spur 5 nach Phenolextraktion

In Spur 1 der Abb. 19 kann man das 146 nt Transkript des *grpE* Gens von *Methanosarcina mazei* erkennen. In Spur 2 ist eine geringere Menge Transkript als in Spur 1 zu erkennen. Bei der Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung ist es nicht zu vermeiden, dass ein Teil der Probe verloren geht, und da das Präzipitat im Ausgangsvolumen Transkriptionspuffer aufgenommen wurde, ist die Konzentration etwas geringer.

Bei den Ansätzen aus Spur 3 und 4 wurde das *grpE* Transkript aus dem Ansatz von Spur 2 für 30 min bei 37 °C mit der Menge Puffer inkubiert, mit der auch AmtR für die Ansätze von Spur 5 und 6 zugegeben wird. Dies wurde als Kontrolle durchgeführt, um eine Beobachtung in Spur 5 und 6 als Puffereffekt auszuschließen. In Spur 3 ist keine Veränderung zu Spur 2 zu erkennen, womit ein Puffereffekt für Spur 5 ausgeschlossen ist. Auch eine anschließende Phenol-Extraktion bewirkt, wie erwartet, keine Veränderung (Spur 4). Da in Spur 3 und 4 keine Neusynthese von Transkript zu beobachten ist, ist gleichzeitig nachgewiesen, dass die Phenol-Chloroform-Extraktion (nach Spur 1) erfolgreich war und die Proteine (TBP, TFB und RNA-Polymerase) wirkungsvoll aus dem Transkriptionsansatz entfernt wurden.

Bei den Ansätzen aus Spur 5 und 6 wurde das *grpE* Transkript aus dem Ansatz von Spur 2 für 30 min bei 37 °C mit 377 ng/µl rekombinanten AmtR inkubiert. In Spur 5 ist im Vergleich zu den Spuren 2, 3 und 4 eine starke Abnahme der Bandenintensität auf der Laufhöhe des freien *grpE* Transkripts zu erkennen. Dafür kann eine Bande deutlich weiter oben im Gel detektiert werden, die bei den anderen Spuren nicht vorkommt. Diese Bande konnte nach mehrmaliger Durchführung des Versuchs sicher bestätigt werden. Hierbei handelt es sich um eine Retardation des *grpE* Transkripts durch das AmtR Protein. Nach Phenol-Extraktion des Ansatzes zur Entfernung des AmtR Proteins ist diese Bande nicht mehr vorhanden (Spur 6). Dafür ist die Bandenintensität auf der Laufhöhe des freien *grpE* Transkripts wieder vergleichbar mit den Spuren 3 und 4. Durch die Phenol-Extraktion wird die RNA freigesetzt und läuft wieder auf der erwarteten Höhe. Es konnte also nachgewiesen werden, dass das AmtR Protein unter *in vitro* Transkriptionsbedingungen in der Lage ist an RNA zu binden und eine Gel-Retardation induzieren kann.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die AmtR Charge keine RNase Aktivität aufweist. In Spur 5 ist die Abnahme der Bandenintensität auf der Höhe des freien *grpE* Transkripts nicht auf RNA Abbau zurückzuführen. Die RNA ist noch vorhanden und läuft als AmtR-RNA Komplex retardiert im Gel. Nach der Phenol-Extraktion läuft die RNA wieder frei im Gel (Spur 6), und die Bandenintensität der freien RNA ist vergleichbar mit der in Spur 3 und 4.

Bei allen folgenden *in vitro* Transkriptionsexperimenten, bei denen der Einfluss des potentiellen Regulatorproteins AmtR auf die Transkription untersucht werden sollte, wurden die Ansätze nach der Transkription und vor der Zugabe von Auftragspuffer einer Phenol-Extraktion unterzogen. Damit war sichergestellt, dass die gesamte RNA frei im Gel läuft und die Intensität der Banden vergleichbar ist um eine eventuelle Hemmung der Transkription durch AmtR zu detektieren. Außerdem wurde bei allen folgenden *in vitro* Transkriptionen und Gel-Retardationsexperimenten die in diesem Versuch negativ auf RNase Aktivität getestete AmtR Charge verwendet.

12.2 Wirkung des AmtR Proteins auf die *in vitro* Transkription

Es sollte der Einfluss des AmtR Proteins aus *Methanosarcina mazei* auf die *in vitro* Transkription des *glnK* Gens von *Methanosarcina mazei* untersucht werden. Der Transkriptionsstartpunkt des *glnK* Gens war bekannt, so dass ein Transkript mit einer Größe

von 149 nt erwartet wurde. Die verwendete *glnK*-DNA enthält die potentielle AmtR Bindungsstelle 495 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts. Als Kontroll-Gene wurden das tRNA^{Val} Gen von *Methanococcus vannielii* und das *grpE* Gen von *Methanosarcina mazei* gewählt. Die Transkriptionsstartpunkte dieser Gene waren ebenfalls bekannt, es wurden Transkripte mit einer Größe von 89 nt für das tRNA^{Val} Gen und 146 nt für das *grpE* Gen erwartet. Es handelt sich bei allen drei Transkripten um „run-off“ Transkripte. Die Werte der relativen Transkriptionsaktivität stellen die Mittelwerte aus den Daten zweier unabhängiger Experimente dar.

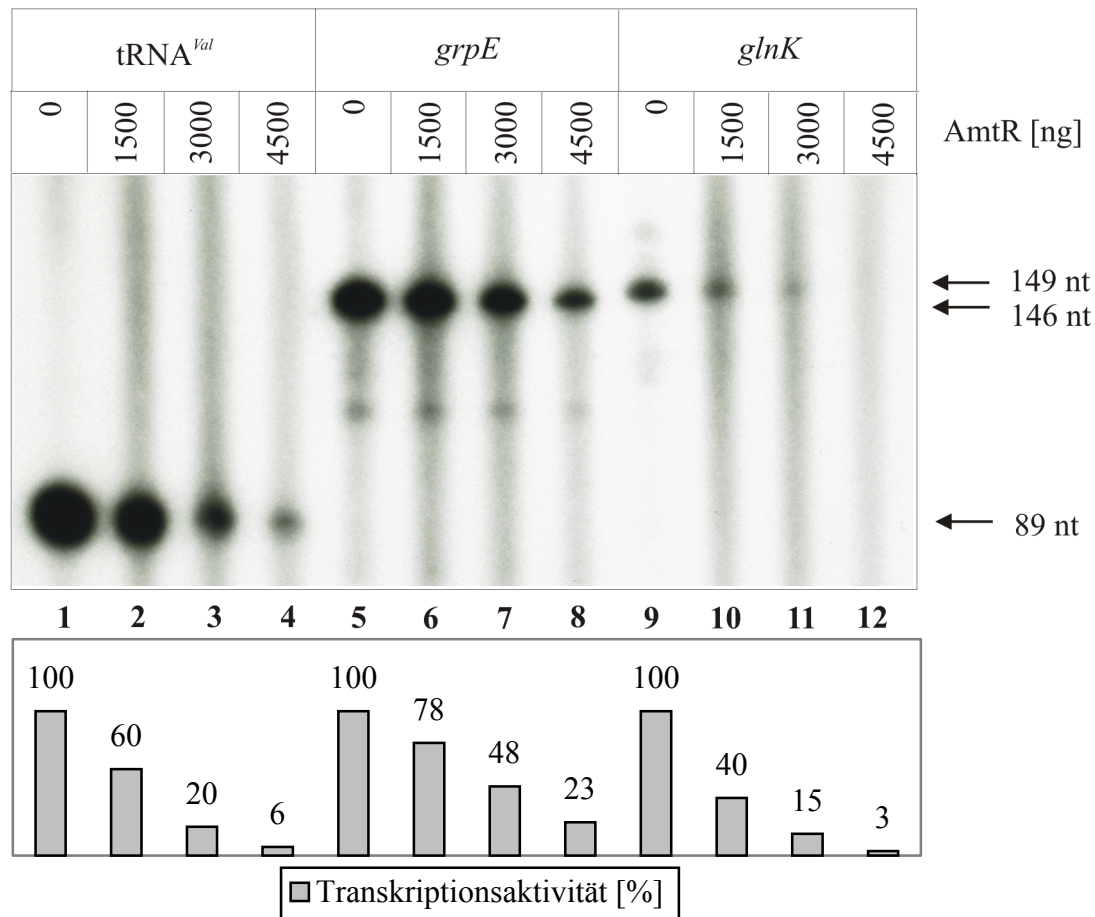


Abb. 20: Wirkung des AmtR Proteins auf die *in vitro* Transkription der Gene tRNA^{Val}, *grpE* und *glnK*
 Autoradiogramm eines 10%igen PA-Harnstoff-Gels. Spur 1 - 4: tRNA^{Val} von *Methanococcus vannielii*; Spur 5 – 8: *grpE* von *Methanosarcina mazei*; Spur 9 – 12: *glnK* von *Methanosarcina mazei*. Die Menge des eingesetzten AmtR ist über den Spuren angegeben. Es wurde jeweils ein Ausgleich mit dem Puffer in dem AmtR vorliegt durchgeführt, so dass die Ansätze bis auf die AmtR Menge identisch waren. Die Größe der Transkripte wird durch Pfeile angezeigt. Das Diagramm unter den Spuren gibt die relative Transkriptionsaktivität in Abhängigkeit von der AmtR Menge an, wobei die Werte für die Spuren ohne AmtR jeweils gleich 100% gesetzt werden.

In Spur 9 – 12 der Abb. 20 wird die Wirkung einer steigenden Menge AmtR auf die *in vitro* Transkription des *glnK* Gens von *Methanosarcina mazei* gezeigt. Bereits beim Einsatz von 1500 ng AmtR ist ein deutlicher Hemmeffekt zu beobachten. Die relative Transkriptionsrate beträgt nur noch 40%. Beim Einsatz von 3000 ng AmtR beträgt die relative Transkriptionsrate noch 15% und der Einsatz von 4500 ng AmtR führt zur fast vollständigen Hemmung der Transkription mit einem Wert für die relative Transkriptionsrate von 3%.

In Spur 1 – 4 ist zu erkennen, dass AmtR auch die *in vitro* Transkription des tRNA^{Val} Gens von *Methanococcus vanniellii* hemmt. Bei 1500 ng AmtR beträgt die relative Transkriptionsrate 60%, bei 3000 ng AmtR 20% und bei 4500 ng AmtR 6%. Es ist zwar deutlich eine Hemmung zu beobachten, aber der Hemmeffekt ist nicht so ausgeprägt wie beim *glnK* Gen.

Der Einfluss von AmtR auf die *in vitro* Transkription des *grpE* Gens von *Methanosarcina mazei* ist in den Spuren 5 – 8 dargestellt. Durch den Einsatz von 1500 ng AmtR sinkt die relative Transkriptionsaktivität auf 78%. Bei 3000 ng AmtR ist mit 48% fast nur noch die Hälfte der relativen Transkriptionsaktivität gegeben und bei 4500 ng AmtR sind es noch 23%. Der Hemmeffekt von AmtR auf die *in vitro* Transkription des *grpE* Gens ist zwar vorhanden, aber viel geringer als beim *glnK* Gen.

Der bei allen drei Genen beobachtete Effekt ist eindeutig auf eine Hemmung der Transkription zurückzuführen. Eine RNase Aktivität der AmtR Charge konnte mit dem zuvor beschriebenen Versuch ausgeschlossen werden. Die RNA läuft auch frei im Gel, da vor dem Auftrag auf das Gel eine Phenolextraktion durchgeführt wurde. Es ist also ebenfalls ausgeschlossen, dass eine Teilmenge des Transkripts mit AmtR retardiert im Gel läuft. Eine spezifische Hemmung der *in vitro* Transkription des *glnK* Gens konnte aber nicht eindeutig gezeigt werden, da auch die Transkription der beiden als Kontrolle gedachten Gene tRNA^{Val} und *grpE* gehemmt wird. Auch die *in vitro* Transkription der Gene *16S rRNA*, *gdh*, *hsp20* und *aaa⁺ atpase* von *Pyrococcus furiosus* wird durch AmtR inhibiert (Daten nicht gezeigt).

12.3 Einfluss verschiedener Vorinkubationen auf die *in vitro* Transkription des *glnK* Gens

Es sollte geklärt werden, ob eine Vorinkubation der DNA mit AmtR die Reprimierung der *in vitro* Transkription des *glnK* Gens von *Methanosarcina mazei* verstärkt bzw. ob eine Vorinkubation der DNA mit TBP, TFB und der RNA-Polymerase den Hemmeffekt verringert. Außerdem sollte der Einfluss einer Vorinkubation der DNA mit TBP und TFB und einer anschließenden Vorinkubation mit AmtR vor der Zugabe der RNA-Polymerase auf die *in vitro* Transkription des *glnK* Gens untersucht werden. Dies wurde durchgeführt, um zu betrachten, ob AmtR die Anlagerung der RNA-Polymerase an den DNA-TBP-TFB Komplex behindert. Es werden die relativen Transkriptionsraten der drei Versuchslinien miteinander verglichen, um eine stärkere oder geringere Inhibierung der *in vitro* Transkription zu ermitteln. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen könnten Hinweise auf den Ort der Bindung des AmtR Proteins liefern. Als Matrize diente die auch im vorigen Versuch verwendete *glnK*-DNA, welche die Sequenz der potentiellen AmtR Bindungsstelle 495 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts enthält.

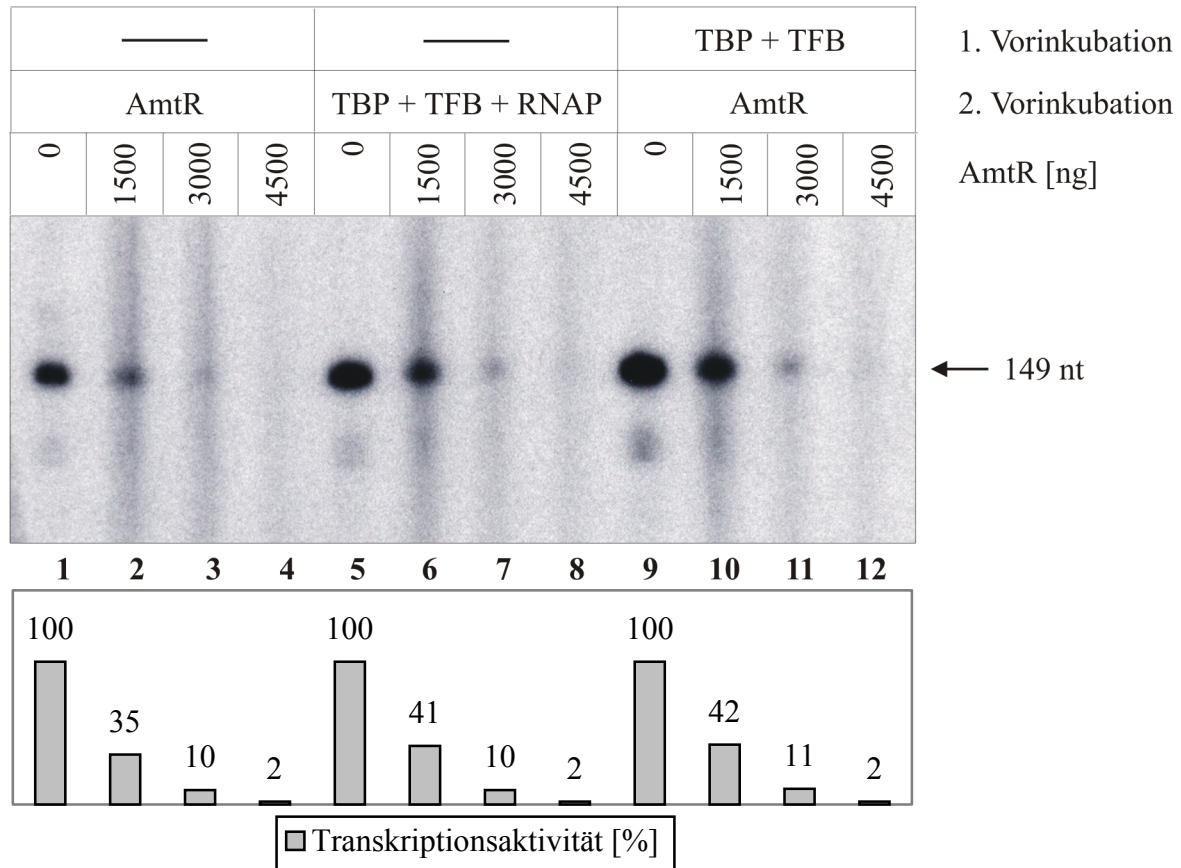


Abb. 21: Einfluss einer Vorinkubation der DNA mit AmtR oder Proteinen des Transkriptionsapparates auf die *in vitro* Transkription des *glnK* Gens von *Methanosarcina mazei*

Autoradiogramm eines 10%igen PA-Harnstoff-Gels. Die Menge des eingesetzten AmtR ist über den Spuren angegeben. Es wurde jeweils ein Ausgleich mit dem Puffer in dem AmtR vorliegt durchgeführt, so dass die Ansätze bis auf die AmtR Menge identisch waren. Direkt darüber ist angegeben, welche Proteine bei der ersten und anschließenden zweiten Vorinkubation zur DNA zugegeben wurden. Die Vorinkubationen erfolgten jeweils 10 min bei 37 °C. Die Größe des Transkripts wird durch einen Pfeil angezeigt. Das Diagramm unter den Spuren gibt die relative Transkriptionsaktivität in Abhängigkeit von der AmtR Menge an, wobei die Werte für die Spuren ohne AmtR jeweils gleich 100% gesetzt werden.

In den Spuren 1 - 4 der Abb. 21 sind die Auswirkungen einer Vorinkubation der DNA mit verschiedenen AmtR Mengen auf die *in vitro* Transkription des *glnK* Gens von *Methanosarcina mazei* zu betrachten. Die relative Transkriptionsrate sinkt bei Zugabe von 1500 ng AmtR auf 35%, bei 3000 ng AmtR auf 10% und bei 4500 ng AmtR auf 2%. Der Effekt einer Vorinkubation der DNA mit TBP, TFB und RNA-Polymerase auf die *in vitro* Transkription dieses Gens mit unterschiedlichen AmtR Mengen ist in den Spuren 5 – 8 dargestellt. Die relative Transkriptionsrate beträgt bei 1500 ng AmtR 41%, bei 3000 ng AmtR 10% und bei 4500 ng AmtR 2%. Es fällt auf, dass die Werte der relativen Transkriptionsrate sehr ähnlich zu den Werten von Spur 1 – 4 sind. Die Spuren 9 – 12 zeigen den Einfluss einer Vorinkubation der DNA mit TBP und TFB und einer anschließenden zweiten Vorinkubation bei der zusätzlich unterschiedliche AmtR Mengen im Ansatz vorhanden sind auf die *in vitro* Transkription von *glnK*. Die Werte für die relative Transkriptionsrate betragen bei 1500 ng AmtR 42%, bei 3000 ng AmtR 11% und bei 4500 ng AmtR 2%. Die bei den drei Versuchslinien ermittelten Werte für die relative Transkriptionsrate differieren kaum. Das molare Verhältnis von DNA zu AmtR war identisch mit den Werten des vorigen Versuchs, und es ist zu erkennen, dass die Werte der relativen Transkriptionsraten aller drei Versuchsreihen sehr ähnlich zu den im vorigen Versuch ermittelten Werten für *glnK* sind.

