

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung  
der Philipps-Universität Marburg  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Müller

---

**Reinigung des Transkriptionsfaktors IIC1 der  
RNA-Polymerase III und Identifizierung potentieller  
TFIIC1-Untereinheiten**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie

dem Fachbereich Humanmedizin der  
Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Heike Manuela Hafner**  
aus Würzburg

Marburg/Lahn 2002

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg am: 10. Juli 2003  
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches.  
Dekan: Prof. Dr. Maisch  
Referent: Prof. Dr. Dr. K. H. Seifart  
Correferent: Prof. Dr. K.-H. Röhm

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1-20</b>
<b>1.1</b>	<b>Die DNA-abhängigen RNA-Polymerasen</b>	<b>1</b>
1.1.1	Die RNA-Polymerasen I und II	2
1.1.2	Die RNA-Polymerase III	2
<b>1.2</b>	<b>Die Promotorstruktur der Polymerase-III-abhängigen Gene</b>	<b>4</b>
1.2.1	AC-Typ-Promotoren (Typ 1)	4
1.2.2	AB-Typ-Promotoren (Typ 2)	4
1.2.3	5'-regulierte Gene mit Promotorelementen im Upstreambereich (Typ 3)	6
<b>1.3</b>	<b>Faktorbedarf der Polymerase-III-abhängigen Gene</b>	<b>7</b>
<b>1.4</b>	<b>Die Transkriptionsfaktoren der Polymerase III</b>	<b>7</b>
1.4.1	TFIIIA	7
1.4.2	TFIIB	8
1.4.3	TFIIC	9
1.4.4	TBP	12
1.4.5	PBP	13
<b>1.5</b>	<b>Der Transkriptionszyklus im Polymerase-III-System</b>	<b>14</b>
1.5.1	Sequenzieller Aufbau des Initiationskomplexes	14
1.5.2	Initiation, Elongation, Termination und Reinitiation	16
<b>1.6</b>	<b>Das Retinoblastoma-Protein (Rb)</b>	<b>17</b>
<b>1.7</b>	<b>Der Positive Cofactor 4 (PC4) und die DNA-Topoisomerase I</b>	<b>19</b>
<b>1.8</b>	<b>Die Proteinkinase CK2</b>	<b>20</b>
<b>1.9</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>21-24</b>
<b>3</b>	<b>METHODEN</b>	<b>25-57</b>
<b>3.1</b>	<b>Anzucht und Stammhaltung von Bakterien</b>	<b>25</b>
<b>3.2</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>25</b>
3.2.1	Anzucht menschlicher Tumorzellen in Suspensionskultur	25
<b>3.3</b>	<b>Präparation zellfreier Extrakte</b>	<b>26</b>
3.3.1	Präparation von zytoplasmatischem Extrakt (S100) aus HeLa- oder HEK-Zellen (nach WEIL et al., 1979)	26

3.3.2	Präparation von Kernextrakt (modifiziert nach SHAPIRO et al., 1988)	27
<b>3.4</b>	<b>Gelelektrophoretische Methoden</b>	<b>28</b>
3.4.1	Agarose-Gele	28
3.4.2	Denaturierende Polyacrylamid-Harnstoff-Gele	28
3.4.3	Native Polyacrylamid-Gele für DNA-Analysen	29
3.4.4	Nicht denaturierende Gele zur Auftrennung von nativen Protein-DNA-Komplexen (EMSA-Gele)	30
3.4.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (nach LAEMMLI, 1970)	31
<b>3.5</b>	<b>Arbeiten mit Proteinen</b>	<b>32</b>
3.5.1	Reinigung von Proteinfractionen über Niederdruck-Chromatographie (Liquid Chromatography, LC), Phosphocellulose	32
3.5.2	Reinigung von Proteinfractionen über Mitteldruck-Chromatographie	33
3.5.2.1	Anionenaustauscher	33
3.5.2.2	Kationenaustauscher	33
3.5.2.3	Gelfiltration, „Size Exclusion Chromatography“ (SEC)	34
3.5.2.4	Hydrophobe Interaktions-Chromatographie	35
3.5.3	Präparation von Transkriptionsfaktoren und der Polymerase III	35
3.5.3.1	Weitere chromatographische Trennung der PCB und PCC	36
3.5.3.2	Präparation von TFIIB und Polymerase III	36
3.5.3.3	Präparation der Pol III über single-strand-DNA-Cellulose	37
3.5.3.4	Weitere Reinigung von TFIIC1/TFIIC0 über MonoS-Chromatographie	37
3.5.3.5	Präparation einer über Phosphocellulose rechromatographierten TFIIC2-Fraktion	38
3.5.4	Fällung von Proteinen mit Ammoniumsulfat	38
3.5.5	Proteinkonzentrationsbestimmung durch kolorimetrische Proteinquantifizierung (BRADFORD, 1976)	38
3.5.6	Dialyse von Proteinlösungen	39
3.5.7	Immunodetektion von Proteinen (Western-Blot)	39
3.5.7.1	Transfer elektrophoretisch getrennter Proteine auf PVDF-Transfermembran	40
3.5.7.2	Nachweis spezifischer Proteine durch Antigen-Antikörper-Wechselwirkung	41
3.5.8	<i>In vitro</i> -Biotinylierung von Proteinen mit dem EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit von Pierce	42
3.5.9	Nachweis biotinylierter Proteine mit dem ImmunoPure®UltraSensitive ABC Peroxidase Staining Kit von Pierce	42
3.5.10	Konzentrieren von Proteinlösungen für SDS-Gel-Elektrophorese mit StrataClean™ Resin	42
3.5.11	Anfärben von Proteinen mit Coomassie Brilliant Blue	43
3.5.12	Silberfärbung von Proteingelen nach BLUM et al., 1987	43
<b>3.6</b>	<b>Arbeiten mit Nukleinsäuren</b>	<b>44</b>
3.6.1	Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli für analytische Zwecke („Mini-Screen“)	44
3.6.2	Präparative Plasmid-Isolierung mittels Qiagen Tip-2500-Säulen	45
3.6.3	Phenolisierung von Nukleinsäuren	46
3.6.4	Fällung von Nukleinsäuren unter Standardbedingungen	46

3.6.5	Bestimmung der Konzentration von Desoxyribonukleinsäuren	46
3.6.6	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	47
3.6.7	Spaltung der DNA mit Restriktionsenzymen	48
3.6.8	Färbung von Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid	48
3.6.9	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Polyacrylamid-Gelen mittels Elektroelution	49
3.6.10	Dephosphorylierung linearisierter DNA	50
3.6.11	Auffüllen 5'-überhängender Enden	50
3.6.12	Ligation von DNA	51
3.6.13	Transformation	51
3.6.14	Selektion positiver Transformanten	52
3.6.15	Abtrennung der freien Nukleotide von DNA-Fragmenten	53
3.6.16	Radioaktive 5'-Endmarkierung von ds- oder ss-DNA	53
<b>3.7</b>	<b><i>In vitro</i>-Transkription</b>	<b>53</b>
3.7.1	a) Reaktion ohne Vorinkubation – „Standard-Transkription“	54
	b) Reaktion mit Vorinkubation zur Komplexassemblierung und Isolierung mittels Gelfiltration	54
3.7.2	Aufarbeitung von RNA aus <i>in vitro</i> -Transkriptionsansätzen	55
<b>3.8</b>	<b>Nachweis von Protein-DNA-Interaktion</b>	<b>56</b>
3.8.1	„Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA)	56
<b>3.9</b>	<b>Bestimmung radioaktiver Strahlung</b>	<b>56</b>
3.9.1	Qualitativ durch Autoradiographie	56
3.9.2	Quantitativ durch Bestimmung der Szintillationsstrahlung	57
3.9.3	Qualitativ und quantitativ mittels Analyse durch einen Phosphor Imager	57
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>58-115</b>
<b>4.1</b>	<b>Untersuchungen zur Funktion von TFIIC1</b>	<b>59</b>
4.1.1	Der Transkriptionsfaktor IIC1 wird für die Transkription aller Polymerase-III-abhängigen Gene essentiell benötigt	59
4.1.2	Überprüfung der Spezifität der TFIIC2-Bindungsverstärkung an den AB-Box-Genen durch TFIIC1	60
4.1.2.1	Aktivitätsnachweis der erhitzten TFIIC1-Fraktion in der <i>in vitro</i> -Transkription	61
4.1.2.2	Aktivitätsnachweis der erhitzten Fraktionen im EMSA	63
4.1.3	Einfluss der DNA-Topoisomerase I auf das Polymerase-III-Transkriptionssystem	66
4.1.4	Überprüfung eines möglichen Zusammenhangs zwischen TFIIC1 und CK2	67
<b>4.2</b>	<b>Reinigung von TFIIC1</b>	<b>72</b>
4.2.1	Standard-Reinigungsverfahren für TFIIC1	72
4.2.2	Phosphocellulose- und MonoQ-Chromatographie	73
4.2.3	Hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC)	73