Es konnte gezeigt werden, dass AmtR wahrscheinlich nicht spezifisch an den Promotor des *glnK* Gens von *Methanosarcina mazei* bindet. Wenn AmtR an die Promotorregion des *glnK* Gens binden würde, könnte man erwarten, dass die Hemmung der *in vitro* Transkription nach Vorinkubation mit AmtR stärker ausgeprägt ist als nach Vorinkubation mit TBP, TFB und der RNA-Polymerase. Außerdem wird durch AmtR vermutlich nicht die Anlagerung der RNA-Polymerase an den DNA-TBP-TFB Komplex, zur Ausbildung des vollständigen Präinitiationskomplexes, behindert. Die Vorinkubation mit TBP und TFB ermöglichte die Ausbildung des DNA-TBP-TFB Komplexes, wenn AmtR sich an diesen Komplex anlagern würde oder an die DNA in der Nähe dieses Komplexes bindet und dadurch die Anlagerung der RNA-Polymerase behindert, müssten die Werte für die relative Transkriptionsaktivität niedriger sein als bei Vorinkubation mit TBP, TFB und RNA-Polymerase, da sich dort schon ein vollständiger Präinitiationskomplex ausbilden konnte.

12.4 Gel-Retardation mit unterschiedlichen AmtR Mengen

In *in vitro* Transkriptionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass AmtR die Transkription inhibiert. Um die Funktionsweise von AmtR zu untersuchen, wurden Gel-Retardationsexperimente durchgeführt. Mit Gel-Retardationsexperimenten können die Bindungseigenschaften von Proteinen an Nukleinsäuren untersucht werden. Das Laufverhalten der Nukleinsäure in der Gelmatrix wird durch gebundene Proteine verändert. Je mehr Proteine an die Nukleinsäure gebunden sind, desto stärker wird die Nukleinsäure in ihrem Laufverhalten retardiert. Mit diesem Versuch sollte der Einfluss des AmtR Proteins auf die Bindung von TBP und TFB an den Promotor des *glnK* Gens von *Methanosarcina mazei* untersucht werden. Die Abb. 22. zeigt das Ergebnis des Experiments.

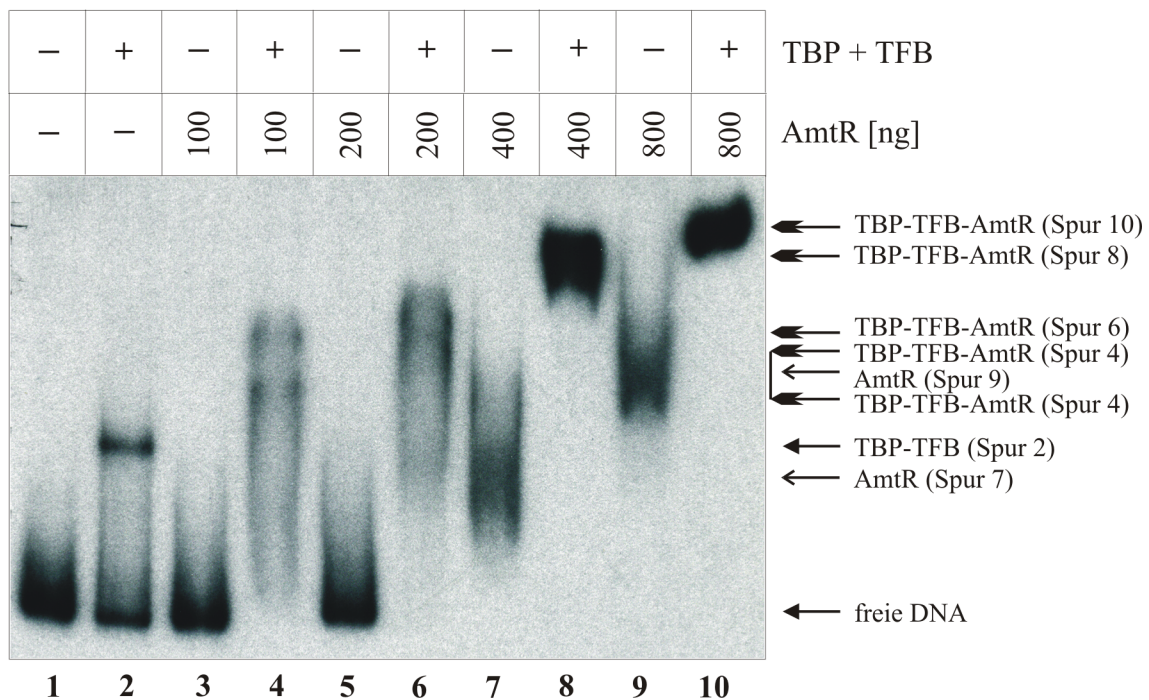


Abb. 22: Einfluss von unterschiedlichen AmtR Mengen auf das Laufverhalten der DNA und des DNA-TBP-TFB Komplexes

Autoradiogramm eines 5%igen nativen PA-Gels. Die eingesetzte Menge AmtR ist direkt über den Spuren angegeben. Darüber wird im Versuchsansatz vorhandenes TBP (1740 ng) und TFB (224 ng) mit einem „+“

angezeigt. Es wurde jeweils ein Ausgleich mit den Puffern in denen TBP, TFB und AmtR vorliegen durchgeführt, so dass die Ansätze bis auf die eingesetzten Proteine identisch waren. Die auf dem Autoradiogramm sichtbare freie DNA und die DNA-Protein Komplexe sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Das Gel-Retardationsexperiment wurde mit einem radioaktiv markierten PCR-Produkt durchgeführt, dass die Region von Position - 570 bis + 53 des *glnK* Gens von *Methanosarcina mazei* enthält. Die potentielle AmtR Bindungsstelle 495 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts ist also vorhanden.

In Spur 1 ist als Kontrolle nur freie DNA ohne Proteine aufgetragen worden. Bei den Spuren 3, 5, 7 und 9 ist in den Ansätzen eine zunehmende Menge AmtR vorhanden. Bei 100 ng AmtR (Spur 3) und 200 ng AmtR (Spur 5) läuft die DNA noch nicht retardiert im Gel. Bei 400 ng AmtR (Spur 7) ist eine Retardation zu erkennen, und bei 800 ng AmtR (Spur 9) ist eine noch stärkere Retardation zu detektieren. Es wird in Spur 7 jedoch keine diskrete Bande ausgebildet, sondern die Bande zieht sich über einen weiten Bereich hin. Dies ist vermutlich dadurch zu erklären, dass eine unterschiedliche Anzahl von AmtR Molekülen an die DNA gebunden hat. Wenn größere Mengen AmtR eingesetzt werden (Spur 9 und Abb. 23, Spur 3) wird die Bande diskreter und läuft mit zunehmender AmtR Menge höher im Gel. Es wurde in einem weiteren Experiment in 1000 ng Schritten bis zu 9000 ng AmtR eingesetzt und es war eine zunehmende Retardation mit diskreten Banden zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

In Spur 2 ist zusätzlich zur freien DNA der DNA-TBP-TFB Komplex zu erkennen. Bei den Ansätzen von Spur 4, 6, 8 und 10 war außerdem eine zunehmende Menge AmtR im Bindungsansatz vorhanden. In diesen Spuren ist der DNA-TBP-TFB Komplex nicht mehr zu detektieren und außerdem ist keine freie DNA mehr vorhanden. Es erscheint eine Bande höheren Molekulargewichts, die mit zunehmender AmtR Menge höher im Gel läuft. Diese Bande läuft jeweils höher als der DNA-AmtR Komplex, womit nachgewiesen ist, dass es sich hierbei tatsächlich um den DNA-TBP-TFB-AmtR Komplex und nicht um einen DNA-AmtR Komplex handelt. Der DNA-TBP-TFB Komplex ist vollständig retardiert durch die zusätzliche Bindung von AmtR.

In Spur 4 ist eine Doppelbande zu beobachten. Hierbei handelt es sich vermutlich um DNA-TBP-TFB-AmtR Komplexe mit einer unterschiedlichen Anzahl von AmtR Molekülen. Um einen DNA-TBP-TFB-AmtR Komplex und um einen DNA-AmtR Komplex kann es sich hierbei nicht handeln, da die in diesem Ansatz eingesetzte Menge AmtR noch keinen DNA-AmtR Komplex ausbildet.

12.5 Einfluss von Vorinkubationen auf die Gel-Retardation mit AmtR

Es sollte untersucht werden, ob eine Vorinkubation der DNA mit TBP und TFB die Bindung von AmtR beeinflusst bzw. ob eine Vorinkubation der DNA mit AmtR die Bindung von TBP und TFB beeinflusst. In Abb. 23 ist das Ergebnis der verschiedenen Vorinkubationen mit anschließendem Gel-Retardationsexperiment dargestellt.

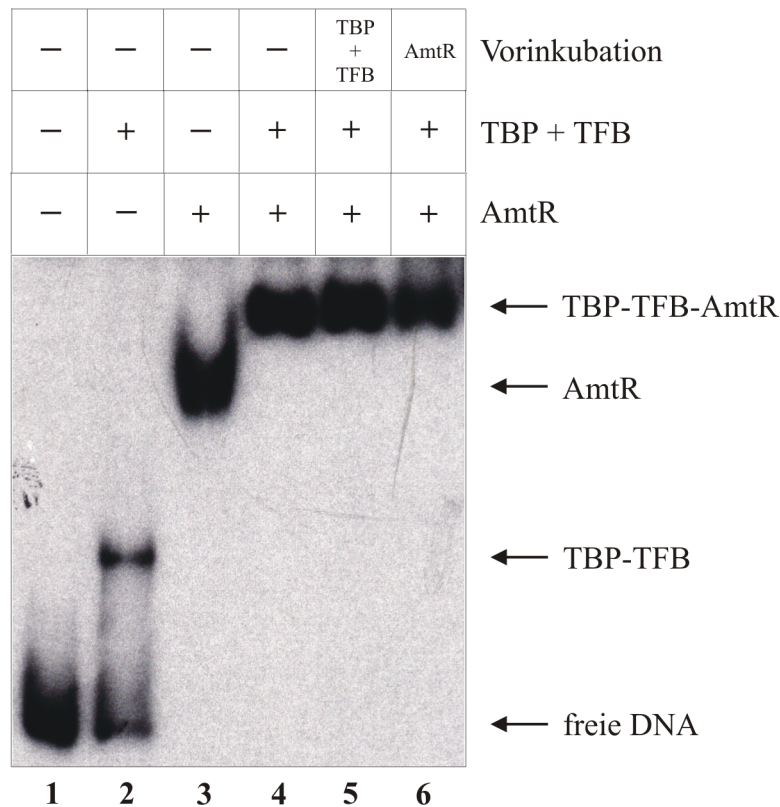


Abb. 23: Einfluss einer Vorinkubation der DNA mit TBP und TFB oder AmtR auf die Ausbildung der Komplexe

Autoradiogramm eines 5%igen nativen PA-Gels. Im Versuchsansatz vorhandene Proteine werden über den Spuren mit einem „+“ angezeigt (TBP 1740 ng, TFB 224 ng, AmtR 2000 ng). Es wurde jeweils ein Ausgleich mit den Puffern in denen TBP, TFB und AmtR vorliegen durchgeführt, so dass die Ansätze bis auf die eingesetzten Proteine identisch waren. Darüber ist angegeben mit welchen Proteinen 15 min bei 37 °C vorinkubiert wurde. Die auf dem Autoradiogramm sichtbare freie DNA und die DNA-Protein Komplexe sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Das Gel-Retardationsexperiment wurde mit einem radioaktiv markierten PCR-Produkt durchgeführt, dass die Region von Position – 570 bis + 53 des *glnK* Gens von *Methanosarcina mazei* enthält. Die potentielle AmtR Bindungsstelle 495 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts ist also vorhanden.

In Spur 1 ist als Kontrolle nur freie DNA ohne Proteine aufgetragen worden. In Spur 2 ist der DNA-TBP-TFB Komplex zu erkennen und in Spur 3 ist der DNA-AmtR Komplex dargestellt. Bei den Ansätzen von Spur 4, 5 und 6 war TBP, TFB und AmtR im Bindungsansatz enthalten. Bei Spur 4 erfolgte die Zugabe von TBP, TFB und AmtR zum Ansatz gleichzeitig, bei Spur 5 wurde die DNA mit TBP und TFB vorinkubiert vor der Zugabe von AmtR und bei Spur 6 wurde die DNA mit AmtR vorinkubiert vor der Zugabe von TBP und TFB. In den Spuren 4, 5 und 6 ist eine Bande höheren Molekulargewichts zu erkennen als in Spur 2 (DNA-TBP-TFB Komplex) und Spur 3 (DNA-AmtR Komplex), es handelt sich hierbei also um einen DNA-TBP-TFB-AmtR Komplex. Der DNA-TBP-TFB-AmtR Komplex in den Spuren 4, 5 und 6 läuft annähernd auf gleicher Höhe. Die Reihenfolge der Zugabe der einzelnen Proteine ist also unerheblich für die Anzahl der gebundenen AmtR Moleküle im DNA-TBP-TFB-AmtR Komplex.

Es wurden die gleichen Vorinkubationsversuche mit 100 ng, 200 ng, 400 ng und 800 ng AmtR durchgeführt um den Einfluss einer Vorinkubation mit geringerer AmtR Menge auf die Ausbildung der Komplexe zu untersuchen (Daten nicht gezeigt). Es konnten dabei übereinstimmende Beobachtungen zu dem präsentierten Versuch gemacht werden. Eine Vorinkubation mit TBP und TFB behindert nicht die Bindung von AmtR und eine

Vorinkubation mit AmtR behindert nicht die Bindung von TBP und TFB. Die verschiedenen Vorinkubationen führen zur Bildung von identischen DNA-TBP-TFB-AmtR Komplexen.

12.6 Nachweis eines DNA-TBP-AmtR Komplexes und AmtR induzierte Gel-Retardation mit unterschiedlicher DNA

Es sollte der Einfluss von AmtR auf das Laufverhalten der DNA, des DNA-TBP-TFB Komplexes und des DNA-TBP-TFB-RNA-Polymerase Komplexes in Abhängigkeit von unterschiedlicher DNA untersucht werden. Außerdem wird die Ausbildung eines DNA-TBP-AmtR Komplexes nachgewiesen.

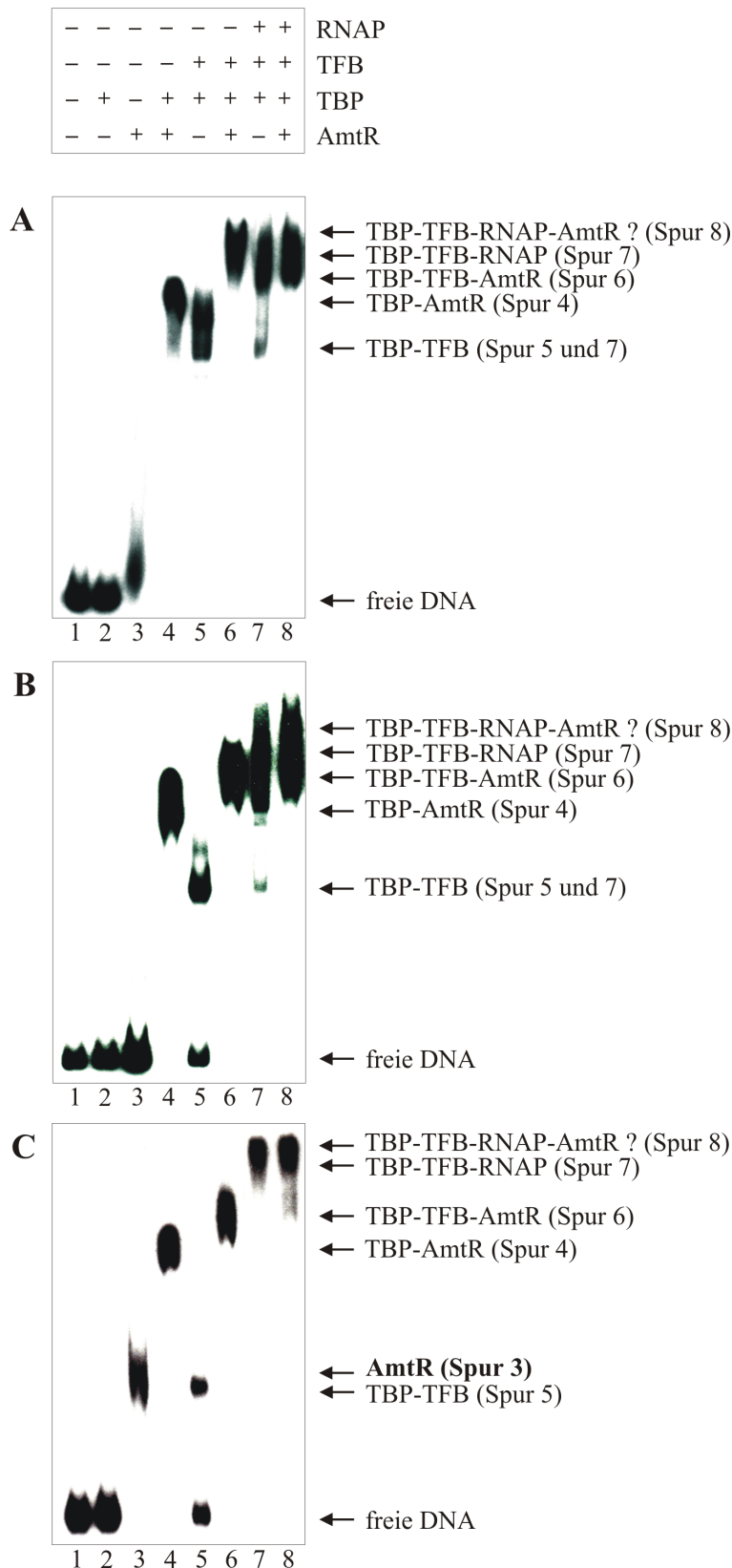


Abb. 24: Einfluss von AmtR auf das Laufverhalten der DNA, des DNA-TBP-TFB Komplexes, des DNA-TBP-TFB-RNA-Polymerase Komplexes und Nachweis eines DNA-TBP-AmtR Komplexes

Autoradiogramme von 5%igen nativen PA-Gelen. Im Versuchsansatz vorhandene Proteine werden in der Tabelle über den Spuren mit einem „+“ angezeigt (RNAP 400 ng, TFB 224 ng, TBP 1500 ng, AmtR 400 ng). Das Auftragschema der Gele war einheitlich, so dass die Tabelle für alle drei Autoradiogramme Anwendung findet. Es wurde jeweils ein Ausgleich mit den Puffern in denen die RNA-Polymerase, TFB, TBP und AmtR vorliegen durchgeführt, so dass die Ansätze bis auf die eingesetzten Proteine identisch waren. Die auf den Autoradiogrammen sichtbare freie DNA und die DNA-Protein Komplexe sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

A: Das verwendete radioaktiv markierte PCR-Produkt enthielt die Region von Position - 173 bis + 129 des *grpE* Gens von *Methanosarcina mazei*.

B: Das verwendete radioaktiv markierte PCR-Produkt enthielt die Region von Position - 138 bis + 53 des *glnK* Gens von *Methanosarcina mazei*. Die potentielle AmtR Bindungsstelle 495 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts ist also nicht vorhanden.

C: Das verwendete radioaktiv markierte PCR-Produkt enthielt die Region von Position - 570 bis + 53 des *glnK* Gens von *Methanosarcina mazei*. Die potentielle AmtR Bindungsstelle 495 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts ist also vorhanden.

In Spur 1 ist jeweils freie DNA zu erkennen. In den Ansätzen der Spur 3 ist jeweils zusätzlich zur DNA auch AmtR im Bindungsansatz vorhanden. In Abb. 24A ist eine leichte Retardation der *grpE*-DNA in Spur 3 zu erkennen. In Spur 3 von Abb. 24B ist keine Retardation zu detektieren und in Spur 3 von Abb. 24C ist eine deutliche Retardation festzustellen. Bei der gleichen Menge AmtR wird die untersuchte DNA also eindeutig unterschiedlich retardiert.

Dies weist auf eine spezifische Bindung von AmtR an die *glnK*-DNA mit der potentiellen AmtR Bindungsstelle 495 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts hin.

In den Ansätzen der Spur 2 ist jeweils zusätzlich zur DNA auch TBP im Bindungsansatz vorhanden. Es kann keine Retardation der untersuchten drei unterschiedlichen DNAs festgestellt werden. Es ist jeweils nur die freie DNA zu beobachten. TBP ist also nicht in der Lage eine Retardation zu erzeugen. In der Spur 4 wurde jeweils der Ansatz aufgetragen, der TBP und AmtR zusätzlich zur DNA enthielt. Auf allen drei Autoradiogrammen ist eine deutliche Retardation zu detektieren. Es ist jeweils keine freie DNA mehr zu erkennen, sondern eine Bande deutlich höheren Molekulargewichts. TBP und AmtR sind also, unabhängig von der untersuchten DNA, gemeinsam in der Lage eine Retardation zu induzieren, obwohl TBP allein (Spur 2) und AmtR allein mit der *grpE*-DNA (Abb. 24A, Spur 3) und der *glnK*-DNA ohne AmtR Bindungsstelle (Abb. 24B, Spur 3) dies nicht vermögen.

In der Spur 5 ist jeweils der DNA-TBP-TFB Komplex dargestellt. In Spur 6 wurden die Ansätze, die zusätzlich zur DNA, TBP und TFB auch AmtR enthielten aufgetragen. Es ist jeweils nur der DNA-TBP-TFB-AmtR Komplex zu erkennen. Freie DNA, DNA-AmtR Komplexe oder DNA-TBP-TFB Komplexe können nicht nachgewiesen werden. Der DNA-TBP-TFB Komplex ist vollständig retardiert durch die zusätzliche Bindung von AmtR. Es ist außerdem festzustellen, dass der DNA-TBP-TFB-AmtR Komplex in Spur 6 jeweils höher im Gel läuft, als der DNA-TBP-AmtR Komplex jeweils in Spur 4. Dies zeigt, dass der DNA-TBP-TFB-AmtR Komplex in Spur 6 tatsächlich TFB enthält.

Die Ansätze, die jeweils in Spur 7 aufgetragen wurden, enthielten zusätzlich zur DNA, TBP und TFB auch RNA-Polymerase. Bei den Ansätzen, die jeweils in Spur 8 aufgetragen wurden, war weiterhin noch AmtR enthalten. In Abb. 24A und 24B sind in der Spur 7 jeweils der DNA-TBP-TFB-RNA-Polymerase Komplex und der DNA-TBP-TFB Komplex zu erkennen. Die Bande des DNA-TBP-TFB Komplexes weist allerdings eine wesentlich geringere Intensität auf als in Spur 5, weil ein Großteil des DNA-TBP-TFB Komplexes durch die zusätzlich gebundene RNA-Polymerase retardiert ist. In Abb. 24C ist in Spur 7 kein DNA-TBP-TFB Komplex mehr zu erkennen, der DNA-TBP-TFB Komplex läuft durch die zusätzlich gebundenen RNA-Polymerase vollständig retardiert. Wenn auch noch AmtR im Ansatz vorhanden ist (Spur 8), ist keine eindeutige weitere Retardation zu beobachten. Lediglich in Abb. 24B läuft die Bande in Spur 8 etwas höher als in Spur 7. Allerdings ist in Abb. 24A und 24B der in Spur 7 noch mit schwacher Intensität erkennbare DNA-TBP-TFB Komplex nicht mehr vorhanden. Es wäre möglich, dass der DNA-TBP-TFB Komplex mit AmtR retardiert ist und einen DNA-TBP-TFB-AmtR Komplex formiert hat. Da dieser Komplex bei den Versuchen A und B nahezu auf gleicher Höhe im Gel läuft wie der DNA-TBP-TFB-RNA-Polymerase Komplex, sind diese auf den Autoradiogrammen nicht zu unterscheiden. Außerdem ist eventuell die Differenz des Molekulargewichts zwischen DNA-TBP-TFB-RNA-Polymerase Komplex und DNA-TBP-TFB-RNA-Polymerase-AmtR Komplex zu gering, um im Gel zwei Banden unterschiedlicher Laufhöhe zu detektieren. Es muss auch darauf hingewiesen werden, dass auf den Originaldaten in Abb. 24A und 24B in Spur 7 und Spur 8 bei genauer Betrachtung eine Doppelbande zu erkennen war. Diese entsteht vermutlich aufgrund unspezifischer Bindung der RNA-Polymerase an die DNA. Ebenso ist in Abb. 24B in Spur 6 im Original eine Doppelbande zu sehen, vermutlich aufgrund multipler AmtR Bindung.

Es geht also aus Spur 8 der Abb. 24A und 24B nicht eindeutig hervor, ob AmtR an den DNA-TBP-TFB-RNA-Polymerase Komplex binden kann und es sich damit um einen DNA-TBP-TFB-RNA-Polymerase-AmtR Komplex handelt. Es wäre auch möglich, dass es sich um einen

DNA-TBP-TFB-AmtR Komplex, wie in Spur 6 handelt, und damit AmtR die Bindung der RNA-Polymerase verhindert. In der Spur 8 der Abb. 24C kann man erkennen, dass AmtR anscheinend die Anlagerung der RNA-Polymerase nicht behindert, da die Bande auf der gleichen Höhe, wie in Spur 7 ohne AmtR läuft, und nicht auf der Höhe des bei dieser DNA niedriger laufenden DNA-TBP-TFB-AmtR Komplexes (Spur 6). Aber auch hier bleibt unklar, ob AmtR an den DNA-TBP-TFB-RNA-Polymerase Komplex gebunden hat.

12.7 Native PA-Gelelektrophorese zur Prüfung auf Protein-Protein Interaktion zwischen AmtR und TBP

In Gel-Retardationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass AmtR und TBP zusammen an DNA binden, während die beiden Proteine dazu bei den eingesetzten Mengen jeweils einzeln nicht in der Lage waren. Es sollte nun untersucht werden, ob zwischen den Proteinen AmtR und TBP von *Methanosarcina mazei* bereits in Lösung ohne DNA eine Interaktion stattfindet. Dazu wurden 4900 ng AmtR und 2500 ng TBP einzeln und zusammen für 30 min bei 37 °C in Transkriptionspuffer mit 10% Glycerin inkubiert. Das molare Verhältnis von TBP zu AmtR betrug 1:1,96. Zur Analyse wurden die Ansätze auf einem nativen PA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

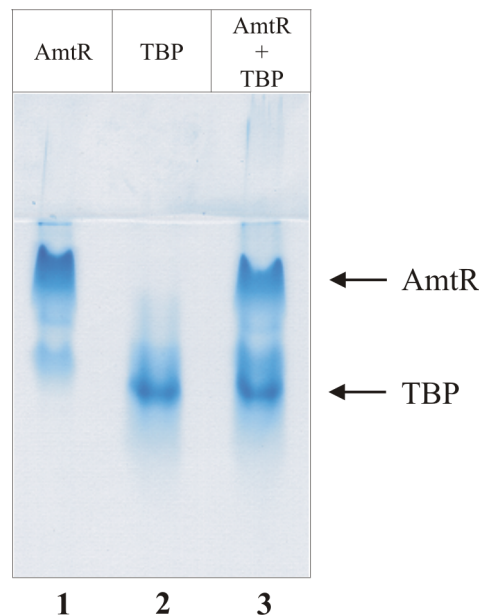


Abb. 25: Native PA-Gelelektrophorese mit *Methanosarcina mazei* AmtR und TBP

16,7%iges mit Coomassie-Blau gefärbtes natives PA-Gel. Über dem Trenngel ist das 6,7%ige Sammelgel zu erkennen. Im Versuchsansatz vorhandene Proteine sind über den Spuren angegeben. Die Position von AmtR und TBP im Gel wird durch Pfeile angezeigt.

In Spur 1 der Abb. 25 ist zu beobachten auf welcher Höhe im Gel AmtR allein läuft und in Spur 2 ist zu erkennen auf welcher Höhe im Gel TBP allein läuft. Bei gemeinsamer Inkubation von AmtR und TBP sind zwei Banden zu detektieren (Spur 3). Die untere Bande läuft auf der gleichen Höhe im Gel wie die TBP-Bande in Spur 2. Die untere Bande in Spur 3 stellt also frei im Gel laufendes TBP dar. Die untere Begrenzung der oberen Bande in Spur 3 läuft auf der gleichen Höhe im Gel wie bei der AmtR-Bande in Spur 1. Die obere Begrenzung der oberen Bande in Spur 3 läuft etwas tiefer im Gel als bei der AmtR-Bande in Spur 1. Die

obere Bande in Spur 3 ist also gestauchter als die AmtR-Bande in Spur 1, stellt aber trotz dieses kleinen Unterschieds frei im Gel laufendes AmtR dar. Wenn die obere Bande in Spur 3 einen AmtR-TBP Komplex darstellen würde, müsste die Intensität der unteren TBP-Bande in Spur 3 schwächer werden. Dies ist aber nicht der Fall. In Spur 3 kann weiterhin keine zusätzliche Bande, die einen AmtR-TBP Komplex darstellen könnte, detektiert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass AmtR und TBP von *Methanosarcina mazei* nach gemeinsamer Inkubation frei in einem nativen PA-Gel laufen und kein zusätzlicher AmtR-TBP Komplex zu detektieren ist. Es findet also keine AmtR-TBP Interaktion in Lösung ohne DNA statt.

IV Diskussion

Über die Transkription der Archaea sind mittlerweile viele Studien durchgeführt worden. Dabei wurde insbesondere die spezifische Initiation der Transkription ausgiebig untersucht. Es stellte sich heraus, dass die beteiligten Komponenten zu dem eukaryellen RNA-Polymerase II System eine große Sequenzübereinstimmung besitzen und daraus folgernd auch ein ähnlicher Mechanismus besteht, während zu den Bacteria hingegen überraschend wenig Ähnlichkeiten gefunden wurden (THOMM, 1996; BELL & JACKSON, 1998a; SOPPA, 1999b). Vor allem die Entwicklung zellfreier Transkriptionssysteme ermöglichte die Identifizierung der beteiligten Faktoren und sie leisteten auch eine große Hilfe bei der Aufklärung ihrer Funktion. In den letzten Jahren rückte zunehmend die Entschlüsselung der Regulation der Genexpression in den Mittelpunkt der archaeellen Transkriptionsforschung. Im Gegensatz zu den Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie werden die meisten potentiellen archaeellen Regulatoren dagegen als Homologe der Bacteria eingestuft (KYRPIDES & OUZOUNIS, 1999; ARAVIND & KOONIN, 1999). Auch bei der Analyse der an der Regulation der Transkription beteiligten Proteine spielen *in vitro* Transkriptionssysteme eine große Rolle. Um die Regulation der Genexpression bei *Methanosarcina mazei* zu untersuchen wurde daher zunächst ein zellfreies Transkriptionssystem erstellt.

1 Aufbau des *in vitro* Transkriptionssystems

Zur Erstellung des *in vitro* Transkriptionssystems waren die beiden essentiellen archaeellen Transkriptionsfaktoren TBP und TFB, RNA-Polymerase, eine geeignete DNA-Matrize, Ribonukleosidtriphosphate und praktikable Pufferbedingungen erforderlich. Die Sequenzen der *tbp* und *tfb* Gene von *Methanosarcina mazei* waren nicht bekannt, weshalb die Gene zunächst in genomischer DNA identifiziert werden mussten, um sie in *E. coli* zu klonieren und anschließend rekombinantes Protein herzustellen. Die Charakterisierung der Gensequenzen mit der Analyse der Promotor und Terminationssignale erfolgte bereits bei der Präsentation der Sequenzen im Ergebnisteil, weshalb hier nur auf die abgeleitete Aminosäuresequenz eingegangen wird.

Die ermittelte Sequenz des *tbp* Gens von *Methanosarcina mazei* S-6 kodiert ein Protein mit 183 Aminosäuren. Die Größe des *Methanosarcina mazei* TBP Proteins liegt damit im Bereich anderer archaeeller TBP Proteine, die 181 bis 222 Aminosäuren aufweisen. Dabei liegt die Größe des TBP aller methanogenen Archaea im unteren angegebenen Bereich. Auch der berechnete isoelektrische Punkt des Proteins von 4,7 ist ähnlich dem anderer archaeeller TBP Proteine, die einen durchschnittlichen isoelektrischen Punkt von 4,9 aufweisen. Die eukaryellen Homologe besitzen hingegen einen deutlich höheren isoelektrischen Punkt (THOMSEN et al., 2001). Das *Methanosarcina mazei* Molekül ist, wie alle archaeellen TBP Proteine, kleiner als die eukaryellen Homologe, die zusätzlich einen in Länge und Sequenz variablen N-terminalen Bereich aufweisen, der jedoch für die Funktion des Proteins nicht essentiell ist (ROWLANDS et al., 1994). Bei allen bisher bekannten archaeellen sowie im C-terminalen Abschnitt der eukaryellen TBP Sequenzen ist eine direkte Sequenzwiederholung festgestellt worden. Das archaeelle TBP besteht nur aus diesen zwei direkten Sequenzwiederholungen (SOPPA, 1999b). Diese direkten Sequenzwiederholungen konnten auch beim TBP von *Methanosarcina mazei* gefunden werden.

```

1  MESSIKIENVVASTKLAEEFDLTVIE..SEFEGA EYNKQKFPGLVYRVSDPKAAFLVFTSGKVVCTGTKNVADVHTVVGNLAKKLNSIGIKT 91
. : | : : | : || | | . | | | | | : : | | : | : || | . | | . | | . . . | : | :
92 IEDPQITVQNIIVASADLHTILNLNAIAIGLGLENIEYEPEQFPGLVYRIDEPKVVVLI FSSGKLVVAGGKSPEDCERSVEVVRQQLDSMGLL. 183

```

Abb. 26: Direkte Sequenzwiederholung des TBP von *Methanosarcina mazei* S-6

Der Sequenzvergleich zur Darstellung der direkten Sequenzwiederholung wurde mit dem Programm GAP (HUSAR 5.0, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) unter Verwendung der Standardeinstellungen durchgeführt. Ein vertikaler Strich zeigt Positionen mit identischen Aminosäuren in beiden Hälften des Moleküls an, ein Doppelpunkt markiert Positionen mit Aminosäuren ähnlicher Eigenschaften, ein Punkt gibt Positionen mit Aminosäuren entfernt ähnlicher Eigenschaften an und eine Lücke kennzeichnet Positionen mit einem nicht konservativen Aminosäureaustausch.

Die Abb. 26 zeigt die beim TBP von *Methanosarcina mazei* S-6 identifizierte direkte Sequenzwiederholung. Es ist deutlich zu erkennen, dass das TBP Protein aus zwei Domänen besteht, die je eine Hälfte des Moleküls umspannen und eine hohe Übereinstimmung zueinander aufweisen. Aus dem Vergleich der Sequenzwiederholungen ergibt sich eine Übereinstimmung von 36% der Aminosäuren in den beiden konservierten Domänen des Proteins. Bei Betrachtung der identischen und ähnlichen Aminosäuren ergibt sich sogar eine Deckung von 59%. Bei den archaeellen TBP Proteinen weisen die zwei Domänen mit durchschnittlich 42% eine höhere Sequenzübereinstimmung auf, als die zwei C-terminalen Domänen des eukaryellen TBP, die eine Sequenzübereinstimmung von ca. 24% besitzen (SOPPA, 1999b). Das TBP von *Methanosarcina mazei* besitzt mit 36% identischen Aminosäuren in den beiden Domänen einen ähnlichen Wert wie die archaeellen Homologe. Beim *Methanosarcina mazei* TBP sind außerdem fast alle Aminosäuren, die den Kontakt zur TATA-Box vermitteln konserviert (THOMSEN, 1998).

Das im Rahmen dieser Arbeit beschriebene und verwendete *tbp* Gen von *Methanosarcina mazei* S-6 wurde vor der Genomsequenzierung von *Methanosarcina mazei* Goel identifiziert, sequenziert und kloniert. Bei der später erfolgten Genomsequenzierung von *Methanosarcina mazei* Goel konnten dann drei unterschiedliche *tbp* Gene identifiziert werden (DEPPENMEIER et al., 2002). Die drei Proteine haben die Accession Numbers „Q8PY37“ (TBP1), „Q8PY36“ (TBP2) und „Q8PUZ4“ (TBP3). Das verwendete *Methanosarcina mazei* S-6 Protein repräsentiert TBP1 von *Methanosarcina mazei* Goel. Lediglich an Position 94 kommt bei *Methanosarcina mazei* Goel ein Asparagin-Rest statt eines Aspartat-Rests vor. Bei TBP2 von *Methanosarcina mazei* Goel sind 6% der Aminosäuren unterschiedlich zum verwendeten TBP von *Methanosarcina mazei* S-6. TBP3 weist 35% unterschiedliche Aminosäuren zum verwendeten *Methanosarcina mazei* S-6 TBP auf. Trotz der großen Anzahl unterschiedlicher Aminosäuren von TBP3 sind aber fast alle Aminosäuren, die den Kontakt des TBP zur TATA-Box vermitteln konserviert (Daten nicht gezeigt). Auf die mögliche Bedeutung der verschiedenen TBPs für die Genregulation wird später bei der Diskussion der Hitzeschockantwort eingegangen.