4.2.4	Optimierung der Reinigungsstrategie auf Stufe der Phosphocellulose	77
4.2.5	Reinigung von TFIIIC1 über eine MonoS-Chromatographie	78
4.2.5.1	Untersuchungen zum Rb-Gehalt der MonoS-Fractionen	80
4.2.5.2	Überprüfung des Effektes bei Zugabe einer Rb-haltigen Fraktion zu einem aktiven <i>in vitro</i> -Transkriptionssystem	82
4.2.5.3	Untersuchung der beiden Aktivitätspeaks der MonoS-Chromatographie	84
4.2.6	Weitere Reinigung von TFIIIC1 mittels Rechromatographie über MonoQ	86
4.2.7	Reinigung des Transkriptionsfaktors IIIC1-like über MonoS-Chromatographie	89
4.2.7.1	Identifizierung TFIIIC1-like-haltiger MonoS-Fractionen in der <i>in vitro</i> -Transkription	90
4.2.7.2	SDS-PAGE mit MS-TFIIIC1- und MS-TFIIIC1-like-Fractionen und Analyse nach der Silberfärbung	91
4.2.8	Weitere Reinigung von TFIIIC1-like mittels Rechromatographie über MonoQ	93
4.2.8.1	Analyse der rechromatographierten MonoQ-TFIIIC1-like-Fractionen über SDS-PAGE	94
4.2.9	<i>In vitro</i> -Biotinylierung von TFIIIB -, TFIIIC2- und TFIIIC1-haltigen Fractionen	96
4.2.9.1	S400-Gelfiltration zur Isolierung von Transkriptionskomplexen, die mit teilweise biotinylierten Fractionen am VA I-Fragment assembliert wurden	98
4.2.9.2	SDS-PAGE mit den gereinigten Transkriptionskomplexen und Nachweis der darin enthaltenen biotinylierten Proteine mit Hilfe des ABC-Kits	100
4.2.9.3	Weitere SDS-PAGE mit den gereinigten Transkriptionskomplexen und Nachweis der darin enthaltenen biotinylierten Proteine mit Hilfe des ABC-Kits	102
4.2.10	Reinigung von Transkriptionskomplexen am VA I-Plasmid über Gelfiltration (S500)	104
4.2.10.1	Analyse der über S500-Gelfiltration gereinigten, unterschiedlich zusammengesetzten Transkriptionskomplexe in der <i>in vitro</i> -Transkription	106
4.2.10.2	Western-Blot-Analyse der vollständigen Transkriptionskomplexe auf die enthaltenen Transkriptionsfaktoren und die Polymerase III	111
4.2.11	SDS-PAGE mit den Komplex-haltigen Fractionen der verschiedenen Gelfiltrationsläufe	112
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>116-134</b>
<b>5.1</b>	<b>Untersuchungen zur Funktion von TFIIIC1</b>	<b>117</b>
5.1.1	TFIIIC1 ist ein essentiell notwendiger Transkriptionsfaktor für die Polymerase-III-Transkription	117
5.1.2	Bei der TFIIIC2-Bindungsverstärkung an den AB-Box-Genen in Anwesenheit von TFIIIC1 handelt es sich um einen unspezifischen Effekt	117
5.1.3	Die Beziehung von TFIIIC1 zu anderen, die Polymerase-III-Transkription beeinflussenden Proteinen	119
5.1.3.1	Die DNA-Topoisomerase I kann ein vollständig rekonstituiertes Transkriptionssystem nicht stimulieren und im TFIIIC1-defizienten System TFIIIC1 funktionell nicht ersetzen	119
5.1.3.2	Die Proteinkinase CK2 ist weder mit TFIIIC1 identisch noch in der TFIIIB - Fraktion nachweisbar	120

<b>5.2</b>	<b>Reinigung von TFIIIC1</b>	<b>122</b>
5.2.1	Die optimierte Phosphocellulose-Chromatographie führt zur Aufspaltung der TFIIIC1-Aktivität (PC <sub>0,35-0,45</sub> und PC <sub>0,45-0,6</sub> )	123
5.2.2	Die hydrophobe Interaktions-Chromatographie	124
5.2.3	Die TFIIIC1-Reinigung über MonoS	124
5.2.3.1	Über die MonoS-Chromatographie werden zwei verschiedene Formen von TFIIIC1 voneinander getrennt	124
5.2.3.2	Die MonoS-Chromatographie zeigt eine sehr hohe Reinigungseffizienz und einen guten Aktivitätserhalt	125
5.2.3.3	Rb wird über die MonoS von TFIIIC1 abgetrennt	126
5.2.3.4	Rb hat keinen negativen Einfluss auf die <i>in vitro</i> -Transkription	126
5.2.4	Die Reinigung des Transkriptionsfaktors IIC1-like	127
5.2.4.1	Die MonoS-Chromatographie	127
5.2.4.2	Liegt die TFIIIC1-Aktivität in verschiedenen Zustandsformen vor?	128
5.2.5	Die Gelfiltration	129
5.2.6	Isolierung vollständiger Transkriptionskomplexe über eine S400-Gelfiltration unter Verwendung von biotinyliertem TFIIIC1	130
5.2.6.1	Die <i>in vitro</i> -Biotinylierung eignet sich nur bedingt für den Nachweis von Polypeptiden	131
5.2.7	Über eine S500-Gelfiltration lassen sich sowohl vollständige als auch partielle VA I-Transkriptionskomplexe isolieren	131
5.2.7.1	Analyse der gereinigten VA I-Transkriptionskomplexe	132
5.2.8	Identifizierung potentieller TFIIIC1-Untereinheiten	132
5.2.9	Vergleich der im Verlauf der TFIIIC1-Reinigung erhaltenen Ergebnisse zur Polypeptidzusammensetzung von TFIIIC1	133
5.2.10	Ausblick	134
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>135-136</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>137-139</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>140-151</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>152-155</b>
9.1	Akademische Lehrer	152
9.2	Ehrenwörtliche Erklärung	153
9.3	Danksagung	154
9.4	Lebenslauf	155

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1-20</b>
<b>1.1</b>	<b>Die DNA-abhängigen RNA-Polymerasen</b>	<b>1</b>
1.1.1	Die RNA-Polymerasen I und II	2
1.1.2	Die RNA-Polymerase III	2
<b>1.2</b>	<b>Die Promotorstruktur der Polymerase-III-abhängigen Gene</b>	<b>4</b>
1.2.1	AC-Typ-Promotoren (Typ 1)	4
1.2.2	AB-Typ-Promotoren (Typ 2)	4
1.2.3	5'-regulierte Gene mit Promotorelementen im Upstreambereich (Typ 3)	6
<b>1.3</b>	<b>Faktorbedarf der Polymerase-III-abhängigen Gene</b>	<b>7</b>
<b>1.4</b>	<b>Die Transkriptionsfaktoren der Polymerase III</b>	<b>7</b>
1.4.1	TFIIIA	7
1.4.2	TFIIB	8
1.4.3	TFIIC	9
1.4.4	TBP	12
1.4.5	PBP	13
<b>1.5</b>	<b>Der Transkriptionszyklus im Polymerase-III-System</b>	<b>14</b>
1.5.1	Sequenzieller Aufbau des Initiationskomplexes	14
1.5.2	Initiation, Elongation, Termination und Reinitiation	16
<b>1.6</b>	<b>Das Retinoblastoma-Protein (Rb)</b>	<b>17</b>
<b>1.7</b>	<b>Der Positive Cofactor 4 (PC4) und die DNA-Topoisomerase I</b>	<b>19</b>
<b>1.8</b>	<b>Die Proteinkinase CK2</b>	<b>20</b>
<b>1.9</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>21-24</b>
<b>3</b>	<b>METHODEN</b>	<b>25-57</b>
<b>3.1</b>	<b>Anzucht und Stammhaltung von Bakterien</b>	<b>25</b>
<b>3.2</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>25</b>
3.2.1	Anzucht menschlicher Tumorzellen in Suspensionskultur	25
<b>3.3</b>	<b>Präparation zellfreier Extrakte</b>	<b>26</b>
3.3.1	Präparation von zytoplasmatischem Extrakt (S100) aus HeLa- oder HEK-Zellen (nach WEIL et al., 1979)	26