Bei der Genomsequenzierung von *Methanosarcina mazei* Goel konnte nur ein *tfb* Gen identifiziert werden (DEPPENMEIER et al., 2002). Die Aminosäuresequenz des TFB von *Methanosarcina mazei* S-6 ist identisch mit der Sequenz des TFB von *Methanosarcina mazei* Goel (Accession Number „Q977U3“). Das *tfb* Gen von *Methanosarcina mazei* S-6 kodiert ein Protein mit 337 Aminosäuren. Die Größe des *Methanosarcina mazei* TFB Proteins liegt damit im Bereich anderer archaeeller und eukaryeller TFB bzw. TFIIB Proteine, und auch der isoelektrische Punkt des Proteins von 9,6 ist ähnlich dem anderer archaeeller TFB Proteine (THOMSEN et al., 2001). Das *tfb* Gen von *Methanococcus jannaschii* bildet eine Ausnahme, es ist deutlich größer als die homologen Gene. Es enthält innerhalb der Sequenz für das TFB

Protein die Sequenz eines Inteins. Das reife TFB Protein von *Methanococcus jannaschii* hat mit 338 Aminosäuren aber eine typische Größe (Accession Number „Q58192“; BULT et al., 1996).

Archaeelle und eukaryelle TFB bzw. TFIIB Proteine besitzen in der Nähe des N-Terminus ein Zinkfinger-Motiv und in der Nähe des C-Terminus ein Helix-Turn-Helix-Motiv. Diese Motive sind hochkonserviert (LAGRANGE et al., 1998; BELL & JACKSON, 1998b; SOPPA, 1999b; ARAVIND & KOONIN, 1999; THOMSEN et al., 2001). Für das konservierte Helix-Turn-Helix-Motiv konnte gezeigt werden, dass es den Kontakt zum BRE vermittelt (LITTLEFIELD et al., 1999). Das TFB Protein von *Methanosarcina mazei* weist diese charakteristischen Motive an den entsprechenden Positionen ebenfalls auf. N-terminal konnte das Zinkfinger-Motiv CxxC-N₁₅-CxxC identifiziert werden und C-terminal wurde ein Helix-Turn-Helix-Motiv detektiert.

TBP und TFB von *Methanosarcina mazei* weisen die typischen Charakteristika ihrer archaeellen Homologe auf. Die phylogenetischen Stammbäume dieser Proteine verdeutlichen die geringe evolutive Distanz der *Methanosarcina mazei* Moleküle zu denen anderer Archaea. Die größte Übereinstimmung besteht jeweils zu *Archaeoglobus fulgidus*. Die Analyse der Sequenzen der klonierten Gene von *Methanosarcina mazei* zeigt, dass es sich bei den kodierten Proteinen um die beiden basalen archaeellen Transkriptionsfaktoren TBP und TFB handelt.

Nachdem die Sequenzanalyse typische Merkmale archaeeller TBP bzw. TFB Proteine offenbarte, wurde die funktionelle Aktivität der rekombinanten Proteine im *in vitro* Transkriptionssystem von *Methanococcus thermolithotrophicus* nachgewiesen (FREY et al., 1990; HAUSNER & THOMM, 1993). Es wurde gezeigt, dass beim Einsatz von *Methanosarcina mazei* TBP und TFB eine korrekte Initiation der Transkription mit effizienter Bildung spezifischer Transkripte stattfindet. Auch der Einsatz von *Methanosarcina mazei* TBP und *Methanococcus thermolithotrophicus* TFB bzw. *Methanococcus thermolithotrophicus* TBP und *Methanosarcina mazei* TFB ermöglichte eine spezifische Initiation der Transkription. Diese Austauschbarkeit verdeutlicht die hohe Konservierung der homologen Proteine. Auch für rekombinantes TBP von *Thermococcus celer* wurde schon gezeigt, dass es im *Methanococcus thermolithotrophicus in vitro* Transkriptionssystem in der Lage ist, TBP von *Methanococcus thermolithotrophicus* zu ersetzen (HAUSNER & THOMM, 1995). Sogar humanes TBP und TBP von Hefe können *Methanococcus thermolithotrophicus* TBP im zellfreien Transkriptionssystem dieses Archaeons ersetzen (WETTACH et al., 1995). Dies verdeutlicht nicht nur die domänenübergreifende Konservierung von TBP, sondern auch die Homologie des gesamten basalen Transkriptionsapparates. Während TBP von *Pyrococcus furiosus* im *in vitro* Transkriptionssystem von *Pyrococcus furiosus* gegen TBP von *Methanococcus thermolithotrophicus* austauschbar ist, kann TFB dieser Organismen nicht ausgetauscht werden (HETHKE et al., 1996). Für *Methanosarcina mazei* und *Methanococcus thermolithotrophicus* TFB konnte aber in dieser Arbeit auch deren Austauschbarkeit gezeigt werden.

Zur Erstellung eines homogenen *in vitro* Transkriptionssystems für *Methanosarcina mazei* wurde die RNA-Polymerase aus diesem Organismus gereinigt. Dies war zuvor schon versucht worden, wobei im TCA-Test eine unspezifische Aktivität festgestellt wurde, aber eine spezifische Aktivität im zellfreien Transkriptionssystem nicht vorhanden war. Es wurde vermutet, dass im letzten Reinigungsschritt, der Gelfiltration mit einer Superdex-200-Säule, eine Untereinheit der RNA-Polymerase abgetrennt worden war (NAJI, 2000). Deshalb wurde

die Reinigung der RNA-Polymerase während dieser Arbeit nur bis zu diesem Reinigungsschritt durchgeführt. Es ließ sich im TCA-Test auch eine unspezifische Aktivität der RNA-Polymerase nachweisen, aber die spezifische Transkription blieb trotz der Änderung verschiedener Parameter ohne Erfolg. Eine RNase-Aktivität der gereinigten Probe konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. Der Grund für die nicht vorhandene spezifische Aktivität der gereinigten RNA-Polymerase von *Methanosarcina mazei* blieb unklar.

Um die Genregulation von *Methanosarcina mazei in vitro* zu studieren war jedoch ein funktionelles zellfreies Transkriptionssystem erforderlich. Es wurde daher beschlossen die RNA-Polymerase von *Methanococcus thermolithotrophicus* zu verwenden. Für diese RNA-Polymerase war beim Nachweis der funktionellen Aktivität von *Methanosarcina mazei* TBP und TFB schon gezeigt worden, dass sie zu einer effizienten spezifischen Transkription mit den rekombinanten *Methanosarcina mazei* Transkriptionsfaktoren fähig ist. Die Untersuchungen zur Genregulation bei *Methanosarcina mazei* sollten bei 37 °C durchgeführt werden, da dies die optimale Wachstumstemperatur dieses Archaeons ist. Das Temperaturoptimum der RNA-Polymerase von *Methanococcus thermolithotrophicus* beträgt 55 °C (FREY et al., 1990; HAUSNER & THOMM, 1993), sie arbeitet aber auch bei 37 °C effizient, was nicht bei allen bisher untersuchten archaeellen RNA-Polymerasen der Fall ist. Die Bedingungen für die *in vitro* Transkription mit *Methanococcus thermolithotrophicus* RNA-Polymerase und *Methanosarcina mazei* TBP und TFB bei 37 °C wurden optimiert, um eine optimale Ausbeute an spezifischen Transkripten zu erzielen. Da potentielle Regulatorproteine eventuell auch eine Interaktion mit der RNA-Polymerase eingehen könnten, wäre es für die Untersuchungen zur Genexpression bei *Methanosarcina mazei* vorteilhaft gewesen, ein homogenes zellfreies Transkriptionssystem von *Methanosarcina mazei* zu verwenden. Aufgrund der hohen Konservierung der gesamten archaeellen basalen Transkriptionsmaschinerie erscheint jedoch auch das geschilderte Vorgehen als sinnvoll. Jedoch stehen getroffene Aussagen unter dem Vorbehalt der Verwendung einer RNA-Polymerase aus einem anderen Organismus.

2 *In vitro* Transkription der Hitzeschockgene *grpE*, *dnaK* und *dnaJ*

Die Analyse der *in vitro* Transkription der Hitzeschockgene *grpE*, *dnaK* und *dnaJ* von *Methanosarcina mazei* ergab, dass sich nur das *grpE* Gen transkribieren lässt. Beim *dnaK* Gen lässt sich nur ein sehr schwaches Transkript beobachten, wobei es sich dabei auch um ein unspezifisches Produkt handeln könnte. Das *dnaJ* Gen lässt sich *in vitro* nicht transkribieren.

Da diese drei Hitzeschockgene bei *Methanosarcina mazei* in der Reihenfolge 5'-*grpE*-*dnaK*-*dnaJ*-3' direkt hintereinander liegen (CONWAY de MACARIO et al., 1994), liegt die Vermutung nahe, dass es sich um ein Operon handelt und damit die Gene polycistronisch transkribiert werden. Dies würde erklären, dass bei Verwendung der jeweiligen Stromaufwärtsregion der drei Hitzeschockgene als Matrize in der *in vitro* Transkription nur das *in vivo* in Richtung der Transkription zuvorderst liegende *grpE* Gen transkribiert wird. Für ein Operon spricht auch, dass diese Anordnung der drei Hitzeschockgene bei allen bisher bei den Archaea gefundenen Homologen identisch ist (MACARIO & CONWAY de MACARIO, 1999), auch wenn nicht alle Archaea diese Hitzeschockgene besitzen. Es kommen bei den Archaea aber entweder diese drei Hitzeschockgene in der erwähnten Anordnung vor, oder es kann keines dieser Hitzeschockgene identifiziert werden (MACARIO et al., 1999). Außerdem ähneln die archaeellen Hitzeschockproteine, vor allem die Hauptkomponente DnaK, in Sequenz und Struktur stark den Homologen der gram-positiven Bacteria (MACARIO et al., 1991; GUPTA & SINGH, 1992), und für die bakteriellen

Hitzeschockgene ist bekannt, dass sie ein Operon bilden und ihre Transkription dementsprechend polycistronisch erfolgt (BARDWELL et al., 1986; GOMES et al., 1990; NARBERHAUS et al., 1992; HOMUTH et al., 1997).

Es gibt aber bei *Methanosarcina mazei* mehrere Hinweise auf eine monocistronische Transkription der Gene *grpE*, *dnaK* und *dnaJ*. Bei Northern Blot Analysen der gesamten RNA aus *Methanosarcina mazei* Zellen konnte mit drei unterschiedlichen Sonden für jedes der drei Hitzeschockgene jeweils ein Transkript festgestellt werden, dessen Länge ungefähr der jeweiligen Gensequenz entspricht. Es konnten ausschließlich diese monocistronischen Transkripte detektiert werden, d. h. es war kein längeres Transkript nachweisbar, das ein zusätzliches polycistronisches Transkript angezeigt hätten, von dem die kürzeren mRNAs abstammen könnten. Diese Beobachtungen wurden sowohl bei der optimalen Wachstumstemperatur als auch nach Hitzeschock gemacht. Außerdem konnte stromaufwärts jedes Gens eine Promotorsequenz und stromabwärts jedes Gens ein Terminationssignal gefunden werden (CLARENS et al., 1995; CONWAY de MACARIO et al., 1995). Die Promotoren weisen keine für Bacteria typische Sequenzmotive auf, und es konnten auch keine Regulatorelemente der Bacteria entdeckt werden, obwohl die Gene Proteine bakteriellen Typs kodieren. Alle drei Gene besitzen archaeele Promotoren (CLARENS et al., 1995; MACARIO & CONWAY de MACARIO, 1997). Die TATA-Box ist allerdings, wie die Abb. 27 zeigt, unterschiedlich stark konserviert. Die ermittelten *in vivo* Orte des Starts und der Termination der Transkription korrelieren auch gut mit der Lage der Promotoren und Terminationssignale. Der ermittelte *in vivo* Transkriptionsstartpunkt der drei Hitzeschockgene ist bei optimaler Wachstumstemperatur und nach Hitzeschock jeweils identisch (CLARENS et al., 1995; CONWAY de MACARIO et al., 1995).

Für das *grpE* Transkript wurde in dieser Arbeit das Startnukleotid der *in vitro* Transkription mittels Primer Extension bestimmt. Es wurde ein Cytosin-Rest 20 bp stromabwärts der TATA-Box und 45 bp stromaufwärts des Translationsstarts ermittelt. Der *in vitro* Transkriptionsstart ist damit identisch mit dem *in vivo* Transkriptionsstart. Für *dnaK* und *dnaJ* konnte aufgrund des nicht vorhandenen Transkripts keine Bestimmung des *in vitro* Transkriptionsstarts durchgeführt werden. Alle drei Hitzeschockgene werden *in vivo* schwach konstitutiv transkribiert. Es kann *in vivo* am meisten Transkript von *grpE* detektiert werden, etwas weniger von *dnaK* und von *dnaJ* ist nur sehr wenig mRNA zu beobachten (CLARENS et al., 1995; CONWAY de MACARIO et al., 1995). Auch *in vitro* konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *grpE* sich effektiv transkribieren lässt, wogegen bei *dnaK* nur eine sehr schwache und bei *dnaJ* keine Transkription zu beobachten ist. Die Ergebnisse stimmen tendenziell überein, wobei die *in vitro* Transkription von *dnaK* viel schwächer ist als es die *in vivo* mRNA Menge vermuten lässt. Von *dnaJ* ist *in vitro* kein Transkript, im Gegensatz zu einer sehr geringen *in vivo* mRNA Menge, festzustellen. Es ist aber zu bedenken, dass die *in vivo* festgestellte unterschiedliche mRNA Menge von den drei Genen auch auf ungleiche Abbauraten der mRNA zurückzuführen sein kann. Bei einer gleichmäßigen Abbaurate der drei mRNAs wäre die gezeigte unterschiedliche *in vivo* Menge aber ein weiteres Indiz für eine monocistronische Transkription. Nach Hitzeschock steigen die mRNA Mengen der drei Hitzeschockgene *in vivo* auch in unterschiedlichem Ausmaß an. Dies ist sowohl bei unterschiedlichen Temperaturen, als auch bei unterschiedlicher Dauer des Hitzeschocks zu beobachten (CLARENS et al., 1995; CONWAY de MACARIO et al., 1995; LANGE et al., 1997). Unter dem Vorbehalt einer gleichmäßigen Abbaurate der mRNA weist dies auf eine unterschiedlich starke Stimulierung der Transkription der Hitzeschockgene hin. Auch dies spricht für eine monocistronische Transkription.

<u><i>grpE</i></u>	<u><i>dnaK</i></u>	<u><i>dnaJ</i></u>
***** *	**** **	* * * *
5' - TTTATAGA - 3'	5' - TTTAATTA - 3'	5' - TGTTCACA - 3'

Abb. 27: TATA-Box Sequenzen der Gene *grpE*, *dnaK* und *dnaJ* von *Methanosarcina mazei* (MACARIO et al., 1999)

Nukleotide die mit der Konsensussequenz der TATA-Box methanogener Archaea übereinstimmen, welche die Sequenz 5'-YTTATATA-3' besitzt (SOPPA, 1999a), sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Abb. 27 zeigt die Sequenzen der TATA-Box der Hitzeschockgene *grpE*, *dnaK* und *dnaJ* von *Methanosarcina mazei*. Es ist zu erkennen, dass die TATA-Box von *grpE* bis auf ein Nukleotid der Konsensussequenz der TATA-Box methanogener Archaea entspricht. Bei der TATA-Box von *dnaK* entsprechen zwei Nukleotide nicht der Konsensussequenz und die TATA-Box von *dnaJ* weist nur noch eine entfernte Ähnlichkeit mit der Konsensussequenz auf. Die unterschiedlich starke Konservierung der TATA-Box bei den drei Hitzeschockgenen könnte ihre unterschiedlich starke *in vitro* Transkription erklären. Während sich das *grpE* Gen mit der am stärksten konservierten TATA-Box effizient transkribieren lässt, war bei *dnaK* mit zwei ausgetauschten Nukleotiden zur Konsensussequenz nur ein sehr schwaches Transkript zu detektieren. *dnaJ* ließ sich vermutlich aufgrund der stark von der Konsensussequenz abweichenden TATA-Box nicht *in vitro* transkribieren. Interessant ist in diesem Zusammenhang vor allem die Position 5 der TATA-Box, denn eine Punktmutation der Konsensussequenz an dieser Position führt beim tRNA^{Val} Gen von *Methanococcus vannielii* und beim *gdh* Gen von *Pyrococcus furiosus* zum vollständigen Verlust der Transkriptionsaktivität (HAUSNER et al., 1991; HETHKE et al., 1996). Bei *dnaK* und *dnaJ* von *Methanosarcina mazei* entspricht die TATA-Box unter anderem an dieser Position nicht der Konsensussequenz, während bei *grpE* nur ein Austausch an einer anderen Position vorkommt Gleichwohl ist *in vivo* durch eine bisher unbekannte Stimulierung eine Transkription von *dnaK* und *dnaJ* möglich.

Bei einer monocistronischen Transkription der Hitzeschockgene könnte auch eine unterschiedliche Regulation der Transkription erfolgen. In diesem Zusammenhang ist eine auffällige fünffache direkte Sequenzwiederholung stromaufwärts des *dnaK* Gens, mit der Sequenz 5'-ATGGAAATAACCGGCTAAACCAAAGAATTG-3', interessant. Diese Sequenz konnte allerdings nicht stromaufwärts des *dnaJ* Gens gefunden werden. Eine Datenbankrecherche ergab zwar keine signifikante Übereinstimmung mit einer bekannten Sequenz, aber bei dieser fünffachen direkten Sequenzwiederholung 82 bp stromaufwärts des *in vivo* Transkriptionsstarts von *dnaK* könnte es sich um ein regulatorisches Element handeln. Vor den Hitzeschockgenen der Eukarya liegen mehrfache direkte Sequenzwiederholungen, die sogenannten Hitzeschockelemente, an die der eukaryelle trimere Hitzeschockfaktor bindet und die Transkription der Hitzeschockgene stimuliert. Das zu DnaK homologe eukaryelle Protein Hsp70 reguliert durch Verhinderung der Trimerisierung des Hitzeschockfaktors unter anderem die Induktion seines eigenen Gens (MORIMOTO, 1998; SATYAL et al., 1998) Auch wenn die bei *Methanosarcina mazei* entdeckte direkte fünffache Sequenzwiederholung keine Sequenzübereinstimmung zu den eukaryellen Hitzeschockelementen aufweist, könnte es sich doch um einen ähnlichen Mechanismus der Regulation handeln.

Die *in vitro* Transkription des *dnaK* Gens von *Methanosarcina mazei* wurde sowohl mit einer DNA-Matrize durchgeführt, die diese fünffache direkte Sequenzwiederholung enthält, als

auch mit einer DNA-Matrize, die diesen Bereich nicht aufweist. Es konnte dabei keine unterschiedliche Transkriptionsaktivität festgestellt werden. Eventuell fehlte ein Aktivatorprotein, das an diesen Sequenzabschnitt bindet und die Transkription stimuliert. Dies kann allerdings erst durch weitere Studien geklärt werden. Es sollte auch versucht werden aus hitzegeschockten und nicht hitzegeschockten *Methanosarcina mazei* Zellen ein potentiell DNA-bindendes Regulatorprotein mittels immobilisierter DNA zu isolieren, aber der gewählte Versuchsaufbau erwies sich bereits im Vorversuch bei der versuchten Isolierung von TBP und TFB mittels immobilisierter *grpE* Promotor-DNA als nicht geeignet.

Interessanterweise wurden bei der Genomsequenzierung von *Methanosarcina mazei* Goel drei verschiedene *thp* Gene festgestellt (DEPPENMEIER et al., 2002). Auch bei *Haloferax volcanii* sind drei verschiedene *thp* Gene und sechs verschiedene *tfb* Gene gefunden worden, und auch *Pyrococcus furiosus* besitzt zwei verschiedene *tfb* Gene. Bei *Haloferax volcanii* und *Pyrococcus furiosus* wird die Transkription jeweils eines *tfb* Gens spezifisch nach Hitzeschock induziert (THOMPSON et al., 1999; SHOCKLEY et al., 2003). Es wäre deshalb möglich, dass bei diesen Organismen die Transkription der Hitzeschockgene durch Verwendung eines nach Hitzeschock induzierten TFBs reguliert wird. Dies wäre ein zu den alternativen σ -Faktoren der Bacteria ähnlicher Mechanismus. Bei *Pyrococcus furiosus* wurde inzwischen zwar eine negative Regulation der Hitzeschockgene *hsp20* und *aaa⁺ atpase* durch den Repressor Phr gezeigt (VIERKE et al., 2003), und *Pyrococcus furiosus* besitzt die Hitzeschockgene *grpE*, *dnaK* und *dnaJ* auch nicht (MACARIO et al., 1999), aber eine Regulation der Transkription weiterer Hitzeschockgene bei *Pyrococcus furiosus* durch Verwendung eines alternativen nach Hitzeschock induzierten TFB ist, wie auch bei *Haloferax volcanii*, nicht auszuschließen. Bei den Genen *grpE*, *dnaK* und *dnaJ* von *Methanosarcina mazei* konnten die für die Bindung von Phr bei *Pyrococcus furiosus* essentiellen Sequenzelemente nicht gefunden werden, was auf eine andere Regulation dieser Gene schließen lässt. *Methanosarcina mazei* besitzt zwar nur ein *tfb* Gen, aber drei verschiedene *thp* Gene. Ob bei *Methanosarcina mazei* eine unterschiedliche Expression der multiplen *thp* Gene nach Hitzeschock erfolgt ist bisher nicht bekannt. Auch bei Eukarya konnten verschiedene Varianten von TBP gefunden werden, für die gezeigt wurde, dass sie nur an eine sehr begrenzte Anzahl von Promotoren binden (HANSEN et al., 1997). Es wäre also interessant, die *in vitro* Transkription der Hitzeschockgene von *Methanosarcina mazei* mit den drei unterschiedlichen TBP Varianten aus diesem Organismus zu untersuchen. Hierbei wäre vor allem der Einfluss auf die *in vitro* Transkription des *dnaK* und *dnaJ* Gens von Interesse, da sich diese Gene mit der verwendeten TBP Variante nicht bzw. nur sehr schwach transkribieren lassen.

3 Stimulierung der *in vitro* Transkription durch TFE

Das *tfe* Gen von *Methanosarcina mazei* kodiert ein Protein mit 167 Aminosäuren. Damit ist das *Methanosarcina mazei* TFE etwas kleiner als archaeelle Homologe. Alle archaeellen TFE Proteine sind jedoch deutlich kleiner als die homologe α -Untereinheit des allgemeinen eukaryellen Transkriptionsfaktors TFIIE, die einen zusätzlichen C-terminalen Bereich aufweist. Dieser C-terminale Bereich ist für die Funktion des Proteins aber entbehrlich, während der N-terminale Bereich essentiell ist (OHKUMA et al., 1995; KULDELL & BURATOWSKI, 1997; SAKURAI et al., 1997). Das archaeelle TFE entspricht also der essentiellen N-terminalen Region des eukaryellen TFIIE α (BELL et al., 2001). Bei der Analyse der Aminosäuresequenz des *Methanosarcina mazei* TFE wurde im N-terminalen Bereich ein Helix-Turn-Helix-Motiv und im C-terminalen Bereich ein Zinkfinger-Motiv identifiziert. Diese Motive sind hochkonserviert und können bei allen archaeellen TFE

Proteinen an den gleichen Positionen gefunden werden (SOPPA, 1999b; BELL et al., 2001). Auch beim eukaryellen TFIIIE α ist der Zinkfinger vorhanden, und es konnte gezeigt werden, dass er essentiell ist für die Funktion des Proteins (MAXON & TJIAN, 1994). Bei einigen archaeellen Homologen ist allerdings ein Aminosäureaustausch in der Sequenz des Zinkfingers erfolgt. Bei *Sulfolobus solfataricus* und *Archaeoglobus fulgidus* ist der zweite Cystein-Rest konservativ ausgetauscht. Bei den *Pyrococcus* Arten und bei *Methanobacterium thermoautotrophicum* ist dagegen ein nicht konservativer Aminosäureaustausch des zweiten Cystein-Rests erfolgt (BELL et al., 2001). Kurz darauf folgt jedoch ein Histidin-Rest, der ebenfalls zur Koordination eines Metall-Ions fähig ist. TFE von *Methanosarcina mazei* besitzt jedoch ein typisches Zinkfinger-Motiv mit der Sequenz CxxxC-N₁₄-CxxC.

Es konnte gezeigt werden, dass TFE von *Methanosarcina mazei* die *in vitro* Transkription des *grpE* Gens leicht stimuliert. Auch für TFE von *Methanobacterium thermoautotrophicum* und *Sulfolobus solfataricus* ist schon gezeigt worden, dass es die *in vitro* Transkription einiger Gene stimulieren kann. Es konnte allerdings nicht bei allen untersuchten Promotoren eine Stimulierung der Transkription beobachtet werden (HANZELKA et al., 2001; BELL et al., 2001). Die detektierte Stimulierung war allerdings z. T. deutlich stärker als die beim *grpE* Gen von *Methanosarcina mazei* festgestellte Stimulierung. Das *grpE* Gen von *Methanosarcina mazei* lässt sich aber auch ohne TFE effizient transkribieren, so dass eine starke Stimulierung auch nicht zu erwarten war. Auch für *Methanobacterium thermoautotrophicum* TFE konnte gezeigt werden, dass es im zellfreien Transkriptionssystem dieses Archaeon die Transkription eines bereits ohne TFE effektiv transkribierten Promotors nicht weiter steigern kann (HANZELKA et al., 2001) Es wurde auch der Einfluss von TFE auf die Transkription der Gene *dnaK* und *dnaJ* von *Methanosarcina mazei* untersucht. Bei diesen Genen kann *in vitro* nur eine sehr schwache bzw. keine Transkription beobachtet werden. Es erfolgte aber keine Stimulierung der *in vitro* Transkription dieser Gene durch TFE (Daten nicht gezeigt). TFE ist also offensichtlich nicht der Aktivator für die Transkription dieser Gene.

In vitro Transkriptionsanalysen von BELL et al. (2001) mit mutierten TATA-Box Sequenzen von für TFE nicht sensitiven Promotoren zeigen, dass ein im Vergleich zum Wildtyp schwächer transkribierter Promotor für TFE sensitiv wird. Auch Versuche mit suboptimalen TBP Konzentrationen weisen darauf hin, dass bei Bedingungen, bei denen die TBP-TATA-Box Interaktion nicht optimal ist, eine Stimulierung durch TFE erfolgen kann, denn ein bei optimaler TBP Konzentration für TFE nicht sensitiver Promotor wird bei suboptimalen TBP Konzentrationen für TFE sensitiv. Da die Transkription des *grpE* Gens von *Methanosarcina mazei* bei optimaler TBP Konzentration nur leicht stimuliert wird, wurde die *in vitro* Transkription dieses Gens bei verschiedenen suboptimalen TBP Konzentrationen untersucht. Es konnte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von BELL et al. (2001) eine stärkere Stimulierung der Transkription bei suboptimalen TBP Konzentration detektiert werden. Dieser Effekt ist umso ausgeprägter, je geringer die gewählte TBP Konzentration ist. Es konnte eine bis zu 3-fache Stimulierung beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig die Aktivität des TFE von *Methanosarcina mazei*. Die bei optimaler TBP Konzentration schwächere Stimulierung der Transkription bei diesem Versuch, als bei den beiden vorher präsentierten Versuchen, bei denen nur die optimale TBP Konzentration eingesetzt wurde, ist darauf zurückzuführen, dass bei diesem Experiment eine sehr viel geringere TFE Menge (75 ng) eingesetzt wurde als zuvor (bis zu 2100 ng). Trotz der viel größeren TFE Menge war eine nur leicht stärkere Stimulierung bei optimaler TBP Konzentration zu beobachten. Auch dies weist darauf hin, dass TFE die Transkription nur bei nicht optimaler TBP-TATA-Box Interaktion zu stimulieren vermag. Es konnte auch gezeigt

werden, dass TBP nicht durch TFE ersetzt werden kann. TBP ist also essentiell für die Transkription, und TFE übernimmt nicht die Funktion von TBP.

Für eukaryelles TFIIIE α ist beschrieben, dass es die Bindung von TBP an die TATA-Box stimuliert (YOKOMORI et al., 1998). Die Funktionsweise von TFE ist dagegen noch unbekannt. Es wird aber spekuliert, dass TFE die Dimerisierung von TBP verhindert und dadurch die TATA-Box Erkennung von TBP begünstigt wird (BELL et al., 2001). HANZELKA et al. (2001) haben gezeigt, dass rekombinantes TFE von *Archaeoglobus fulgidus* nicht im *Methanobacterium thermoautotrophicum in vitro* Transkriptionssystem die Transkription von Promotoren stimulieren kann, die von rekombinanten *Methanobacterium thermoautotrophicum* TFE stimuliert werden. TFE von verschiedenen Organismen scheint also nicht austauschbar zu sein. In dieser Arbeit wurde ein zellfreies Transkriptionssystem mit rekombinanten *Methanosarcina mazei* TBP und TFB und gereinigter RNA-Polymerase von *Methanococcus thermolithotrophicus* verwendet, und es konnte die funktionelle Aktivität des *Methanosarcina mazei* TFE in diesem Transkriptionssystem gezeigt werden. Dies könnte einen Hinweis auf den Interaktionspartner von TFE liefern, denn wenn TFE von *Methanosarcina mazei* im homogenen *Methanococcus thermolithotrophicus in vitro* Transkriptionssystem auch nicht funktionell aktiv wäre, was noch gezeigt werden muss, dann fällt die RNA-Polymerase als Interaktionspartner von TFE aus, da die Verwendung von *Methanosarcina mazei* TBP und TFB genügen würde, damit TFE wirken kann. TFB kommt als Interaktionspartner von TFE vermutlich auch nicht in Frage, da bei optimaler TBP Menge und suboptimalen TFB Mengen keine Stimulierung der Transkription beobachtet wurde (BELL et al., 2001). Unter der Prämisse der Nichtaustauschbarkeit von *Methanosarcina mazei* TFE in einem homogenen *Methanococcus thermolithotrophicus in vitro* Transkriptionssystem wäre also vermutlich TBP der Interaktionspartner von TFE. Dies würde die These der Verhinderung der Dimerisierung von TBP durch TFE unterstützen.

4 Der potentielle Repressor AmtR aus *Methanosarcina mazei*

Bei dem gram-positiven Bakterium *Corynebacterium glutamicum* ist AmtR der globale Regulator für die Gene des Stickstoffmetabolismus (BURKOVSKI, 2003). Das AmtR Protein fungiert als Repressor, indem es an einen bekannten Sequenzabschnitt stromaufwärts der von ihm regulierten Gene bindet und deren Transkription inhibiert. Auch die Transkription des *glnK* Gens, welches im *amtB/glnK/glnD* Operon lokalisiert ist, wird in Abhängigkeit vom Stickstoffangebot durch AmtR reguliert (JAKOBY et al., 2000). Bei dem Archaeon *Methanosarcina mazei* wird *in vivo* die Transkription des *glnK* Gens ebenfalls in Abhängigkeit von der Stickstoffverfügbarkeit reguliert. Bei ausreichendem Stickstoffangebot ist die Transkription fast vollständig reprimiert, während bei Stickstofflimitierung das *glnK/amtB/orfX* Operon stark induziert wird (EHLERS et al., 2002a). Die Regulation ist allerdings noch unbekannt. *Methanosarcina mazei* besitzt aber ein Gen, von dem die abgeleitete Aminosäuresequenz Ähnlichkeit mit dem AmtR Protein aus *Corynebacterium glutamicum* aufweist. Dieses Gen wurde von der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Schmitz-Streit in Göttingen identifiziert, in *E. coli* kloniert, das kodierte Protein rekombinant hergestellt und anschließend gereinigt. Außerdem wurde 495 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts des *glnK* Gens von *Methanosarcina mazei* eine Sequenz mit großer Ähnlichkeit zur Konsensussequenz des Bindungsmotivs von AmtR aus *Corynebacterium glutamicum* entdeckt (SCHMITZ-STREIT, nicht publiziert). Eine weitere Sequenz mit Ähnlichkeit zum Bindungsmotiv wurde im Bereich der TATA-Box des *glnK* Gens gefunden (Abb. 1B und Tab. 1).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in dem etablierten zellfreien *in vitro* Transkriptionssystem mit den rekombinant hergestellten basalen Transkriptionsfaktoren TBP und TFB aus *Methanosarcina mazei* und der gereinigten RNA-Polymerase aus *Methanococcus thermolithotrophicus* der Einfluss des potentiellen Regulatorproteins AmtR aus *Methanosarcina mazei* auf die Transkription des *in vivo* in Abhängigkeit vom Stickstoffangebot transkribierten *glnK* Gens aus *Methanosarcina mazei* untersucht. Außerdem wurde in Gel-Retardationsexperimenten untersucht, ob das potentielle Regulatorprotein AmtR die Bindung von TBP/TFB und, bzw. oder, der RNA-Polymerase an den Promotor des *glnK* Gens aus *Methanosarcina mazei* beeinflusst. Dies wurde in Abhängigkeit vom Vorhandensein der potentiellen Bindungsstelle 495 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts durchgeführt.

Die ersten *in vitro* Transkriptionsexperimente mit AmtR zeigten, dass AmtR die Transkription aller untersuchten Gene inhibiert. Es war erwartet worden, dass AmtR eventuell die Transkription des *glnK* Gens von *Methanosarcina mazei* hemmt, da 495 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts eine potentielle Bindungsstelle für AmtR vorhanden ist. Es wurde aber ebenfalls eine Abnahme der Transkriptmenge mit zunehmender AmtR Menge im Transkriptionsansatz bei der Transkription des *in vivo* konstitutiv exprimierten Gens tRNA^{Val} von *Methanococcus thermolithotrophicus* (HAUSNER et al., 1991) und des *gdh* Gens von *Pyrococcus furiosus* (HETHKE et al., 1996), und auch bei der Transkription des *in vivo* regulierten Gens *grpE* von *Methanosarcina mazei* (CONWAY de MACARIO et al., 1995) sowie der Gene *hsp20* und *aaa⁺ atpase* von *Pyrococcus furiosus* (VIERKE et al., 2003), beobachtet. Daher war zunächst eine RNase Kontamination der AmtR Charge vermutet worden. Anstatt des Transkripts erwarteter Größe konnte bei einigen Transkriptionen aber eine Bande höheren Molekulargewichts detektiert werden. Um die Ursache dieser Bande zu ergründen und die AmtR Charge auf RNase Aktivität zu testen, wurde deshalb ein Kontrollexperiment durchgeführt. Dafür wurde in einem Standard Transkriptionsansatz *Methanosarcina mazei grpE* Transkript synthetisiert. Zur Entfernung der RNA-Polymerase und der Transkriptionsfaktoren wurde der Ansatz einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen. Das Transkript wurde dann unter Transkriptionsbedingungen mit AmtR inkubiert (ohne RNA-Polymerase und Transkriptionsfaktoren) und anschließend gelelektrophoretisch analysiert. Es war zusätzlich zur Bande des freien *grpE* Transkripts wieder die Bande deutlich höheren Molekulargewichts zu beobachten, während in einem Ansatz ohne AmtR nur freies *grpE* Transkript zu detektieren war. Eine Kontrolle zeigte außerdem, dass keine Neusynthese von Transkript erfolgte. Die Bande höheren Molekulargewichts musste deshalb eine Retardation des *grpE* Transkripts durch AmtR darstellen. Nach einer Phenolextraktion zur Entfernung von AmtR aus dem Ansatz war wieder die Ausgangsmenge des freien *grpE* Transkripts zu detektieren. Es konnte also kein Abbau von RNA beobachtet werden, womit gezeigt war, dass die AmtR Charge keine RNase Aktivität aufweist.