3.3.2	Präparation von Kernextrakt (modifiziert nach SHAPIRO et al., 1988)	27
<b>3.4</b>	<b>Gelelektrophoretische Methoden</b>	<b>28</b>
3.4.1	Agarose-Gele	28
3.4.2	Denaturierende Polyacrylamid-Harnstoff-Gele	28
3.4.3	Native Polyacrylamid-Gele für DNA-Analysen	29
3.4.4	Nicht denaturierende Gele zur Auftrennung von nativen Protein-DNA-Komplexen (EMSA-Gele)	30
3.4.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (nach LAEMMLI, 1970)	31
<b>3.5</b>	<b>Arbeiten mit Proteinen</b>	<b>32</b>
3.5.1	Reinigung von Proteinfractionen über Niederdruck-Chromatographie (Liquid Chromatography, LC), Phosphocellulose	32
3.5.2	Reinigung von Proteinfractionen über Mitteldruck-Chromatographie	33
3.5.2.1	Anionenaustauscher	33
3.5.2.2	Kationenaustauscher	33
3.5.2.3	Gelfiltration, „Size Exclusion Chromatography“ (SEC)	34
3.5.2.4	Hydrophobe Interaktions-Chromatographie	35
3.5.3	Präparation von Transkriptionsfaktoren und der Polymerase III	35
3.5.3.1	Weitere chromatographische Trennung der PCB und PCC	36
3.5.3.2	Präparation von TFIIB und Polymerase III	36
3.5.3.3	Präparation der Pol III über single-strand-DNA-Cellulose	37
3.5.3.4	Weitere Reinigung von TFIIC1/TFIIC0 über MonoS-Chromatographie	37
3.5.3.5	Präparation einer über Phosphocellulose rechromatographierten TFIIC2-Fraktion	38
3.5.4	Fällung von Proteinen mit Ammoniumsulfat	38
3.5.5	Proteinkonzentrationsbestimmung durch kolorimetrische Proteinquantifizierung (BRADFORD, 1976)	38
3.5.6	Dialyse von Proteinlösungen	39
3.5.7	Immunodetektion von Proteinen (Western-Blot)	39
3.5.7.1	Transfer elektrophoretisch getrennter Proteine auf PVDF-Transfermembran	40
3.5.7.2	Nachweis spezifischer Proteine durch Antigen-Antikörper-Wechselwirkung	41
3.5.8	<i>In vitro</i> -Biotinylierung von Proteinen mit dem EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit von Pierce	42
3.5.9	Nachweis biotinylierter Proteine mit dem ImmunoPure®UltraSensitive ABC Peroxidase Staining Kit von Pierce	42
3.5.10	Konzentrieren von Proteinlösungen für SDS-Gel-Elektrophorese mit StrataClean™ Resin	42
3.5.11	Anfärben von Proteinen mit Coomassie Brilliant Blue	43
3.5.12	Silberfärbung von Proteingelen nach BLUM et al., 1987	43
<b>3.6</b>	<b>Arbeiten mit Nukleinsäuren</b>	<b>44</b>
3.6.1	Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli für analytische Zwecke („Mini-Screen“)	44
3.6.2	Präparative Plasmid-Isolierung mittels Qiagen Tip-2500-Säulen	45
3.6.3	Phenolisierung von Nukleinsäuren	46
3.6.4	Fällung von Nukleinsäuren unter Standardbedingungen	46

3.6.5	Bestimmung der Konzentration von Desoxyribonukleinsäuren	46
3.6.6	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	47
3.6.7	Spaltung der DNA mit Restriktionsenzymen	48
3.6.8	Färbung von Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid	48
3.6.9	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Polyacrylamid-Gelen mittels Elektroelution	49
3.6.10	Dephosphorylierung linearisierter DNA	50
3.6.11	Auffüllen 5'-überhängender Enden	50
3.6.12	Ligation von DNA	51
3.6.13	Transformation	51
3.6.14	Selektion positiver Transformanten	52
3.6.15	Abtrennung der freien Nukleotide von DNA-Fragmenten	53
3.6.16	Radioaktive 5'-Endmarkierung von ds- oder ss-DNA	53
<b>3.7</b>	<b><i>In vitro</i>-Transkription</b>	<b>53</b>
3.7.1	a) Reaktion ohne Vorinkubation – „Standard-Transkription“	54
	b) Reaktion mit Vorinkubation zur Komplexassemblierung und Isolierung mittels Gelfiltration	54
3.7.2	Aufarbeitung von RNA aus <i>in vitro</i> -Transkriptionsansätzen	55
<b>3.8</b>	<b>Nachweis von Protein-DNA-Interaktion</b>	<b>56</b>
3.8.1	„Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA)	56
<b>3.9</b>	<b>Bestimmung radioaktiver Strahlung</b>	<b>56</b>
3.9.1	Qualitativ durch Autoradiographie	56
3.9.2	Quantitativ durch Bestimmung der Szintillationsstrahlung	57
3.9.3	Qualitativ und quantitativ mittels Analyse durch einen Phosphor Imager	57
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>58-115</b>
<b>4.1</b>	<b>Untersuchungen zur Funktion von TFIIC1</b>	<b>59</b>
4.1.1	Der Transkriptionsfaktor IIC1 wird für die Transkription aller Polymerase-III-abhängigen Gene essentiell benötigt	59
4.1.2	Überprüfung der Spezifität der TFIIC2-Bindungsverstärkung an den AB-Box-Genen durch TFIIC1	60
4.1.2.1	Aktivitätsnachweis der erhitzten TFIIC1-Fraktion in der <i>in vitro</i> -Transkription	61
4.1.2.2	Aktivitätsnachweis der erhitzten Fraktionen im EMSA	63
4.1.3	Einfluss der DNA-Topoisomerase I auf das Polymerase-III-Transkriptionssystem	66
4.1.4	Überprüfung eines möglichen Zusammenhangs zwischen TFIIC1 und CK2	67
<b>4.2</b>	<b>Reinigung von TFIIC1</b>	<b>72</b>
4.2.1	Standard-Reinigungsverfahren für TFIIC1	72
4.2.2	Phosphocellulose- und MonoQ-Chromatographie	73
4.2.3	Hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC)	73

4.2.4	Optimierung der Reinigungsstrategie auf Stufe der Phosphocellulose	77
4.2.5	Reinigung von TFIIIC1 über eine MonoS-Chromatographie	78
4.2.5.1	Untersuchungen zum Rb-Gehalt der MonoS-Fractionen	80
4.2.5.2	Überprüfung des Effektes bei Zugabe einer Rb-haltigen Fraktion zu einem aktiven <i>in vitro</i> -Transkriptionssystem	82
4.2.5.3	Untersuchung der beiden Aktivitätspeaks der MonoS-Chromatographie	84
4.2.6	Weitere Reinigung von TFIIIC1 mittels Rechromatographie über MonoQ	86
4.2.7	Reinigung des Transkriptionsfaktors IIIC1-like über MonoS-Chromatographie	89
4.2.7.1	Identifizierung TFIIIC1-like-haltiger MonoS-Fractionen in der <i>in vitro</i> -Transkription	90
4.2.7.2	SDS-PAGE mit MS-TFIIIC1- und MS-TFIIIC1-like-Fractionen und Analyse nach der Silberfärbung	91
4.2.8	Weitere Reinigung von TFIIIC1-like mittels Rechromatographie über MonoQ	93
4.2.8.1	Analyse der rechromatographierten MonoQ-TFIIIC1-like-Fractionen über SDS-PAGE	94
4.2.9	<i>In vitro</i> -Biotinylierung von TFIIIB -, TFIIIC2- und TFIIIC1-haltigen Fractionen	96
4.2.9.1	S400-Gelfiltration zur Isolierung von Transkriptionskomplexen, die mit teilweise biotinylierten Fractionen am VA I-Fragment assembliert wurden	98
4.2.9.2	SDS-PAGE mit den gereinigten Transkriptionskomplexen und Nachweis der darin enthaltenen biotinylierten Proteine mit Hilfe des ABC-Kits	100
4.2.9.3	Weitere SDS-PAGE mit den gereinigten Transkriptionskomplexen und Nachweis der darin enthaltenen biotinylierten Proteine mit Hilfe des ABC-Kits	102
4.2.10	Reinigung von Transkriptionskomplexen am VA I-Plasmid über Gelfiltration (S500)	104
4.2.10.1	Analyse der über S500-Gelfiltration gereinigten, unterschiedlich zusammengesetzten Transkriptionskomplexe in der <i>in vitro</i> -Transkription	106
4.2.10.2	Western-Blot-Analyse der vollständigen Transkriptionskomplexe auf die enthaltenen Transkriptionsfaktoren und die Polymerase III	111
4.2.11	SDS-PAGE mit den Komplex-haltigen Fractionen der verschiedenen Gelfiltrationsläufe	112
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>116-134</b>
<b>5.1</b>	<b>Untersuchungen zur Funktion von TFIIIC1</b>	<b>117</b>
5.1.1	TFIIIC1 ist ein essentiell notwendiger Transkriptionsfaktor für die Polymerase-III-Transkription	117
5.1.2	Bei der TFIIIC2-Bindungsverstärkung an den AB-Box-Genen in Anwesenheit von TFIIIC1 handelt es sich um einen unspezifischen Effekt	117
5.1.3	Die Beziehung von TFIIIC1 zu anderen, die Polymerase-III-Transkription beeinflussenden Proteinen	119
5.1.3.1	Die DNA-Topoisomerase I kann ein vollständig rekonstituiertes Transkriptionssystem nicht stimulieren und im TFIIIC1-defizienten System TFIIIC1 funktionell nicht ersetzen	119
5.1.3.2	Die Proteinkinase CK2 ist weder mit TFIIIC1 identisch noch in der TFIIIB - Fraktion nachweisbar	120