Es konnte gezeigt werden, dass AmtR unter *in vitro* Transkriptionsbedingungen in der Lage ist, an RNA zu binden und eine Gel-Retardation induzieren kann. Es ist jedoch bemerkenswert, dass diese Gel-Retardation in einem denaturierenden Gel beobachtet werden konnte. Das 10%ige PA-Gel enthielt 7 M Harnstoff. Außerdem wurde den Ansätzen vor dem Auftrag auf das Gel dreifacher Auftragspuffer mit 98% Formamid, 0,1% Bromphenolblau, 0,1% Xylencyanol und 10 mM EDTA pH 8.0 zugegeben und die Ansätze 3 min bei 85 °C inkubiert. Es ist erstaunlich, dass unter diesen Bedingungen und nach der geschilderten Behandlung des Ansatzes eine Gel-Retardation durch AmtR beobachtet werden kann. Ob AmtR tatsächlich an einzelsträngige Ribonukleinsäure bindet, müsste noch gezeigt werden. Es ist trotz der geschilderten Behandlung des Ansatzes vor dem Auftrag auf das Gel ein RNA-DNA-Hybrid nicht auszuschließen. Durch Autoradiographie nachgewiesen wurde zwar nur die radioaktiv markierte RNA, aber die DNA-Matrize war aus dem Ansatz nicht entfernt

worden. In den Kontrollen konnte zwar kein zusätzliches RNA-DNA-Hybrid detektiert werden, aber es wäre möglich, dass AmtR diesen Zustand stabilisiert, und daher ein RNA-DNA-AmtR Komplex detektiert wurde. Bei allen folgenden *in vitro* Transkriptionen wurden die Ansätze nach der Transkription und vor der Zugabe von Auftragspuffer einer Phenolextraktion unterzogen. Damit war sichergestellt, dass die gesamte RNA frei im Gel läuft.

Es zeigte sich aber, dass AmtR tatsächlich sowohl die Transkription des *glnK* Gens von *Methanosarcina mazei* als auch die Transkription des *grpE* Gens von *Methanosarcina mazei* und die des *tRNA^{Val}* Gens von *Methanococcus thermolithotrophicus* inhibiert. Eine spezifische Hemmung der *in vitro* Transkription des *glnK* Gens konnte somit nicht eindeutig gezeigt werden. Der bei allen drei Genen beobachtete Effekt ist aber eindeutig auf eine Hemmung der Transkription zurückzuführen. Eine RNase Aktivität der AmtR Charge konnte, wie zuvor beschrieben, ausgeschlossen werden. Die RNA lief auch frei im Gel, da vor dem Auftrag auf das Gel eine Phenolextraktion durchgeführt wurde. Es ist also ebenfalls ausgeschlossen, dass eine Teilmenge des Transkripts mit AmtR retardiert im Gel lief. Die Hemmung der *in vitro* Transkription der Gene *tRNA^{Val}* und *grpE* erfolgt eventuell aufgrund einer unspezifischen Bindung von AmtR an die DNA, während beim *glnK* Gen noch eine spezifische Bindung von AmtR an die DNA hinzutritt. Hierfür spricht, dass der Hemmeffekt beim *glnK* Gen bei der gleichen Menge AmtR signifikant größer ist bei der *in vitro* Transkription der beiden anderen Gene. Bei 1500 ng AmtR ist die relative Transkriptionsaktivität beim *glnK* Gen ca. um den Faktor zwei, bei 3000 ng AmtR ca. um den Faktor drei und bei 4500 ng AmtR sogar fast um den Faktor acht geringer als beim *grpE* Gen. Es mussten bei der *in vitro* Transkription allerdings relativ große Mengen AmtR eingesetzt werden um einen Hemmeffekt zu beobachten. Das molare Verhältnis von DNA zu AmtR beträgt für alle drei untersuchten Gene bei 1500 ng AmtR 1:883, bei 3000 ng AmtR 1:1766 und bei 4500 ng AmtR 1:2649. Aber auch bei Gel-Retardationsexperimenten mit *Corynebacterium glutamicum* AmtR ist beschrieben, dass erst große Mengen AmtR zu einer Retardation führen (JAKOBY et al., 2000).

Die Werte der relativen Transkriptionsaktivität der drei untersuchten Gene nehmen bei der jeweils gleichen AmtR Menge unterschiedlich stark ab. Wenn die Hemmung bei allen drei Genen nur einen unspezifischen Effekt darstellen würde, müsste die relative Transkriptionsaktivität bei gleicher AmtR Menge um den gleichen Wert abnehmen. Die ungleichmäßige Abnahme der relativen Transkriptionsaktivität deutet zumindest darauf hin, dass der beobachtete Hemmeffekt sequenzspezifisch ist, da alle anderen Bedingungen identisch waren. Eine Sequenz, die als Bindungsstelle für eine spezifische Bindung von AmtR in Frage kommt, liegt 495 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts von *glnK* (Abb. 1B). Diese Sequenz besitzt große Ähnlichkeit zur Konsensussequenz des Bindungsmotivs von AmtR aus *Corynebacterium glutamicum* (Tab. 1). Die bei der *in vitro* Transkription des *glnK* Gens verwendete DNA war so konstruiert, dass sie diesen Sequenzabschnitt enthielt. Eine weitere Sequenz mit Ähnlichkeit zum Bindungsmotiv liegt im Bereich der TATA-Box des *glnK* Gens.

Ein Vergleich der relativen *in vitro* Transkriptionsraten nach Vorinkubation der DNA-Matrize mit AmtR oder Proteinen des Transkriptionsapparates sollte einen Hinweis auf den Ort der Bindung von AmtR liefern. Es zeigte sich, dass unabhängig von den bei der Vorinkubation vorhandenen Proteinen eine gleich starke Inhibierung zu beobachten ist. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Inhibierung der *in vitro* Transkription des *glnK* Gens von *Methanosarcina mazei* nicht durch eine Bindung von AmtR an die Promotorregion vermittelt wird. Die sich im Bereich der TATA-Box befindende Sequenz mit Ähnlichkeit zur

Konsensussequenz des Bindungsmotivs von AmtR aus *Corynebacterium glutamicum* scheint also keine spezifische Bindungsstelle von AmtR darzustellen. Wenn AmtR an die TATA-Box des *glnK* Gens binden würde, könnte man erwarten, dass die Hemmung der *in vitro* Transkription nach Vorinkubation mit AmtR stärker ausgeprägt ist als nach Vorinkubation mit TBP, TFB und der RNA-Polymerase. Bei der Vorinkubation mit AmtR würde AmtR an die Promotorregion binden und die TATA-Box wäre für TBP wahrscheinlich schlechter zugänglich, wodurch die Ausbildung des Präinitiationskomplexes behindert wäre und die Transkription inhibiert wird. Bei Vorinkubation mit TBP, TFB und der RNA-Polymerase würde sich schon vor der Zugabe von AmtR der Präinitiationskomplex mit der Bindung von TBP an die TATA-Box, dem Hinzutreten von TFB mit gleichzeitiger Stabilisierung dieses Komplexes und schließlich der Anlagerung der RNA-Polymerase ausbilden. AmtR könnte in diesem Fall nicht mehr an die TATA-Box binden und die Transkription würde zumindest deutlich schwächer inhibiert werden. Da aber die relativen Transkriptionsraten nach Vorinkubation mit AmtR und nach Vorinkubation mit TBP, TFB und der RNA-Polymerase fast gleich sind ist davon auszugehen, dass keine Konkurrenz zwischen AmtR und dem Präinitiationskomplex bzw. TBP um die Bindung im Bereich der TATA-Box besteht.

Eine Vorinkubation der DNA mit TBP und TFB und anschließender zweiter Vorinkubation mit unterschiedlichen Mengen AmtR vor der Zugabe der RNA-Polymerase führte ebenfalls zu fast identischen Werten der relativen Transkriptionsaktivität wie bei Vorinkubation mit AmtR oder Vorinkubation mit TBP, TFB und RNA-Polymerase. Dies deutet darauf hin, dass AmtR nicht die Anlagerung der RNA-Polymerase an den DNA-TBP-TFB Komplex behindert. Die Vorinkubation mit TBP und TFB ermöglichte die Ausbildung des DNA-TBP-TFB Komplexes, wenn AmtR sich an diesen Komplex anlagern würde oder an die DNA in der Nähe dieses Komplexes bindet und dadurch die Anlagerung der RNA-Polymerase behindert, müssten die Werte für die relative Transkriptionsaktivität niedriger sein als nach Vorinkubation mit TBP, TFB und RNA-Polymerase, da sich dort schon ein vollständiger Präinitiationskomplex ausbilden konnte.

Eine Bindung von AmtR an die potentielle Bindungsstelle 495 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts des *glnK* Gens ist aber möglich. Bei der Vorinkubation mit AmtR würde AmtR an die Bindungsstelle 495 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts binden und nach Zugabe von TBP, TFB und RNA-Polymerase der Präinitiationskomplex ausgebildet werden. Bei der Vorinkubation mit TBP, TFB und RNA-Polymerase würde der Präinitiationskomplex schon ausgebildet werden können und nach Zugabe von AmtR dieses an seine potentielle Bindungsstelle treten. Bei der Vorinkubation mit TBP und TFB und anschließender zweiter Vorinkubation mit AmtR würden alle Proteine an ihre jeweilige Bindungsstelle treten und nach Zugabe der RNA-Polymerase diese den Präinitiationskomplex vervollständigen. Bei diesem Modell der unabhängigen Bindung von AmtR an seine potentielle Bindungsstelle 495 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts ist allerdings die Vermittlung der Inhibierung der Transkription noch zu klären. Jedenfalls scheint AmtR nicht die Ausbildung des Präinitiationskomplexes von seiner Position 495 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts zu stören. Denn in diesem Fall müssten die Werte der relativen Transkription nach Vorinkubation mit AmtR geringer sein als nach Vorinkubation mit TBP, TFB und RNA-Polymerase.

Die Gel-Retardationsexperimente zeigen eine zunehmende Retardation der *glnK*-DNA, welche die potentielle AmtR Bindungsstelle 495 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts enthält, bei steigender AmtR Menge. Die Anzahl der im DNA-AmtR Komplex vorhandenen AmtR Moleküle ist zumindest im untersuchten Bereich also nicht begrenzt. Eventuell

begünstigt gebundenes AmtR die Bindung weiterer AmtR Moleküle. Diese Ergebnisse lassen eine unspezifische Bindung von AmtR an DNA vermuten.

Ferner konnte gezeigt werden, dass der DNA-TBP-TFB Komplex vollständig durch die zusätzliche Bindung von AmtR retardiert wird. TBP, TFB und AmtR können also gemeinsam an die DNA binden. Der Promotor mit der TATA-Box steht für die Bindung von TBP und TFB zur Verfügung und wird nicht von AmtR blockiert. Dies steht in Übereinstimmung mit dem Ergebnis der *in vitro* Transkription, bei der eine Vorinkubation mit AmtR durchgeführt wurde. Auch dort zeigte sich, dass eine Vorinkubation mit AmtR zu keiner verstärkten Inhibierung der Transkription führt. Außerdem scheint der DNA-TBP-TFB-AmtR Komplex stabiler zu sein als der DNA-TBP-TFB Komplex, da weder der DNA-TBP-TFB Komplex, der DNA-AmtR Komplex noch freie DNA zu erkennen sind, wenn zusätzlich AmtR im Ansatz vorhanden ist. Es ist also die gesamte DNA mit TBP-TFB-AmtR Komplexen beladen. Bei dem Ansatz nur mit TBP und TFB war hingegen zusätzlich zum DNA-TBP-TFB Komplex auch noch freie DNA zu beobachten. Außerdem ist bei 100 ng AmtR und 200 ng AmtR noch kein DNA-AmtR Komplex zu erkennen, aber diese Mengen AmtR sind in der Lage den DNA-TBP-TFB Komplex zu retardieren. Dies zeigt, dass AmtR eine höhere Affinität zum DNA-TBP-TFB Komplex besitzt als zur DNA allein.

Es wurden zusätzlich auch Gel-Retardationsexperimente nach verschiedenen Vorinkubationen durchgeführt. Es sollte geklärt werden, ob auch nach Vorinkubation der DNA mit AmtR noch eine Bindung von TBP und TFB beobachtet werden kann bzw. ob nach einer Vorinkubation der DNA mit TBP und TFB die Bindung von AmtR beeinflusst wird. Es war zwar schon gezeigt worden, dass die Bindung von TBP, TFB und AmtR gemeinsam möglich ist, aber eventuell wird nach einer Vorinkubation mit AmtR aufgrund von unspezifischer AmtR Bindung die Bindung von TBP und TFB an die TATA-Box verhindert. Es zeigte sich aber, dass TBP und TFB nach Vorinkubation der DNA mit AmtR ebenso gut binden, als wenn die Zugabe gleichzeitig erfolgt oder mit AmtR vorinkubiert wird. Wenn die Bindung von TBP und TFB aufgrund der schon erfolgten Bindung von AmtR behindert wäre, müsste ein DNA-AmtR Komplex erwartet werden, dieser war aber nicht zu beobachten. Wenn andersherum die Bindung von AmtR aufgrund der schon erfolgten Bindung von TBP und TFB behindert wäre, müsste ein DNA-TBP-TFB Komplex erwartet werden, aber auch dieser war nicht zu detektieren. Der DNA-TBP-TFB-AmtR Komplex lief bei gleichzeitiger Zugabe der Proteine, Vorinkubation mit TBP und TFB oder Vorinkubation mit AmtR auf fast gleicher Höhe im Gel. Die Reihenfolge der Zugabe der einzelnen Proteine ist also auch unerheblich für die Anzahl der gebundenen AmtR Moleküle im DNA-TBP-TFB-AmtR Komplex. Auch bei diesem Versuch konnte bei gleichzeitiger Anwesenheit von TBP, TFB und AmtR weder ein DNA-TBP-TFB Komplex, DNA-AmtR Komplex noch freie DNA beobachtet werden. Der DNA-TBP-TFB-AmtR Komplex scheint also, wie zuvor schon diskutiert, bevorzugt formiert zu werden.

Es wurde auch untersucht, ob AmtR *glnK*-DNA ohne die potentielle Bindungsstelle 495 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts oder *grpE*-DNA retardiert. Es wurde festgestellt, dass bei der gleichen Menge AmtR die untersuchten DNAs unterschiedlich retardiert werden. Die *grpE*-DNA und die *glnK*-DNA ohne die potentielle AmtR Bindungsstelle 495 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts werden nicht retardiert. Die *glnK*-DNA mit der potentiellen AmtR Bindungsstelle 495 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts wird hingegen retardiert. Dies weist auf eine spezifische Bindung von AmtR an die *glnK*-DNA mit der potentiellen AmtR Bindungsstelle 495 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts hin. Es wurde bei diesem Experiment jeweils ungefähr die gleiche Menge markierte DNA eingesetzt, die DNAs wiesen allerdings unterschiedliche Größen auf. Zur Kompensation und zur

Verhinderung unspezifischer Bindung wurde jedoch ein hoher Überschuss (ca. 300-fach) Kompetitor-DNA eingesetzt, dies sollte die Spezifität der beobachteten Retardation sicherstellen.

Der DNA-TBP-TFB Komplex wurde unabhängig von der verwendeten DNA durch AmtR retardiert. Es war jeweils eine vollständige Retardation zu beobachten, d. h. es war weder freie DNA, ein DNA-AmtR Komplex oder ein DNA-TBP-TFB Komplex zu detektieren. Es wurde also nachgewiesen, dass diese zuvor schon bei der *glnK*-DNA mit der potentiellen Bindungsstelle gemachte Beobachtung unabhängig von der untersuchten DNA ist. Die vollständige Retardation des DNA-TBP-TFB Komplexes durch AmtR sowie die bevorzugte Ausbildung eines DNA-TBP-TFB-AmtR Komplexes, gegenüber DNA-AmtR Komplexen und DNA-TBP-TFB Komplexen, was sich aus dem Nichtvorhandensein dieser Komplexe ableitet, ist also unabhängig von der AmtR Bindungsstelle. Dies deutet auf eine Interaktion zwischen AmtR und TBP oder TFB hin.

Es konnte nicht ermittelt werden, ob AmtR die Anlagerung der RNA-Polymerase an den DNA-TBP-TFB Komplex verhindert. Es läuft zwar unabhängig von einer AmtR Zugabe ein Komplex auf gleicher Höhe im Gel wenn TBP, TFB und RNA-Polymerase im Ansatz vorhanden sind, was dafür spricht, dass die Anlagerung der RNA-Polymerase an den DNA-TBP-TFB Komplex nicht durch AmtR verhindert wird, aber der DNA-TBP-TFB-RNA-Polymerase Komplex läuft z. T. auf einer Höhe im Gel mit dem DNA-TBP-TFB-AmtR Komplex. Dadurch ist eine Unterscheidung zwischen dem DNA-TBP-TFB-AmtR Komplexes und dem DNA-TBP-TFB-RNA-Polymerase Komplexes nicht möglich. Eine Unterscheidung zwischen einem DNA-TBP-TFB-RNA-Polymerase Komplex und DNA-TBP-TFB-RNA-Polymerase-AmtR Komplex war ebenfalls nicht möglich. Die Differenz des Molekulargewichts zwischen DNA-TBP-TFB-RNA-Polymerase Komplex und DNA-TBP-TFB-RNA-Polymerase-AmtR Komplex ist eventuell zu gering um im Gel zwei Banden unterschiedlicher Laufhöhe zu detektieren. Zur Identifikation der beteiligten Proteine an den Komplexen könnten sogenannte „Supershifts“, Gel-Retardationsexperimente mit spezifischen Antikörpern, beitragen. Dann wären den Komplexen einzelne Proteine sicher zuzuordnen.

Es konnte jedoch eindeutig die Ausbildung eines DNA-TBP-AmtR Komplexes nachgewiesen werden. Eine Retardation der drei unterschiedlichen untersuchten DNAs allein mit TBP wurde nicht festgestellt. Es war jeweils nur die freie DNA zu beobachten. Wenn jedoch TBP und AmtR zusammen mit der DNA inkubiert wurden war eine deutliche Retardation zu detektieren. Es war jeweils keine freie DNA mehr zu erkennen, sondern eine Bande deutlich höheren Molekulargewichts. TBP und AmtR sind also unabhängig von der untersuchten DNA gemeinsam in der Lage eine Retardation zu induzieren, obwohl TBP allein und die eingesetzte Menge AmtR allein mit der *grpE*-DNA und der *glnK*-DNA ohne potentielle AmtR Bindungsstelle dies nicht vermögen. Das molare Verhältnis von AmtR zu TBP im Bindungsansatz betrug jeweils 1:3,8. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde überprüft, ob AmtR bei der *in vitro* Transkription TFB ersetzen kann. Dazu wurden mit dem *grpE* Gen *in vitro* Transkriptionen mit unterschiedlichen TBP und AmtR Mengen durchgeführt, bei denen keine TFB Zugabe erfolgte. Es zeigte sich aber, dass TFB, wie auch TBP, essentiell ist für die *in vitro* Transkription, und TFB nicht durch AmtR ersetzt werden kann (Daten nicht gezeigt).

Es wurde gezeigt, dass AmtR vermutlich eine spezifische Bindung an die potentielle Bindungsstelle 495 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts des *glnK* Gens eingeht. Da aber AmtR in Kombination mit anderen Proteinen auch an die *glnK*-DNA ohne diese Bindungsstelle binden kann, muss es noch andere Bindungsmöglichkeiten geben. Es ist zu vermuten, dass eine Interaktion mit TBP hierbei eine Rolle spielt, da AmtR nicht nur den

DNA-TBP-TFB Komplex retardiert, sondern auch mit TBP einen DNA-TBP-AmtR Komplex auszubilden vermag, obwohl AmtR und TBP allein jeweils nicht zu einer Retardation dieser *glnK*-DNA fähig sind. Bei einer Interaktion von AmtR mit TBP wird aber nicht die Anlagerung von TFB verhindert, da auch der DNA-TBP-TFB-AmtR Komplex formiert werden kann. Dieser Komplex enthält eindeutig TFB, da er höher im Gel läuft als der DNA-TBP-AmtR Komplex. Eine direkte Interaktion zwischen AmtR und TBP von *Methanosarcina mazei* nach gemeinsamer Inkubation unter *in vitro* Transkriptionsbedingungen ohne DNA wurde aber nicht beobachtet.

Der Ort der Bindung von AmtR und TBP bei dem beobachteten DNA-TBP-AmtR Komplex ist noch nicht aufgeklärt. Es wäre sowohl möglich, dass TBP es AmtR ermöglicht unspezifisch an DNA zu binden, als auch eine gemeinsame Bindung von TBP und AmtR an die TATA-Box, denn bei allen Untersuchungen wies die verwendete DNA einen Promotor mit TATA-Box auf. Weitere Erkenntnisse über den Ort der Bindung könnten Gel-Retardationen liefern, bei denen die TATA-Box deletiert oder mutiert wird. Dann kann geklärt werden, ob die TATA-Box essentiell ist für die Ausbildung des DNA-TBP-AmtR Komplexes. Es ist außerdem zu vermuten, dass *in vivo* die AmtR-TBP Interaktion reguliert wird. Das hochkonservierte TBP ist ein basaler Transkriptionsfaktor und somit ein essentielles Protein für das Wachstum von *Methanosarcina mazei*, wie auch für alle anderen Archaea. Aufgrund der Bedeutsamkeit dieses Transkriptionsfaktors ist eine Interaktion mit ihm wahrscheinlich reguliert. Es wäre möglich, dass eine Modifikation von AmtR erfolgen kann, oder AmtR durch einen anderen bisher unbekanntem Mechanismus kontrolliert wird. Die Transkription des *amtR* Gens und die Synthese des AmtR Proteins erfolgt jedenfalls unabhängig vom Stickstoffangebot und scheint somit nicht reguliert zu sein (SCHMITZ-STREIT, nicht publiziert).

Bei dem ebenfalls methanogenen Archaeon *Methanococcus maripaludis* wurde vor kurzem das Regulatorprotein NrpR identifiziert (LIE & LEIGH, 2003). Es bindet bei diesem Organismus an die für methanogene Archaea postulierte Repressor Bindungsstelle vor Genen des Stickstoffmetabolismus (LIE & LEIGH, 2002). Bei *Methanosarcina mazei* konnte dieses Sequenzmotiv jedoch weder vor dem *glnK* Gen, noch vor anderen Genen des Stickstoffmetabolismus identifiziert werden (EHLERS et al., 2002a). Ein zu NrpR homologes Protein konnte auch nur bei einigen Euryarchaeota gefunden werden, wobei manche Homologe nicht alle bei NrpR von *Methanococcus maripaludis* vorhandenen Proteindomänen aufweisen, so auch das Homolog von *Methanosarcina mazei* (LIE & LEIGH, 2003). Auch wenn die Konsensussequenz der NrpR Bindungsstelle bei *Methanosarcina mazei* nicht gefunden wurde und das NrpR Homolog vermutlich eine deutlich andere Struktur aufweist, wäre es sehr interessant, den Einfluss dieses Proteins auf die Transkription des *glnK* Gens zu untersuchen. Bei *Methanococcus maripaludis* wird davon ausgegangen, dass die Bindungsaffinität von NrpR an die Repressor Bindungsstelle durch einen bisher unbekanntem Mechanismus reguliert wird. Diese Regulation der Bindungsaffinität des NrpR Homologs könnte eine Funktion von AmtR sein, für das gezeigt wurde, dass es die Bindungsaffinität bzw. Bindungsstabilität von TBP zur DNA beeinflussen kann.

V Zusammenfassung

Für die Untersuchungen zur Regulation der Transkription bei *Methanosarcina mazei* wurde ein *in vitro* Transkriptionssystem mit gereinigter *Methanococcus thermolithotrophicus* RNA-Polymerase und rekombinanten *Methanosarcina mazei* TBP und TFB etabliert. Das *tfb* Gen wurde zunächst in einer genomischen λ -Genbank von *Methanosarcina mazei* S-6 identifiziert und anschließend sequenziert und kloniert. Die Analyse der Aminosäuresequenz von TBP und TFB offenbarte charakteristische archaeelle Merkmale dieser Proteine. TBP und TFB wurden dann in *E. coli* exprimiert und säulenchromatographisch gereinigt. Die funktionelle Aktivität des rekombinanten TBP und TFB von *Methanosarcina mazei* wurde im *in vitro* Transkriptionssystem von *Methanococcus thermolithotrophicus* nachgewiesen. Da die gereinigte RNA-Polymerase von *Methanosarcina mazei* keine spezifische Aktivität aufwies, wurde die RNA-Polymerase von *Methanococcus thermolithotrophicus* zur Verwendung in dem zellfreien Transkriptionssystem gereinigt.

Die Analyse der *in vitro* Transkription der Hitzeschockgene *grpE*, *dnaK* und *dnaJ* von *Methanosarcina mazei*, die *in vivo* in der Anordnung 5'-*grpE-dnaK-dnaJ*-3' vorkommen, zeigte, dass nur eine Transkription des *grpE* Gens erfolgt. Das durch Primer Extension bestimmte Startnukleotid der *in vitro* Transkription von *grpE* ist identisch mit dem *in vivo* Transkriptionsstart. Bei der Transkription des *dnaK* Gens ist nur ein sehr schwaches, eventuell sogar unspezifisches Transkript zu detektieren, und *dnaJ* lässt sich *in vitro* nicht transkribieren. Da es *in vivo* Hinweise auf eine monocistronische Transkription dieser Gene gibt, ist vermutlich eine Aktivierung der Transkription von *dnaK* und *dnaJ* erforderlich, worauf auch die wenig konservierte TATA-Box dieser Gene hindeutet. Eine auffällige fünffache direkte Sequenzwiederholung stromaufwärts des *dnaK* Gens war ohne Einfluss auf die *in vitro* Transkription.

Außerdem wurde das Gen des archaeellen Transkriptionsfaktors TFE kloniert, das Protein anschließend in *E. coli* exprimiert und säulenchromatographisch gereinigt. Die analysierte Aminosäuresequenz von TFE zeigt die typischen Charakteristika archaeeller Homologe. Die funktionelle Aktivität des rekombinanten Proteins wurde in dem etablierten zellfreien Transkriptionssystem nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass TFE die Transkription bei suboptimalen TBP Konzentrationen stark stimuliert, während bei optimaler TBP Konzentration kaum Stimulierung zu beobachten ist.

Eine eindeutige spezifische Inhibierung der *in vitro* Transkription des *glnK* Gens von *Methanosarcina mazei* durch den potentiellen Repressor AmtR konnte nicht gezeigt werden, da das Protein auch die Transkription anderer Gene, vermutlich durch unspezifische DNA Affinität, hemmt. Die Transkription des *glnK* Gens wird aber stärker inhibiert, und es konnte gezeigt werden, dass AmtR wahrscheinlich an eine potentielle Bindungsstelle 495 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts des *glnK* Gens bindet. Vorinkubationen von AmtR bzw. TBP und TFB mit dem Promotor des *glnK* Gens mit anschließender *in vitro* Transkription oder Gel-Retardationsexperimenten zeigten, dass AmtR nicht spezifisch an eine weitere potentielle Bindungsstelle im Bereich der TATA-Box bindet. AmtR retardiert aber unabhängig von der verwendeten DNA den DNA-TBP-TFB Komplex und vermag sogar einen DNA-TBP-AmtR Komplex auszubilden. Es erfolgt also in Anwesenheit von DNA eine Interaktion zwischen TBP und AmtR, ohne DNA konnte hingegen keine direkte TBP-AmtR Interaktion beobachtet werden. Diese Ergebnisse weisen auf eine regulatorische Funktion von AmtR hin.

VI Summary

To investigate the *Methanosarcina mazei* regulation of transcription, an *in vitro* transcription system with purified *Methanococcus thermolithotrophicus* RNA polymerase and recombinant TBP and TFB from *Methanosarcina mazei* was established. First, the *tfb* gene was identified in a genomic λ -genebank of *Methanosarcina mazei* S-6, then the gene was sequenced and cloned. Analysis of TBP and TFB amino acid sequences revealed characteristic archaeal features for these proteins. Then TBP and TFB were expressed in *E. coli* and purified by means of column-chromatography. The functional activity of recombinant TBP and TFB was demonstrated in the *in vitro* transcription system of *Methanococcus thermolithotrophicus*. The purified RNA polymerase from *Methanosarcina mazei* showed no specific activity, therefore the RNA polymerase from *Methanococcus thermolithotrophicus* was purified for the use in the cell-free transcription system.

Analysis of *in vitro* transcription of the *Methanosarcina mazei* heat shock genes *grpE*, *dnaK*, and *dnaJ*, which have the *in vivo* organization 5'-*grpE-dnaK-dnaJ*-3', showed only transcription of *grpE*. The *in vitro* transcriptional start site of *grpE*, determined by means of primer extension, is identical with the *in vivo* transcriptional start site. In transcription of the *dnaK* gene there is only a weak transcript detectable, which is possibly an unspecific one, and there is no transcription of *dnaJ*. *In vivo* there are hints for a monocistronic mode of transcription for these genes, so probably activation for transcription of *dnaK* and *dnaJ* is required, which is also suggested by the weakly conserved TATA-box of these genes. A noticeable fivefold direct repeat upstream of *dnaK* had no influence on *in vitro* transcription.

The gene of the archaeal transcription factor TFE was also cloned, afterwards the protein was expressed in *E. coli* and purified by means of column-chromatography. Analysis of the amino acid sequence revealed the typical characteristics of archaeal homologues. The functional activity of the recombinant protein was demonstrated in the established cell-free transcription system. It was shown that there is a strong stimulation of transcription when sub-optimal TBP concentrations were used, whereas at optimal TBP concentration only a weak stimulatory effect is detectable.

It was not possible to show a clear specific *in vitro* transcription inhibition for the *glnK* gene from *Methanosarcina mazei* by the potential repressor AmtR, because of the inhibitory effect of the protein on transcription of other genes as well, which is probably caused by an unspecific DNA affinity. Nevertheless the inhibitory effect on transcription of *glnK* is stronger, and it was shown that there is probably a binding of AmtR to a potential binding site 495 bp upstream of the transcriptional start site of the *glnK* gene. Preincubation of AmtR and TBP/TFB, respectively, with promoter DNA of *glnK*, followed by *in vitro* transcription or gel retardation assays showed that there is no specific binding of AmtR to another potential binding site in the TATA-box region. AmtR shifts unaffected by the used DNA the DNA-TBP-TFB complex, and AmtR even can form a DNA-TBP-AmtR complex. So in the presence of DNA there is an interaction between TBP and AmtR, but without DNA, there was no direct interaction detectable. These results indicate a regulatory function of AmtR.

VII Literaturverzeichnis

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

Arcondéguy T., Jack R. & Merrick M. (2001): P_{II} signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. *Microbial. Mol. Biol. Rev.* 65, 80-105.

Bardwell J. C. A., Tilly K., Craig E., King J., Zylicz M. & Georgopoulos C. (1986): The nucleotide sequence of the *Escherichia coli* K12 *dnaJ* gene. *J. Biol. Chem.* 261, 1782-1786.

Beckers G., Nolden L. & Burkovski A. (2001): Glutamate synthase of *Corynebacterium glutamicum* is not essential for glutamate synthesis and is regulated by the nitrogen status. *Microbiology* 147, 2961-2970.

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

Bell S. D. & Jackson S. P. (1998b): Transcription in Archaea. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 63, 41-51.

Bell S. D., Jaxel C., Nadal M., Kosa P. F. & Jackson S. P. (1998): Temperature, template topology, and factor requirements of archaeal transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 15218-15222.

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

Bell S. D., Cairns S. S., Robson R. L. & Jackson S. P. (1999b): Transcriptional regulation of an archaeal operon *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Cell.* 4, 971-982.

Bell S. D. & Jackson S.P. (2000a): The role of transcription factor B in transcription initiation and promoter clearance in the archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *J. Biol. Chem.* 275, 12934-12940.

Bell S. D. & Jackson S. P. (2000b): Mechanism of autoregulation by an archaeal transcriptional repressor. *J. Biol. Chem.* 275, 31624-31629.

Bell S. D., Brinkman A. B., van der Oost J. & Jackson S. P. (2001): The archaeal TFIIE α homologue facilitates transcription initiation by enhancing TATA-box recognition. *EMBO rep.* 2/2, 133-138.

Bradford M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgramm quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Brown J. W., Daniels C. J. & Reeve J. N. (1989): Gene structure, organization, and expression in archaebacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 16/4, 287-338.

Bukau B. (1993): Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. *Mol. Microbiol.* 9, 671-680.

- 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., Kerlavage A. R., Dougherty B. A., Tomb J. F., Adams M. D., Reich C. I., Overbeek R., Kirkness E. F., Weinstock K. G., Merrick J. M., Glodek A., Scott J. L., Geoghagen N. S. M. & Venter J. C. (1996):** Complete genome sequence of the methanogenic archaeon *Methanococcus jannaschii*. *Science* 273, 1058-1073.
- Burkovski A. (2003):** I do it my way: regulation of ammonium uptake and ammonium assimilation in *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* 179, 83-88.
- Clarens M., Macario A. J. L. & Conway de Macario E. (1995):** The archaeal *dnaK-dnaJ* gene cluster: organization and expression in the methanogen *Methanosarcina mazei*. *J. Mol. Biol.* 250/2, 191-201.
- Conway de Macario E., Dugan C. B. & Macario A. J. L. (1994):** Identification of a *grpE* heat-shock gene homolog in the archaeon *Methanosarcina mazei*. *J. Mol. Biol.* 240/1, 95-101.
- Conway de Macario E., Clarens M. & Macario A. J. L. (1995):** Archaeal *grpE*: transcription in two different morphologic stages of *Methanosarcina mazei* and comparison with *dnaK* and *dnaJ*. *J. Bacteriol.* 177/3, 544-550.
- Coleman R. A., Taggart A. K. P., Burma S., Chicca J. J. & Pugh B. F. (1999):** TFIIA regulates TBP and TFIID dimmers. *Mol. Cell.* 4, 451-457.
- Coutts G., Thomas G., Blakey D. & Merrick M. (2002):** Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. *EMBO J.* 21/4, 536-545.
- Dahlke I. & Thomm M. (2002):** A *Pyrococcus* homolog of the leucine-responsive regulatory protein, LrpA, inhibits transcription by abrogation RNA polymerase recruitment. *Nucl. Acids. Res.* 30/3, 701-710.
- Darcy T. J., Hausner W., Awery D. E., Edwards A., Thomm M. & Reeve J. N. (1999):** *Methanobacterium thermoautotrophicum* RNA polymerase and transcription *in vitro*. *J. Bacteriol.* 181, 4424-4429.
- Deppenmeier U., Johann A., Hartsch T., Merkl R., Schmitz R. A., Martinez-Arias R., Henne A., Wiezer A., Bäumer S., Jacobi C., Brüggemann H., Lienard T., Christmann A., Bömeke M., Steckel S., Bhattacharyya A., Lykidis A., Overbeek R., Klenk H.-P., Gunsalus R. P., Fritz H.-J. & Gottschalk G. (2002):** The genome of *Methanosarcina mazei*: evidence for lateral gene transfer between Bacteria and Archaea. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4/4, 453-461.
- Ehlers C., Grabbe R., Veit K. & Schmitz R. A. (2002a):** Characterization of GlnK₁ from *Methanosarcina mazei* strain Gö1: complementation of an *Escherichia coli* *glnK* mutant strain by GlnK₁. *J. Bacteriol.* 184/4, 1028-1040.
- Ehlers C., Veit K., Gottschalk G. & Schmitz R. A. (2002b):** Functional organization of a single *nif* cluster in the mesophilic archaeon *Methanosarcina mazei* strain Gö1. *Archaea* 1, 143-150.

- Fisher S. H.** (1999): Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la difference! *Mol. Microbiol.* 32, 223-232.
- Frey G., Thomm M., Brüdigam B., Gohl H.-P. & Hausner W.** (1990): An archaeobacterial cell-free transcription system. The expression of tRNA genes from *Methanococcus vannielii* is mediated by a transcription factor. *Nucl. Acids Res.* 18/6, 1361-1367.
- Gabrielsen O. S. & Huet J.** (1993): Magnetic DNA affinity purification of yeast transcription factor. *Methods Enzymol.* 218, 508-525.
- Gelfand M. S., Koonin E. V. & Mironov A.A.** (2000): Prediction of transcription regulatory sites in Archaea by a comparative genomic approach. *Nucl. Acids Res.* 28/3, 695-705.
- Gohl H. P., Gröndahl B. & Thomm M.** (1995): Promoter recognition in archaea is mediated by transcription factors: identification of transcription factor aTFB from *Methanococcus thermolithotrophicus* as archaeal TATA-binding protein. *Nucl. Acids Res.* 23, 3837-3841.
- Gomes S. L., Guber J. W. & Shapiro L.** (1990): Expression of the *Caulobacter* heat-shock gene *dnaK* is developmentally controlled during growth at normal temperatures. *J. Bacteriol.* 172, 3051-3059.
- Gribaldo S., Lumia V., Creti R., Conway de Macario E., Sanangelantoni A. & Cammarano P.** (1999): Discontinuous occurrence of the *hsp70* (*dnaK*) gene among Archaea and sequence features of Hsp70 suggest a novel outlook on phylogenies inferred from this protein. *J. Bacteriol.* 181/2, 434-443.
- Gupta R. S. & Singh B.** (1992): Cloning of the *hsp70* gene from *Halobacterium marismortui*: relatedness of archaeobacterial Hsp70 to its eubacterial homologs and a model for the evolution of the *hsp70* gene. *J. Bacteriol.* 174, 4594-4605.
- Gupta R. S. & Singh B.** (1994): Phylogenetic analysis of 70 kDa heat shock protein sequences suggests a chimeric origin for the eukaryotic cell nucleus. *Curr. Biol.* 4, 1104-1114.
- Hain J., Reiter W.-D., Hüdepohl U. & Zillig W.** (1992): Elements of an archaeal promoter defined by mutational analysis. *Nucl. Acids Res.* 20, 5423-5428.
- Hansen S. K., Takada S., Jacobson R. H., Lis J. T. & Tjian R.** (1997): Transcription properties of a cell type-specific TATA-binding protein, TRF. *Cell* 91, 71-83.
- Hanzelka B. L., Darcy T. J. & Reeve J. N.** (2001): TFE, an archaeal transcription factor in *Methanobacterium thermoautotrophicum* related to eucaryal transcription factor TFIIIE α . *J. Bacteriol.* 183/5, 1813-1818.
- 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.* 222/3, 495-508.