<b>5.2</b>	<b>Reinigung von TFIIIC1</b>	<b>122</b>
5.2.1	Die optimierte Phosphocellulose-Chromatographie führt zur Aufspaltung der TFIIIC1-Aktivität (PC <sub>0,35-0,45</sub> und PC <sub>0,45-0,6</sub> )	123
5.2.2	Die hydrophobe Interaktions-Chromatographie	124
5.2.3	Die TFIIIC1-Reinigung über MonoS	124
5.2.3.1	Über die MonoS-Chromatographie werden zwei verschiedene Formen von TFIIIC1 voneinander getrennt	124
5.2.3.2	Die MonoS-Chromatographie zeigt eine sehr hohe Reinigungseffizienz und einen guten Aktivitätserhalt	125
5.2.3.3	Rb wird über die MonoS von TFIIIC1 abgetrennt	126
5.2.3.4	Rb hat keinen negativen Einfluss auf die <i>in vitro</i> -Transkription	126
5.2.4	Die Reinigung des Transkriptionsfaktors IIIC1-like	127
5.2.4.1	Die MonoS-Chromatographie	127
5.2.4.2	Liegt die TFIIIC1-Aktivität in verschiedenen Zustandsformen vor?	128
5.2.5	Die Gelfiltration	129
5.2.6	Isolierung vollständiger Transkriptionskomplexe über eine S400-Gelfiltration unter Verwendung von biotinyliertem TFIIIC1	130
5.2.6.1	Die <i>in vitro</i> -Biotinylierung eignet sich nur bedingt für den Nachweis von Polypeptiden	131
5.2.7	Über eine S500-Gelfiltration lassen sich sowohl vollständige als auch partielle VA I-Transkriptionskomplexe isolieren	131
5.2.7.1	Analyse der gereinigten VA I-Transkriptionskomplexe	132
5.2.8	Identifizierung potentieller TFIIIC1-Untereinheiten	132
5.2.9	Vergleich der im Verlauf der TFIIIC1-Reinigung erhaltenen Ergebnisse zur Polypeptidzusammensetzung von TFIIIC1	133
5.2.10	Ausblick	134
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>135-136</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>137-139</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>140-151</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>152-155</b>
9.1	Akademische Lehrer	152
9.2	Ehrenwörtliche Erklärung	153
9.3	Danksagung	154
9.4	Lebenslauf	155

# 1 Einleitung

Die gesamte Erbinformation eines Organismus ist in Form der Desoxyribonukleinsäure (DNA) in jeder einzelnen Zelle gespeichert. Bei eukaryontischen Zellen liegt der größte Teil der DNA als Chromosomen im Zellkern vor, ein weitaus geringerer Teil befindet sich in den Mitochondrien. Diejenigen Abschnitte auf der DNA, die für ein bestimmtes Produkt kodieren, werden als Gene bezeichnet. Damit die genetische Information eines Gens umgesetzt werden kann, muss die DNA-Sequenz zuerst in mobile Ribonukleinsäure-Moleküle (RNA) umgeschrieben werden. Dieser Prozess wird als Transkription bezeichnet und von DNA-abhängigen RNA-Polymerasen katalysiert.

Bei den Produkten der proteincodierenden Gene handelt es sich um heterogene nukleäre RNAs (hnRNAs), die durch den nachfolgenden Spleißvorgang in Messenger-RNAs (mRNAs) überführt werden. Diese wiederum dienen als Matrize für die Proteinbiosynthese, die an den Ribosomen im Zellplasma stattfindet. Weiterhin gibt es Gene, die für RNAs kodieren, die zwar nachträglich modifiziert werden, aber nicht für Proteine kodieren, sondern wie z.B. im Falle der ribosomalen RNAs (rRNAs) für den strukturellen Aufbau sowie die Funktion der Ribosomen notwendig sind. Auch die Gene, die für Transfer-RNAs (tRNAs) kodieren, zählen zu dieser Gengruppe. tRNAs sind kleine RNA-Moleküle mit einer ausgeprägten Sekundärstruktur, die spezifisch Aminosäuren binden und für die Proteinbiosynthese ans Ribosom transferieren.

## **1.1 Die DNA-abhängigen RNA-Polymerasen**

Während prokaryotische Zellen lediglich eine DNA-abhängige RNA-Polymerase besitzen, die sämtliche Gene transkribiert, gibt es in eukaryotischen Zellen drei verschiedenen RNA-Polymerasen, die als RNA-Polymerase I, II und III bzw. A, B und C bezeichnet werden. Sie unterscheiden sich in ihrer Matrizenspezifität sowie ihrer Lokalisation (ROEDER & RUTTER, 1969; SEIFART et al., 1972; ROEDER et al., 1976). Außerdem können sie aufgrund ihrer unterschiedlichen Sensitivität gegenüber  $\alpha$ -Amanitin, dem Gift des Grünen Knollenblätterpilzes, unterschieden werden (SEIFART & SEKERIS, 1969; CHAMBON, 1975).

### 1.1.1 Die RNA-Polymerasen I und II

Die RNA-Polymerase I ist in den Nucleoli lokalisiert und transkribiert nur ein einziges Gen, das 45S-rRNA-Gen, das aber in einer sehr hohen Kopienzahl im Genom vorliegt. Diese 45S-rRNA ist eine Vorläufer-RNA, die durch Spleissen in die 5,8S-, 18S- und 28S-rRNA überführt wird (UDVARDY & SEIFART, 1976; GRUMMT, 1981; REEDER, 1992; MOSS & STEFANOVSKY, 1995). Die RNA-Polymerase I ist unempfindlich gegenüber  $\alpha$ -Amanitin (SEIFART & SEKERIS, 1969; CHAMBON, 1975).

Die Polymerase II befindet sich im Kernplasma und transkribiert zum einen die Uracil-reichen small nuclear RNAs (snRNAs) U1 bis U5, die für den Aufbau des Spleißapparates wichtig sind (Übersicht: BURATOWSKI, 1994; KISS et al., 1991; KUNKEL et al., 1991). Zum anderen werden alle proteinkodierenden Gene von der Polymerase II transkribiert. Hierbei entstehen zuerst prä-mRNAs, die mit Proteinen assoziiert vorliegen und als heterogene nukleäre Ribonukleinsäuren (hnRNAs) bezeichnet werden. Die Proteine sind wichtig für den Spleißvorgang, bei dem die informationsleeren Introns herausgeschnitten werden und die prä-mRNA in reife mRNAs überführt wird (KNIPPERS, 1997). Ihre Information wird schließlich an den Ribosomen in die Aminosäuresequenz des jeweiligen Proteins übersetzt. Dieser Vorgang wird als Translation bezeichnet (BRETHNACH & CHAMBON, 1981; Übersicht: SAWADOGO & SENTENAC, 1990; CONAWAY & CONAWAY, 1993). Die RNA-Polymerase II wird bereits durch weniger als 0,1  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -Amanitin gehemmt (SEIFART & SEKERIS, 1969; CHAMBON, 1975).

### 1.1.2 Die RNA-Polymerase III

Die RNA-Polymerase III ist ebenfalls im Kernplasma lokalisiert und transkribiert Gene, deren Produkte relativ klein und teilweise katalytisch aktiv sind. Produkte der Polymerase-III-abhängigen Gene sind die tRNAs, die 5S-rRNA sowie die U6-snRNA (WEINMANN & ROEDER, 1974; YAMAMOTO et al., 1977; KUNKEL et al., 1991). Weiterhin transkribiert die Polymerase III das 7SL-RNA-Gen, das H1-RNA-Gen sowie einige andere Gene mit bisher unbekannter Funktion (Alu-RNA, humane Y1- und Y3-RNA; Übersicht: PALMER & FOLK, 1990); die H1-RNA ist die RNA-Komponente der zur Prozessierung der

tRNAs notwendigen RNase P (BAER et al., 1989). Auch virale Gene werden von der Polymerase III transkribiert, z.B. das adenovirale VA I- und VA II-Gen sowie die EBER I- und Eber II-RNA des Epstein-Barr-Virus (Übersicht: GABRIELSEN & SENTENAC, 1991; GEIDUSCHEK & KASSAVETIS, 1992; WILLIS, 1993). Eine Hemmung der Polymerase-III-Transkription tritt erst ab einer Konzentration von 0,2 mg/ml  $\alpha$ -Amanitin auf (SEIFART & SEKERIS, 1969; CHAMBON, 1975).

Die RNA-Polymerase III der Hefe (*S. cerevisiae*) ist, ebenso wie die Polymerase I und II, sehr gut charakterisiert (GABRIELSEN & SENTENAC, 1991). Alle drei Polymerasen bestehen aus zwei großen und mehr als zehn kleinen Untereinheiten. Die beiden großen Untereinheiten der drei Polymerasen sind strukturell und funktionell verwandt (SENTENAC et al., 1992; DIECI et al., 1995). Ihre Aufgabe ist die Nukleotidbindung und die Interaktion der DNA mit der synthetisierten RNA. Die Polymerase III der Hefe hat ein Molekulargewicht von etwa 650 kDa und besteht aus 17 Untereinheiten (GABRIELSEN & SENTENAC, 1991; SENTENAC et al., 1992; SADHALE & WOYCHIK, 1994; FERRI et al., 2000). Alle Untereinheiten konnten kloniert werden. Fünf der kleinen Untereinheiten sind Komponenten aller drei Polymerasen und sind verantwortlich für die Lokalisation der Polymerasen im Kern und für die Effizienz sowie die Regulation der RNA-Synthese (GABRIELSEN & SENTENAC, 1991). Die Polymerase III besitzt vier spezifische Untereinheiten, yRPC31, yRPC34, yRPC53, yRPC82, wobei die Untereinheiten yRPC31, yRPC34 und yRPC82 einen Subkomplex bilden, der mit dem Initiationsfaktor yTFIIIB (s. 1.4.2 und 1.5.1) interagiert und so eine Rolle bei der Rekrutierung der Polymerase III in den Initiationskomplex spielt (WERNER et al., 1992; WERNER et al., 1993; KHOO et al., 1994; THUILLIER et al., 1995).

Die humane Polymerase III ist weniger gut untersucht. Sie besteht aus 16 Untereinheiten (WANG & ROEDER, 1996; WANG & ROEDER, 1997), von denen die hRPC53-Untereinheit sowie ein Subkomplex aus hRPC32, hRPC39 und hRPC62 kloniert werden konnten (ITTMANN et al., 1993; WANG & ROEDER, 1997). Auch hier ist der Subkomplex für die Interaktion mit dem an die DNA gebundenen TFIIIB verantwortlich (WANG & ROEDER, 1997), wobei hRPC34 mit TFIIIB90 interagiert (HSIEH et al., 1999a).

## **1.2 Die Promotorstruktur der Polymerase-III-abhängigen Gene**

Bei den Polymerase-III-abhängigen Genen unterscheidet man drei verschiedene Promotortypen (Übersicht: WILLIS, 1993):

- Gene mit internen Promotorelementen vom AC-Typ (Typ 1)
- Gene mit internen Promotorelementen vom AB-Typ (Typ 2)
- 5'-regulierte Gene mit Promotorelementen im Upstreambereich (Typ 3)

### **1.2.1 AC-Typ-Promotoren (Typ 1)**

Dieser Promotor-Typ wird nur durch das 5S-rRNA-Gen repräsentiert, das in etwa 100 Kopien im humanen Genom vorliegt. Seine genintern liegenden Promotorelemente werden auch als ICR bezeichnet, die Abkürzung für „internal control region“. Die ICR besteht aus einer A-Box (Bp +50 bis +64), einer C-Box (Bp +80 bis +97) sowie einem zwischen diesen beiden Boxen liegenden intermediären Element (IE; Bp +67 bis +72) (SAKONJU et al., 1980; BOGENHAGEN et al., 1980; PIELER et al., 1985a; PIELER et al., 1985b; PIELER et al., 1987). Die gesamte ICR stellt die Bindungsstelle für den genspezifischen und primär DNA-bindenden Transkriptionsfaktor IIIA dar (ENGELKE et al., 1980; MILLER et al., 1985; PIELER et al., 1987; SEIFART et al., 1989).

Die ersten zehn Basenpaare der A-Box der Gene vom AC-Typ zeigen eine Sequenzhomologie zur A-Box der Gene vom AB-Typ und legen den Startpunkt der Transkription fest (CILIBERTO et al., 1983). Es zeigten sich jedoch keine Homologien der C-Box mit einem anderen Polymerase-III-Promotor-Element.

Im Upstreambereich des 5S-rRNA-Gens liegt ein weiteres, charakteristisches Promotorelement, das als D-Box bezeichnet wird. Fehlt dieses Element, so sinkt die Transkriptionseffizienz auf ein Zehntel des Normalwertes (NIELSEN et al., 1993). Welches Protein allerdings in Wechselwirkung mit diesem Sequenzelement tritt, konnte bisher nicht geklärt werden.

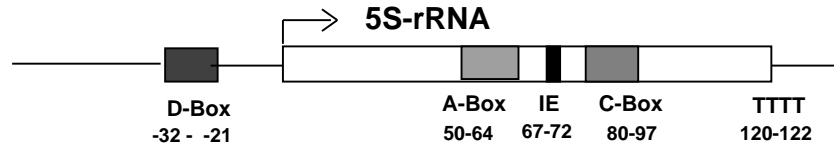
### **1.2.2 AB-Typ-Promotoren (Typ 2)**

Zu den Genen mit einem AB-Typ-Promotor gehören alle tRNA-Gene, die adenoviralen VA I- und VA II-Gene und die hochrepetitiven Alu-Sequenzen.

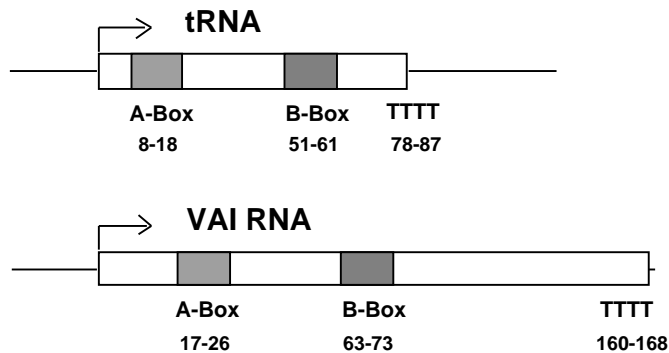


## Übersicht: Promotorstrukturen der Polymerase-III-Gene

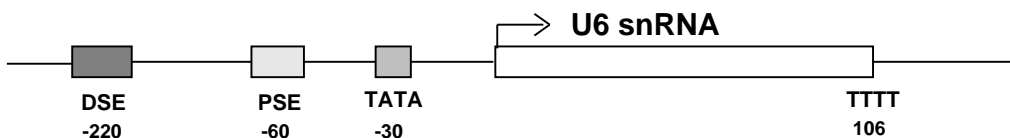
### Typ 1 (AC-Typ): 5S-rRNA-Gen



### Typ 2 (AB-Typ): tRNA-Gene, Adenovirale Gene, ALU-Sequenzen



### Typ 3 (5'-regulierte Gene): U6-snRNA-Gen, 7SK-Gen



#### Promotorstruktur der Polymerase III-transkribierten Gene

(modifiziert nach Pieler et al., 1987; Wu et al., 1987; Carbon & Krol, 1991; Kunkel, 1991; Willis, 1993)

Wie bei den AC-Typ-Promotoren liegen beim AB-Typ die Promotorelemente innerhalb der Gensequenz. Die AC-Typ- und AB-Typ-Gene, die im Gegensatz zu den 5'-regulierten Genen genintern liegende Promotor-Elemente besitzen, werden auch gemeinsam als „klassische Polymerase-III-Gene“ bezeichnet.

Die Promotorelemente der AB-Typ-Gene bestehen aus einer A-Box (von Bp +8 bis +18 bei tRNA, +17 bis +26 bei VA I) und einer B-Box (von Bp +51 bis +61 bei tRNA; +63 bis +73 bei VA I; FOWLKES & SCHENK, 1980; GUILFOYLE & WEINMANN, 1981; HOFSTETTER et al., 1981; ROSA et al., 1981; GEIDUSCHEK & TOCCHINI-VALENTINI, 1988; GEIDUSCHEK & KASSAVETIS, 1992), beides sind hochkonservierte DNA-Sequenzen. Der Abstand der beiden Boxen ist recht variabel, die Transkriptionseffizienz ist allerdings am höchsten, wenn 30 bis 60 Basenpaare zwischen beiden Boxen liegen.

Im 5'-Bereich der AB-Typ-Gene wurden zwar keine konservierten Promotorelemente gefunden, eine Beeinflussung der Promotorstärke durch 5'-gelegene Sequenzen sind aber trotzdem zu beobachten (GEIDUSCHEK & TOCCHINI-VALENTINI, 1988; WU et al., 1994). Wie beim 5S-rRNA-Gen legt die A-Box auch bei den AB-Typ-Promotoren den Startpunkt fest. Die B-Box stellt die Bindesequenz für den DNA-bindenden Transkriptionsfaktor IIIC2 dar (YOSHINAGA et al., 1987), TFIIIA wird für die Transkription der AB-Typ-Gene nicht benötigt.

Da die adenovirale VA I-RNA nach der Transkription nicht modifiziert wird, eignet sich dieses Gen sehr gut für *in vitro*-Untersuchungen. In der Zelle hemmt die RNA des VA I-Gens die Proteinkinase DA I und sichert damit die Translation der viralen mRNAs (MODROW & FALKE, 1997).

### **1.2.3 5'-regulierte Gene mit Promotorelementen im Upstream-Bereich (Typ 3)**

Diese Gengruppe ähnelt in ihrem Promotoraufbau den Polymerase-II-abhängigen Genen, da ihre Promotorelemente nur im 5'-Bereich des Gens lokalisiert sind und eine TATA-Box vorhanden ist, an die das TATA-Box-bindende Protein (TBP) bindet. Während die TATA-Box bei den Polymerase-II-Genen für die Transkriptionseffizienz und die Startpunktfestlegung verantwortlich ist, legt sie bei den Polymerase-III-Genen die Polymerase-Spezifität fest (Übersicht: SCHRAMM & HERNANDEZ, 2001).

Die Produkte dieser Gengruppe sind verschiedene kleine RNAs: die am besten charakterisierte U6-snRNA, die 7SK-RNA, die Y1- und Y3-RNA sowie die H1-RNA (Übersicht: SCHRAMM & HERNANDEZ, 2001).

Hinsichtlich des Faktorbedarfs unterscheiden sich die Typ-3-Gene erheblich von den beiden anderen Gen-Typen. Der primär DNA-bindende Transkriptionsfaktor ist in diesem Fall PBP (PSE-bindendes Protein), der an das bei Bp -60 liegende PSE (proximal sequence element) bindet (WALDSCHMIDT et al., 1991). Dieses Element ist für die korrekte Initiation und die Transkriptionseffizienz verantwortlich (DAHLBERG & LUND, 1988; LOBO et al., 1990). Weiter stromaufwärts befindet sich das DSE (distal sequence element; Bp -220), an das die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Oct1 binden. Dieses Element fungiert als Enhancer (COUREY & TIJAN, 1988; STURM et al., 1988; MURPHY et al., 1992; Übersicht: HERNANDEZ, 1992; WONG et al., 1998). Wie bereits oben erwähnt, bindet TBP, das aber im Falle der Typ-3-Gene nicht in einem TBP-TAF-Komplex vorliegt, an die TATA-Box, die sich im U6-snRNA-Gen bei Bp -25 befindet. Während der TFIIIB-Komplex (s. 1.4.2) einen TBP-TAF-Komplex darstellt, ist TFIIIB, der für die Transkription der Typ-3-Gene benötigt wird, ein TBP-freier Komplex (TEICHMANN & SEIFART, 1995).