- Hausner W. & Thomm M.** (1993): Purification and characterization of a general transcription factor, aTFB, from the archaeon *Methanococcus thermolithotrophicus*. *J. Biol. Chem.* 268/32, 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. & Musfeldt M.** (2000): Transcription factor S, a cleavage induction factor of the archaeal RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 275/17, 12393-12399.
- Hecker M., Schumann W. & Völker U.** (1996): Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 19/3, 417-428.
- Hethke C.** (1993): Untersuchungen zur Termination der Transkription bei *Methanococcus*. Diplomarbeit, Universität Kiel.
- Hethke C., Geerling A. C. M., Hausner W., de Vos W. M. & Thomm M.** (1996): A cell-free transcription system for the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Nucl. Acids Res.* 24/12, 2369-2376.
- Hochheimer A., Hedderich R. & Thauer R. K.** (1999): The DNA binding protein Tfx from *Methanobacterium thermoautotrophicum*: structure, DNA binding properties and transcriptional regulation. *Mol. Microbiol.* 32, 641-650.
- Hofman-Bang J., Lange M., Conway de Macario E., Macario A. J. L. & Ahring B. K.** (1999): The genes coding for the *hsp70* (*dnaK*) molecular chaperone machine occur in the moderate thermophilic archaeon *Methanosarcina thermophila* TM-1. *Gene* 238, 387-395.
- Homuth G., Masuda S., Mogk A., Kobayashi Y. & Schumann W.** (1997): The *dnaK* operon of *Bacillus subtilis* is heptacistronic. *J. Bacteriol.* 179, 1153-1164.
- Innis M. A., Myambo K. B., Gelfand D. H. & Brow M. A. D.** (1988): DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction amplified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 9436-9440.
- Inostroza J., Flores O. & Reinberg D.** (1991): Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Purification and functional analysis of general transcription factor IIE. *J. Biol. Chem.* 266, 9304-9308.
- Jakoby M., Krämer R. & Burkovski A.** (1999): Nitrogen regulation in *Corynebacterium glutamicum*: isolation of genes involved and biochemical characterization of the corresponding proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 173, 303-310.

- Jakoby M., Nolden L., Meier-Wagner J., Krämer R. & Burkovski A.** (2000): AmtR, a global repressor in the nitrogen regulation system of *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* 37, 964-977.
- Kim T.-Y., Ebricht R. H. & Reinberg D.** (2000): Mechanism of ATP-dependent promoter melting by TFIIH. *Science* 288, 1418-1421.
- Krüger K., Hermann T., Armbruster V. & Pfeifer F.** (1998): The transcriptional activator GvpE for the halobacterial gas vesicle genes resembles a basic region leucine-zipper regulatory protein. *J. Mol. Biol.* 279, 761-771.
- Kuldell N. H. & Buratowski S.** (1997): Genetic analysis of the large subunit of yeast transcription factor IIE reveals two regions with distinct functions. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5288-5298.
- Kuo Y.-P., Thompson D. K., St. Jean A., Charlebois R. L. & Daniels C. J.** (1997): Characterization of two heat shock genes from *Haloferax volcanii*: a model system for transcription regulation in the Archaea. *J. Bacteriol.* 179/20, 6318-6324.
- Kyrpides N. C. & Ouzounis C. A.** (1999): Transcription in Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8545-8550.
- Lagrange T., Kapanidis A. N., Tang H., Reinberg D. & Ebricht R. H.** (1998): New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev.* 12, 34-44.
- Lane D. J., Pace B., Olsen G. J., Stahl D. A., Sogin M. L. & Pace N. R.** (1985): Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6955-6959.
- Lange M., Macario A. J. L., Ahring B. K. & Conway de Macario E.** (1997): Heat-shock response in *Methanosarcina mazei* S-6. *Curr. Microbiol.* 35, 116-121.
- Langer D., Hain J., Thuriaux P. & Zillig W.** (1995): Transcription in Archaea: similarity to that in Eukarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5768-5772.
- Lie T. J. & Leigh J. A.** (2002): Regulatory response of *Methanococcus maripaludis* to alanine, an intermediate nitrogen source. *J. Bacteriol.* 184/19, 5301-5306.
- Lie T. J. & Leigh J. A.** (2003): A novel repressor of *nif* and *glnA* expression in the methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*. *Mol. Microbiol.* 47/1, 235-246.
- Littlefield O., Korkhin Y. & Sigler P. B.** (1999): The structural basis for the oriented assembly of a TBP/TFB/promoter complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96/24, 13668-13673.
- Macario A. J. L., Dugan C. B. & Conway de Macario E.** (1991): A *dnaK* homolog in the archaeobacterium *Methanosarcina mazei* S-6. *Gene* 108/1, 133-137.
- Macario A. J. L. & Conway de Macario E.** (1997): Stress genes: an introductory overview. *Stress* 1, 123-134.

- Macario A. J. L., Lange M., Ahring B. K. & Conway de Macario E.** (1999): Stress genes and proteins in the Archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63/4, 923-967.
- Macario A. J. L. & Conway de Macario E.** (1999): The archaeal molecular chaperone machine: peculiarities and paradoxes. *Genetics* 152, 1277-1283.
- Mager W. H. & de Kruijff A. J.** (1995): Stress-induced transcriptional activation. *Microbiol Rev.* 59/3, 506-531.
- Marsh J. L., Erfle M. & Wykes E. J.** (1984): The pIC plasmid and phage vectors with versatile cloning sites for recombinant selection by insertional inactivation. *Gene* 32, 481-485.
- Martin J. & Hartl F. U.** (1997): Chaperone-assisted protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 41-52.
- Maxon M. E. & Tjian R.** (1994): Transcriptional activity of transcription factor IIE is dependent on zinc binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9529-9533.
- Maxon M. E., Goodrich J. A. & Tjian R.** (1994): Transcription factor IIE binds preferentially to RNA polymerase II and recruits TFIIH: a model for promoter clearance. *Genes Dev.* 8, 515-524.
- Merrick M. J. & Edwards R. A.** (1995): Nitrogen control in bacteria. *Microbiol. Rev.* 59, 604-622.
- Morimoto R. I.** (1998): Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* 12, 3788-3796.
- Murray V.** (1989): Improved double-stranded DNA sequencing using linear polymerase chain reaction. *Nucl. Acids Res.* 17, 8889.
- Naji S.** (2000): Untersuchungen zur Regulation der Transkription bei *Methanosarcina*. Diplomarbeit, Universität Kiel.
- Narberhaus F., Giebeler K. & Bahl H.** (1992): Molecular characterization of the *dnaK* gene region of *Clostridium acetobutylicum* including *grpE*, *dnaJ*, and a new heat shock gene. *J. Bacteriol.* 174, 3290-3299.
- Narberhaus F.** (1999): Negative regulation of bacterial heat shock genes. *Mol. Microbiol.* 31/1, 1-8.
- Nolden L., Farwick M., Krämer R. & Burkovski A.** (2001a): Glutamine synthetases in *Corynebacterium glutamicum*: transcriptional control and regulation of activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 201, 91-98.
- Nolden L., Ngouoto-Nkili C.-E., Bendt A. K., Krämer R. & Burkovski A.** (2001b): Sensing nitrogen limitation in *Corynebacterium glutamicum*: the role of *glnK* and *glnD*. *Mol. Microbiol.* 42/5, 1281-1295.

- Ohkuma Y., Hashimoto S., Wang C. K., Horikoshi M. & Roeder R. G.** (1995): Analysis of the role of TFIIE in basal transcription and TFIIF-mediated carboxy-terminal domain phosphorylation through structure-function studies of TFIIE α . *Mol. Cell. Biol.* 15, 4856-4866.
- Palmer J. R. & Daniels C. J.** (1995): *In vivo* definition of an archaeal promoter. *J. Bacteriol.* 177, 1844-1849.
- Parvin J. D. & Sharp P. A.** (1993): DNA topology and a minimal set of basal factors for transcription by RNA polymerase II. *Cell* 73/3, 533-540.
- Qureshi S. A., Bell S. D. & Jackson S. P.** (1997): Factor requirements for transcription in the archaeon *Sulfolobus shibatae*. *EMBO J.* 16, 2927-2936.
- Qureshi S. A. & Jackson S. P.** (1998): Sequence-specific DNA binding by the *S. shibatae* TFIIB homolog, TFB, and its effect on promoter strength. *Mol. Cell* 1, 389-400.
- Rassow J., von Ahsen O., Bömer U. & Pfanner N.** (1997): Molecular chaperones: towards a characterization of the heat-shock protein 70 family. *Trends Cell. Biol.* 7, 129-133.
- Reeve J. N., Sandman K. & Daniels C. J.** (1997): Archaeal histones, nucleosomes and transcription initiation. *Cell* 87, 999-1002.
- 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 *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 9509-9513.
- Ren L., Chen H. & Sternberg E. A.** (1994): Tethered bandshift assay and affinity purification of a new DNA-binding protein. *Bio Techniques* 16/5, 852-855.
- Rensing S. A. & Maier U.-G.** (1994): Phylogenetic analysis of the stress-70 protein family. *J. Mol. Evol.* 39, 80-86.
- Rowlands T., Baumann P. & Jackson S. P.** (1994): The TATA-binding protein: a general transcription factor in eukaryotes and archaeobacteria. *Science* 264, 1326-1329.
- 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 diagnostic 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 thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 489-491.
- Sakurai H., Ohishi T. & Fukasawa T.** (1997): Promoter structure-dependent functioning of the general transcription factor IIE in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 272, 15936-15942.
- Sambrook J., Fritsch E. F. & Maniatis T.** (1989): Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York.

Sanger F., Nicklen S. & Coulson A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5468.

Satyal S. H., Chen H., Fox S. G., Kramer J. M. & Morimoto R. I. (1998): Negative regulation of the heat shock transcriptional response by HSBP1. *Genes Dev.* 12, 1962-1974.

Shockley K. R., Ward D. E., Chhabra S. R., Connors S. B., Montero C. I. & Kelly R. M. (2003): Heat shock response by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69/4, 2365-2371.

Smith D. R., Doucette-Stamm L. A., Deloughery C., Lee H., Dubois J., Aldredge T., Bashirzadeh R., Blakely D., Cook R., Gilbert K., Harrison D., Hoang L., Keagle P., Lumm W., Pothier B., Qui D., Spadafora R., Vicaire R., Wang Y., Wiezbowski J., Gibson R., Jiwani N., Caruso A., Bush D. & Reeve J. N. (1997): Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* δ H: functional analysis and comparative genomics. *J. Bacteriol.* 179, 7135-7155.

Soppa J. (1999a): 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.* 31/5, 1589-1592.

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

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

Thompson D. K. & Daniels C. J. (1998): Heat shock inducibility of an archaeal TATA-like promoter is controlled by adjacent sequence elements. *Mol. Microbiol.* 27/3, 541-551.

Thompson D. K., Palmer J. R. & Daniels C. J. (1999): Expression and heat-responsive regulation of a TFIIB homologue from the archaeon *Haloferax volcanii*. *Mol. Microbiol.* 33/5, 1081-1092.

Thomsen J. (1998): Klonierung von Transkriptionsfaktoren aus *Methanosarcina*. Diplomarbeit, Universität Kiel.

Thomsen J., De Biase A., Kaczanowski S., Macario A. J. L., Thomm M., Zielenkiewicz P., MacColl R. & Conway de Macario E. (2001): The basal transcription factors TBP and TFB from the mesophilic archaeon *Methanosarcina mazei*: structure and conformational changes upon interaction with stress-gene promoters. *J. Mol. Biol.* 309, 589-603.

Trent J. D. (1996): A review of acquired thermotolerance, heat-shock proteins, and molecular chaperones in Archaea. *FEMS Microbiol. Rev.* 18, 249-258.

Vierke G., Engelmann A., Hebbeln C. & Thomm M. (2003): A novel archaeal transcriptional regulator of heat shock response. *J. Biol. Chem.* 278/1, 18-26.

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. USA* 92, 472-476.

Yanisch-Perron C., Vieira J. & Messing J. (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.

Yokomori K., Verrijzer C. P. & Tjian R. (1998): An interplay between TATA box-binding protein and transcription factors IIE and IIA modulates DNA-binding and transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6722-6727.

VIII Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AMV	Avian-Myeloblastosis-Virus
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
BRE	Transcription factor B recognition element
BSA	bovine serum albumin
cDNA	copy-DNA
Ci	Curie
cpm	counts per minute
ddNTP	Didesoxyribonucleosidtriphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNaseI	DesoxyribonukleaseI, EndonukleaseI
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii (und andere)
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
h	Stunde
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
M	Molar (Mol pro Liter)
mA	Milliampere
min	Minute
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
NTP	Ribonucleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
PA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglykol
pfu	plaque forming units
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
poly-[d(A-T)]	poly-Desoxyadenosin-Desoxythymidin
poly-[d(I-C)]	poly-Desoxyinosin-Desoxycytidin
<i>Pwo</i>	<i>Pyrococcus woesei</i>
RBS	Ribosomenbindungsstelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
S100	nach Zentrifugation bei 100000 g in der Ultrazentrifuge

SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBP	TATA-Binde-Protein
TCA	Tri-chloro acetic acid (Trichloressigsäure)
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFB	Transkriptionsfaktor B (archaeelles Homolog zu TFIIB)
TFIIB	Transkriptionsfaktor B der eukaryellen RNA-Polymerase II
TFIIE	Transkriptionsfaktor E der eukaryellen RNA-Polymerase II
TFE	Transkriptionsfaktor E (archaeelles Homolog zu TFIIE)
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl-)aminomethan
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
U	Unit
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen

Symbole für den Nukleinsäurecode:

A	Desoxyadenosin
B	Desoxycytidin/-guanosin/-thymidin
C	Desoxycytidin
D	Desoxyadenosin/-guanosin/-thymidin
G	Desoxyguanosin
H	Desoxyadenosin/-cytidin/-guanosin
I	Desoxyinosin
K	Desoxyguanosin/-thymidin
M	Desoxyadenosin/-cytidin
N	Desoxyadenosin/-cytidin/-guanosin/-thymidin
R	Desoxyadenosin/-guanosin
S	Desoxycytidin/-guanosin
T	Desoxythymidin
U	Uracil
V	Desoxyadenosin/-cytidin/-guanosin
W	Desoxyadenosin/-thymidin
X	Desoxycytidin/-inosin
Y	Desoxycytidin/-thymidin

Symbole für den Aminosäurecode:

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
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Michael Thomm für die Vergabe des interessanten Themas und die Betreuung dieser Arbeit bedanken. Sein Interesse und seine Diskussionsbereitschaft haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn PD Dr. Winfried Hausner danke ich sehr für seine ständige Gesprächsbereitschaft und die vielen wertvollen Ratschläge, die mir eine große Hilfe waren.

Bei Frau Prof. Dr. Everly Conway de Macario möchte ich mich für die Bereitstellung der genomischen DNA von *Methanosarcina mazei* S-6 und der λ -Genbank sowie die Diskussionen während ihres Besuchs in Kiel und per Email bedanken. Mein besonderer Dank gilt ihr auch für die gemeinsame Veröffentlichung unserer Daten.

Frau PD Dr. Ruth Schmitz-Streit danke ich sehr für die Überlassung des rekombinanten AmtR Proteins und für ihre ständige Diskussionsbereitschaft per Telefon und Email.

Außerdem möchte ich Souad Naji und Lutz Thon für ihre Unterstützung während ihrer Zeit als Diplomandin bzw. Praktikant danken.

Dr. Udo Lange und Bernd Goede danke ich ganz besonders für die gute Kameradschaft und angenehme Laborgemeinschaft sowie den Spaß zwischen den Versuchen.

Außerdem möchte ich allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des Instituts für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und all denjenigen danken, die mich in irgendeiner Weise während meiner Promotion unterstützt haben.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich ganz besonders herzlich dafür, dass sie mich zu jeder Zeit und in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei meiner Freundin Manuela Drewes und ihrer Familie für die Geduld und Unterstützung während aller Höhen und Tiefen dieser Arbeit bedanken.

Erklärung

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

Teilergebnisse dieser Arbeit sind bereits in folgendem Artikel veröffentlicht worden:

Thomsen J., De Biase A., Kaczanowski S., Macario A. J. L., Thomm M., Zielenkiewicz P., MacColl R. & Conway de Macario E. (2001): The basal transcription factors TBP and TFB from the mesophilic archaeon *Methanosarcina mazei*: structure and conformational changes upon interaction with stress-gene promoters. *J. Mol. Biol.* 309, 589-603.

Die Ergebnisse der Veröffentlichung wurden in Kooperation mit Prof. Dr. E. Conway de Macario (Albany, New York, USA) erarbeitet.

Ich habe folgendes zu dieser Veröffentlichung beigetragen:

- Identifizierung, Sequenzierung, Klonierung, Expression und Reinigung von *Methanosarcina mazei* *tbp* bzw. TBP und *tfb* bzw. TFB
- Datenbankrecherche, Sequenzvergleiche und Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen für TBP und TFB/TFIIB
- Nachweis der funktionellen Aktivität des rekombinanten *Methanosarcina mazei* TBP und TFB in der *in vitro* Transkription

Kiel, den

.....

(Jens Thomsen)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name **Jens Thomsen**

Anschrift Esmarchstr. 90, 24118 Kiel

Geburtsdatum 10.08.1968 in Heide

Staatsangehörigkeit deutsch

Familienstand in fester Partnerschaft lebend

Schulbildung

1975-1979 Grundschule Blumenstraße in Heide

1979-1988 Werner-Heisenberg-Gymnasium in Heide
03.06.1988 Abitur

Wehrdienst

1988-1989 ABC Abwehr Kp 6 in Albersdorf

Praktische Tätigkeit

1989-1991 Fahrradmonteur bei der Firma Heinrich Böttcher GmbH & Co. KG in Wesseln

Studium

WS 1991/92-SS1998 Diplomstudiengang Biologie mit dem Hauptfach Mikrobiologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

14.04.1998 Diplom mit der Note sehr gut

Berufstätigkeit

1998-2001 Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Beginn der Promotion mit dem Thema: Untersuchungen zur Regulation der Transkription bei *Methanosarcina mazei*