### **1.3 Faktorbedarf der Polymerase-III-abhängigen Gene**

Vollständige Initiationskomplexe der drei verschiedenen Gen-Typen setzen sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

**Typ 1 (AC-Typ): 5S-rRNA-Gen**

TFIIIA, TFIIIC2, TFIIIB, TFIIIC1 und Polymerase III

**Typ 2 (AB-Typ): tRNA-Gene, VA I- & VA II-Gen, Alu-Sequenzen**

TFIIIC2, TFIIIB, TFIIIC1 und Polymerase III

**Typ 3 (5'-reg. Gene): U6-snRNA-Gen, 7SK-RNA-Gen**

PBP, TBP, TFIIIB, TFIIIC1, TFIIIU und die Polymerase III

### **1.4 Die Transkriptionsfaktoren der Polymerase III**

#### **1.4.1 TFIIIA**

Bei diesem Faktor handelt es sich um ein globuläres, 42 kDa großes Protein, das bei der Transkription des 5S-rRNA-Gen als genspezifischer Transkriptionsfaktor an die Internal Control Region (ICR) dieses AC-Typ-Gens bindet

und auf diese Weise die Assemblierung des Transkriptionskomplexes initiiert (SEIFART et al., 1989; MOOREFIELD & ROEDER, 1994). TFIIA wurde zunächst aus *Xenopus laevis* gereinigt und seine cDNA konnte 1984 kloniert werden (GINSBERG et al., 1984). TFIIA enthält neun Zinkfinger motive, die für die DNA-Bindung erforderlich sind und von denen die drei aminoterminalen Zinkfinger den größten Bindungsanteil besitzen und an die C-Box der ICR binden (MILLER et al., 1985; VRANA et al., 1988; CLEMENS et al., 1992; LIAO et al., 1992; THEUNISSEN et al., 1992; DELRIO et al., 1993).

Eine weitere Aufgabe von TFIIA besteht in der Rekrutierung von TFIIC2 an den Promotor, was zu einer Erweiterung des TFIIA-Footprints bis zum Startpunkt führt (FRADKIN et al., 1989; OETTEL et al., 1997).

#### **1.4.2 TFIIB**

Die Struktur und Funktion von TFIIB sind in der Hefe (*S. cerevisiae*) weitgehend aufgeklärt. Der Faktor lässt sich chromatographisch in zwei Komponenten trennen, TFIIB' und TFIIB'' (BARTHOLOMEW et al., 1991; KASSAVETIS et al., 1991; HUET & SENTENAC, 1992; KASSAVETIS et al., 1992b; DIECI et al., 1993; RÜTH et al., 1996). TFIIB' besteht aus TBP und einem 70 kDa großen Protein, das auch als yTFIIB70 bezeichnet wird. TFIIB70 weist eine große Homologie zu TFIIB auf, weshalb es auch als BRF1 (TFIIB related factor 1) bezeichnet wird. Bei TFIIB'' handelt es sich um ein 90 kDa großes Protein (yTFIIB90), zu dem vermutlich eine weitere, bisher wenig charakterisierte Aktivität gehört, die als TFIIE bezeichnet wird (DIECI et al., 1993; RÜTH et al., 1996). Sowohl das Gen für TFIIB70 als auch das Gen für TFIIB90 ist kloniert worden (LÓPEZ-DE-LEÓN et al., 1992; BURATOWSKI & ZHOU, 1992; COLBERT & HAHN, 1992; KASSAVETIS et al., 1995). Es konnte gezeigt werden, dass yTFIIB70 und yTFIIB90 über Interaktion mit der yTFIIC-Untereinheit 131 (s. 1.4.3) in den Initiationskomplex integriert werden (BARTHOLOMEW et al., 1991; KHOO et al., 1994; CHAUSSIVERT et al., 1995; RÜTH et al., 1996). Crosslink-Untersuchungen haben ergeben, dass die Untereinheiten yTFIIB70 und yTFIIB90 sowie TBP mit der DNA interagieren (BARTHOLOMEW et al., 1991; PERSINGER et al., 1999). yTFIIB70 ist für die Rekrutierung der Polymerase III verantwortlich, mit deren yRPC34-Untereinheit sie in Wechselwirkung tritt

(WERNER et al., 1992; WERNER et al., 1993; KHOO et al., 1994; THUILLIER et al., 1995).

Im humanen System kann man nicht von einem Faktor „TFIIIB“ sprechen, da für die Transkription der klassischen und der 5'-regulierten Polymerase-III-Gene zwei verschiedene Formen, TFIIIB<sub>1</sub> und TFIIIB<sub>2</sub>, benötigt werden, die chromatographisch voneinander getrennt werden können (TEICHMANN & SEIFART, 1995) und lediglich eine Untereinheit (TFIIIB150) gemeinsam haben. TFIIIB<sub>1</sub> ist für die Transkription der Gene mit genintern liegenden Promotorelementen notwendig. Bei diesem Faktor handelt es sich um einen Multiproteinkomplex, der sich aus TBP und TAFs zusammensetzt (s. 1.4.5). Es wurden mit TBP assoziierte Proteine verschiedener Größen gefunden, die allerdings recht kontrovers diskutiert werden (Übersicht: PAULE & WHITE, 2000; GEIDUSCHEK & KASSAVETIS, 2001; HUANG & MARAIA, 2001). Bisher konnten nur zwei TAFs kloniert werden: Dies sind hTAF90 (WANG & ROEDER, 1995), der auch als BRF oder hTFIIIB90 bezeichnet wird, sowie hTAF150 (SCHRAMM et al., 2000; TEICHMANN et al., 2000), der auch als B'' oder hTFIIIB150 bezeichnet wird.

TFIIIB<sub>2</sub> ist für die Transkription der 5'-regulierten Polymerase-III-Gene notwendig (s. 1.2) und besteht aus einem TBP-freien Komplex. Für eine rekonstituierte *in vitro*-Transkription ist die Zugabe von freiem TBP erforderlich.

Die Einbindung von TFIIIB<sub>1</sub> bzw. TFIIIB<sub>2</sub> in den Transkriptionskomplex erfolgt an klassischen Genen mit intern liegendem Promotor über TFIIIC2, an 5'-regulierten Genen hingegen über das an die TATA-Box gebundene TBP. Auch im humanen System scheint TFIIIB<sub>1</sub> bzw. TFIIIB<sub>2</sub> durch Interaktionen mit Untereinheiten der Polymerase III zentral an der Polymerase-III-Rekrutierung beteiligt zu sein (WANG & ROEDER, 1997); es sind jedoch vermutlich weitere Faktoren hierfür notwendig (s. 1.4.3).

### 1.4.3 TFIIIC

Der Transkriptionsfaktor IIIC ist ebenfalls in der Hefe (*S. cerevisiae*) am besten charakterisiert und wird hier auch als  $\text{TFIIIC}$  bezeichnet. Er ist für die Expression aller Polymerase-III-Gene notwendig und besteht aus sechs Unter-

einheiten mit Molekulargewichten von 138, 131, 95, 91, 60 und 55 kDa, die alle kloniert werden konnten (GEIDUSCHEK & KASSAVETIS, 2001).

Dieser Multiproteinkomplex kann proteolytisch (MARZOUKI et al., 1986), jedoch nicht chromatographisch, in zwei Domänen aufgespaltet werden: A enthält die 131, 95 und 55 kDa-Untereinheiten, während B die 138, 91 und 60 kDa-Untereinheiten beinhaltet (DEPREZ, 1999). Beide Domänen sind durch eine flexible „Hinge“- (Scharnier-) Region verbunden (MARZOUKI et al., 1986). 95 (aus A) und 138 (aus B) sind die jeweils DNA-bindenden Untereinheiten in beiden Domänen, wobei Untersuchungen am tRNA-Gen ergeben haben, dass A mit der A-Box und B mit der B-Box interagiert (BARTHOLOMEW et al., 1990). 131 tritt vermutlich mit  $\gamma$ TFIIIB in Wechselwirkung und sorgt so für dessen Einbindung in den Initiationskomplex (KHOO et al., 1994; CHAUSSIVERT et al., 1995; RÜTH et al., 1996).

Am Hefe-U6-snRNA-Gen ist  $\gamma$ TFIIIC für die korrekte TFIIIB-Einbindung verantwortlich und bestimmt desweiteren die Polymerase-III-Spezifität (WHITEHALL et al., 1995; ROBERTS et al., 1995).

Verglichen mit dem Hefe-Homolog ist der humane TFIIIC erheblich komplexer aufgebaut. Durch Chromatographie einer PCC-Fraktion über MonoQ werden drei transkriptionsaktive IIC-Aktivitäten voneinander getrennt, die in der Reihenfolge ihrer Elution als TFIIIC0, TFIIIC1 und TFIIIC2 bezeichnet werden (YOSHINAGA et al., 1987; DEAN & BERK, 1987; OETTEL et al., 1997).

Die weitere chromatographische Auftrennung der TFIIIC0-Fraktion führte zur Identifizierung eines zu TFIIIC1 funktionell gleichen Faktors, der daher als TFIIIC1-like bezeichnet wurde und der TFIIIC1 in der Transkription ersetzen kann. Die TFIIIC1-like-haltigen Fraktionen weisen allerdings nicht die gleiche Transkriptionseffizienz auf wie die TFIIIC1-haltigen, die Ursache hierfür ist unbekannt; möglicherweise liegt der Faktor in einer geringeren Konzentration vor. Weiterhin enthält die TFIIIC0-Fraktion den Transkriptionsfaktor TFIIIU, der mit TFIIIB50/BRFU identisch ist (s. 1.4.2, persönliche Mitteilung Christin Gruber; TEICHMANN et al., 2000; CABART & MURPHY, 2002) und der ausschließlich für die Transkription der 5'-regulierten Gene notwendig ist, sowie eine dritte Aktivität, die als **Terminator-bindende Aktivität (TBA)** bezeichnet wurde (OETTEL et al., 1997). Die Bindung von TBA an die Terminationsregion

verschiedener Polymerase-III-Gene führt zu einem DNase-Schutz in diesem Bereich (OETTEL et al., 1998). Dieser Faktor konnte in der Zwischenzeit kloniert werden und es zeigte sich, dass er zur NF1-Familie gehört (WANG et al., 2000). WANG et al. (2000) fanden weiterhin heraus, dass Mutationen in der Bindungsregion von TBA zu einer Reduktion der Transkriptionseffizienz aufgrund einer verschlechterten Termination und Reinitiation führen.

Über den Transkriptionsfaktor IIIC1 ist bisher relativ wenig bekannt. Obwohl dieser Faktor bereits 1987 von YOSHINAGA et al. gefunden wurde, konnte er bis heute nicht isoliert und kloniert werden. 1998 veröffentlichten WANG & ROEDER Daten, die eine Immunodepletion gegen hTFIIIC220 (die größte Untereinheit von TFIIIC2, siehe unten) zeigten. Auf diese Weise isolierten sie einen Komplex, den sie als Holo-TFIIIC bezeichneten und der u.a. TFIIIC2, PC4 und DNA-Topoisomerase I enthielt. Sie beschrieben, dass eine dieser beiden enthaltenen Aktivitäten, PC4 oder DNA-Topoisomerase I, für eine effiziente *in vitro*-Transkription am VA I-Gen benötigt wird. Der Holo-TFIIIC-Komplex wies neben der TFIIIC2-Aktivität auch TFIIIC1-Aktivität auf.

1996 beschrieben WANG & ROEDER eine funktionell mit TFIIIC1 austauschbare Aktivität, die bei ca. 280 mM KCl von der Phosphocellulose-Säule eluierte (was im Bereich der klassischen PCB-Fraktion liegt, PC<sub>0,35</sub>) und die sie als TFIIIC1' bezeichneten. Auch in unserem Labor konnte in einigen PCB-Präparationen eine TFIIIC1-Aktivität nachgewiesen werden (THOMAE, 2000).

YOSHINAGA et al. zeigten 1987, dass TFIIIC1 nicht primär an die DNA bindet, aber den spezifischen B-Box-Schutz durch TFIIIC2 über die A-Box hinaus erweitert. Weiterhin führt die Zugabe von TFIIIC1 zur Stabilisierung und Verstärkung der TFIIIC2-DNA-Bindung (OETTEL, 1994; WANG & ROEDER, 1996; OETTEL et al., 1997). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass TFIIIC2 in hoher Konzentration auch ohne TFIIIC1 die gesamte Region von der B-Box bis zum Startpunkt abgedeckt (OETTEL et al., 1997).

TFIIIC1 ist für die Transkription aller Polymerase-III-Gene essentiell (LAGNA et al., 1994; YOON et al., 1995; OETTEL et al., 1997) und stellt vermutlich den limitierenden Faktor der Polymerase-III-Transkription dar (YOSHINAGA et al., 1987; HAERTEL, 1999; THOMAE, 2000). Weiterhin spielt TFIIIC1 unter bestimmten Bedingungen eine essentielle Rolle bei der Polymerase-III-Rekrutie-

rung (KOBBER et al., 1998) und stellt vermutlich einen zentralen Angriffspunkt für die Transkriptionsregulation während des Zellzyklus und der Zelldifferenzierung dar (HAERTEL, 1999; THOMAE, 2000; MEISSNER et al., 2002).

Im Gegensatz zu TFIIC1 ist der Transkriptionsfaktor IIC2 sehr gut untersucht. Bei TFIIC2 handelt es sich um einen Multiproteinkomplex bestehend aus 5 Untereinheiten mit einer Größe von 220, 110, 102, 90 und 63 kDa (SCHNEIDER et al., 1989; YOSHINAGA et al., 1989; KOVELMANN & ROEDER, 1992; SINN et al., 1995; Übersicht: HUANG & MARAIA, 2001). Alle Untereinheiten konnten kloniert werden (L'ETOILE et al., 1994; LAGNA et al., 1994; SINN et al., 1995; HSIEH et al., 1999a; HSIEH et al., 1999b). TFIIC2 bindet an die B-Box der AB-Typ-Promotoren, wobei die größte Untereinheit (TFIIC220) die DNA-Bindung vermittelt. Ebenso wie TFIIC110 und TFIIC90 besitzt TFIIC220 HAT-Aktivität (**H**iston-**A**cetyl-**T**ransferase), die den hemmenden Einfluss des Chromatins aufhebt (HSIEH et al., 1999b; HUANG & MARAIA, 2001).

Für TFIIC2 sind zwei verschiedene Formen beschrieben, die eine unterschiedliche Untereinheitenzusammensetzung aufweisen. Bei der einen Form handelt es sich um einen inaktiven TFIIC2 (TFIIC2b), der anstelle von TFIIC110 ein 77 kDa großes Protein besitzt. Die transkriptionsaktive Form (TFIIC2a) enthält die 110 kDa große Untereinheit (HOEFFLER et al., 1988; KOVELMANN & ROEDER, 1992).

#### **1.4.4 TBP**

Das TATA-Box-bindende Protein (TBP) ist ein genereller Transkriptionsfaktor aller drei RNA-Polymerasen, besitzt ein Molekulargewicht von 38 kDa und konnte 1990 kloniert werden (KAO et al., 1990; HOFFMANN et al., 1990). TBP wird ebenfalls für die Transkription TATA-Box-loser Gene benötigt, bei denen es über Protein-Protein-Interaktion wirkt (Übersicht: ROEDER, 1996). Außer bei der Transkription der 5'-regulierten Polymerase-III-Gene liegt TBP in einem Komplex mit TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) vor.

TBP besitzt zwei funktionell getrennte Bereiche, wobei es sich bei dem einen um den konservierten C-Terminus handelt, der eine Sattelstruktur aufweist. Mit der konkaven Unterseite des Sattels bindet TBP an die kleine Furche der DNA im Bereich der TATA-Box (LEE et al., 1991), wobei die DNA geknickt



wird (HORIKOSHI et al., 1992; KIM et al., 1993). Der N-terminale Bereich ist nicht konserviert und unterscheidet sich bei den verschiedenen Organismen. Er ist für die Interaktion mit anderen Proteinen verantwortlich (Übersicht: HERNANDEZ, 1993).

Wie bereits unter 1.4.2 beschrieben, wird TBP in allen drei RNA-Polymerase-Systemen benötigt. Bei der Polymerase I liegt TBP im Komplex mit drei TAFs (48, 63, 110 kDa) vor und wird als SL1 (Selektivitätsfaktor 1) bezeichnet. Dieser Komplex ist nicht DNA-bindend (COMAI et al., 1992; PAULE & WHITE, 2000). Bei der Polymerase II liegt TBP im Komplex mit mindestens zehn TAFs vor und wird als TFIID bezeichnet (TANESE et al., 1991). TFIID bindet über TBP an die TATA-Box und initiiert so die Assemblierung des Polymerase-II-Transkriptionskomplexes. TFIID ist jedoch auch an der Transkription TATA-Box-loser Polymerase-II-Gene beteiligt (Übersicht: SHARP, 1992).

Wie ebenfalls unter 1.4.2 beschrieben, bindet der Polymerase-III-spezifische TBP-TAF-Komplex, der für die Transkription der genintern regulierten Gene benötigt wird, nicht primär an die DNA, sondern wird über Protein-Protein-Wechselwirkung in den Transkriptionskomplex integriert (TFIIIB bei WHITE et al., 1992; WANG & ROEDER, 1995; TFIIIB bei TEICHMANN & SEIFART, 1995). Für die Expression der 5'-regulierten Polymerase-III-Gene wird neben TFIIIB freies TBP benötigt, das direkt an die TATA-Box bindet (WALDSCHMIDT et al., 1991; SIMMEN et al., 1991; TEICHMANN & SEIFART, 1995; SCHRAMM et al., 2000; CABART & MURPHY, 2001; CABART & MURPHY, 2002).

#### **1.4.5 PBP**

Dieser Transkriptionsfaktor wird nur für die Expression der 5'-regulierten Polymerase-III-Gene benötigt, bei denen er an das proximale Sequenz-Element (PSE) bindet und daher als **PSE-bindendes Protein (PBP)** bezeichnet wird (WALDSCHMIDT et al., 1991). Die DNA-Bindung durch PBP stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Transkription der 5'-regulierten Gene dar (WANANDI et al., 1993).

Es wurden unabhängig von PBP zwei Aktivitäten beschrieben, die ebenfalls das PSE binden und als **snRNA activating protein complex (SNAPc)** (SADOWSKI et al., 1993; HENRY et al., 1996) bzw. **PSE binding transcription**

factor (PTF; MURPHY et al., 1992) bezeichnet wurden. Vermutlich handelt es sich bei allen drei Aktivitäten um den gleichen Multiproteinkomplex.

## **1.5 Der Transkriptionszyklus im Polymerase-III-System**

### **1.5.1 Sequenzieller Aufbau des Initiationskomplexes**

Der Aufbau des Initiationskomplexes ist in der Hefe (*S. cerevisiae*) sehr gut untersucht. Hier stellt yTFIIIC den primär DNA-bindenden Transkriptionsfaktor dar, der an die A-Box und die B-Box des Promotors bindet (s. 1.4.3). Über Protein-Protein-Interaktion wird yTFIIIB in den Initiationskomplex integriert und bindet jetzt ebenfalls an die DNA (s. 1.4.2); er ist jedoch nicht in der Lage, in Abwesenheit von yTFIIIC die Promotor-Sequenzen zu erkennen und zu binden. Der yTFIIIC-yTFIIIB-Komplex am tRNA- und 5S-rRNA-Gen schützt die DNA bis ca. Bp -42 im 5'-flankierenden Bereich des Gens vor DNase-I-Verdau. Es zeigt sich jedoch eine Hypersensitive Site im Bereich des Initiators, so dass Interaktionen der Polymerase III mit dem Initiator möglich sind (KASSAVETIS et al., 1989; BRAUN et al., 1989; KASSAVETIS et al., 1990).

Im humanen System besteht der erste Schritt im Transkriptionszyklus ebenfalls aus der Anlagerung von primär DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren an bestimmte DNA-Sequenzen des entsprechenden Promotors (Initiation). Am 5S-rRNA-Gen erfolgt dies durch die Bindung von TFIIIA an die ICR, am VA I- und tRNA-Gen durch die Bindung von TFIIIC2 an die B-Box sowie am U6-snRNA-Gen durch die Bindung von PBP an das PSE. Anschließend lagern sich die anderen Transkriptionsfaktoren in sequenzieller Reihenfolge an den Initiationskomplex an (LASSAR et al., 1983; BIEKER et al., 1985; DEAN & BERK, 1988; OETTEL et al., 1997): Im Falle des 5S-rRNA-Gens wird TFIIIC2 über Protein-Protein-Interaktion in den bestehenden Komplex aus TFIIIA und der DNA eingebunden. Bei den AB- und AC-Typ-Promotoren wird als nächster Faktor TFIIIB rekrutiert; der genaue Mechanismus und die Bindungsregion sind allerdings noch nicht bekannt. Interaktionen von TFIIIC2-Untereinheiten (TFIIIC102 und TFIIIC63) mit TFIIIB90 und TBP (HSIEH et al., 1999a;

HSIEH et al., 1999b) geben allerdings Hinweise darauf, dass eine direkte Interaktion zwischen diesen beiden Faktoren erfolgt.

Am 5S-rRNA-Gen durchgeführte Gelfiltrationsexperimente haben gezeigt, dass TFIIIB als dritter Faktor in den Initiationskomplex eingebunden wird, nachdem TFIIIA und TFIIIC2 bereits gebunden haben (RIEMANN, 2002). Es sind zwar Interaktionen von TFIIIB mit der Polymerase-III-Untereinheit RPC39 bekannt (WANG & ROEDER, 1997), diese allein scheinen allerdings nicht für die Rekrutierung der Polymerase III auszureichen, da in Abwesenheit von TFIIIC1 keinerlei Transkriptionsaktivität nachzuweisen ist (RIEMANN, 2002). TFIIIC1 ist also essentiell notwendig für die 5S-rRNA-Transkription. Das gleiche gilt für die Transkription der AB-Typ-Gene.

Untersuchungen am Polymerase-II-abhängigen Enten-H5-Gen mit humanen Polymerase-III-Transkriptionsfaktoren zeigten, dass hier TFIIIB ohne die Hilfe von TFIIIA und/oder TFIIIC2 an das Gen binden kann und bei Zugabe von TFIIIC1 in der Lage ist, die Polymerase III zu rekrutieren und die Transkription zu initiieren (KOBBER et al., 1998).

Am U6-snRNA-Promotor findet eine kooperative Bindung von TBP statt, wenn PBP (SNAPc) bereits an das PSE gebunden hat, doch freies TBP kann auch in Abwesenheit von PBP an die TATA-Box binden (MITTAL et al., 1997; MA & HERNANDEZ, 2002).

Über Protein-Protein-Interaktion mit TBP wird zuerst TFIIIB50 (TFIIIU/BRFU) in den entstehenden Komplex eingebunden (OETTEL et al., 1998; SCHRAMM et al., 2000), anschließend wird TFIIIB150 rekrutiert und bildet zusammen mit TFIIIB50 TFIIIB (CABART & MURPHY, 2001; CABART & MURPHY, 2002).

Auch hier wird TFIIIC1 benötigt, bevor die Polymerase III rekrutiert werden kann (YOON et al., 1995; OETTEL et al., 1997).

In der Hefe können durch Heparin-Einwirkung yTFIIIC und yTFIIIA von der DNA abgelöst werden, während yTFIIIB an der DNA gebunden bleibt und weiterhin multiple Transkriptionsrunden initiieren kann (KASSAVETIS et al., 1990). Daher wird yTFIIIB als der alleinige Initiationsfaktor in der Hefe angesehen. Dies wird durch eine direkte Interaktion zwischen yTFIIIB (yTFIIIB70) und der Polymerase III (yRPC34, yRPC17) ermöglicht (WERNER et al., 1993; KHOO et al., 1994; BRUN et al., 1997; ANDRAU et al., 1999; FERRI et al., 2000).

Auch im humanen System gibt es Hinweise darauf, dass TFIIC2 zwar durch Heparin-Einwirkung abgelöst wird, der an der DNA verbliebene TFIIB aber trotzdem in der Lage ist, TFIIC1 und die Polymerase III zu rekrutieren und eine Multiple-Round-Transkription einzuleiten (WAGNER, 2002).

### **1.5.2 Initiation, Elongation, Termination und Reinitiation**

Nachdem die Polymerase III in den Initiationskomplex eingebunden worden ist, spricht man von einem binären (bestehend aus DNA und Proteinen), geschlossenen Komplex (BIEKER et al., 1985; KASSAVETIS et al., 1990; KOVELMANN & ROEDER, 1990; KASSAVETIS et al., 1992a). Jetzt schmilzt die Polymerase III die DNA im Bereich des Startpunkts auf, womit der binäre, geschlossene Komplex in einen binären, offenen Komplex übergeht. Dieser Vorgang ist reversibel. Sobald die Polymerase III mit der RNA-Synthese begonnen hat, spricht man von einem ternären Komplex. Dieser Vorgang ist irreversibel und die sich in der Elongationsphase befindliche Transkription kann auch nicht durch hohe Konzentration von Heparin, Salz oder Sarkosyl gestört werden (KOVELMANN & ROEDER, 1990; KASSAVETIS et al., 1992a; GEIDUSCHEK & KASSAVETIS, 1992).

Der Vorgang der Elongation stellt die Verlängerung der RNA-Kette dar und wird solange fortgeführt, bis die Polymerase auf den Terminator trifft, der aus mindestens vier Thymidinresten im nicht-kodierenden Strang besteht und an dem die RNA-Synthese beendet wird. Die Stärke des Terminators hängt von der Anzahl der Thymidinreste ab (BOGENHAGEN & BROWN, 1981; GEIDUSCHEK & TOCCHINI-VALENTINI, 1988).

Es konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, ob die an den genintern liegenden Promotor gebundenen Transkriptionsfaktoren für die Polymerase ein Hindernis darstellen oder ob die Transkriptionsfaktoren während der Passage der Polymerase vorübergehend abgelöst werden. In der Hefe konnte gezeigt werden, dass der an die DNA gebundene TFIIC für die Polymerase kein Hindernis (und damit Syntheseverzögerung) darstellt, zumindest solange TFIIC in der korrekten Orientierung an die DNA gebunden vorliegt. Vermutlich wird TFIIC aber von der Polymerase abgelöst (MATSUZAKI et al., 1994; BARDELEBEN et al., 1994).

An so genannten „Pausing Sites“ in den Polymerase-III-Genen in der Hefe arretiert die Polymerase III reversibel während der Elongation (STEINBERG & BURGESS, 1992; MATSUZAKI et al., 1994; BARDELEBEN et al., 1994; SHAABAN et al., 1996). Diese Pausing Sites kontrollieren die Geschwindigkeit der Polymerase III und werden von ihr benötigt, um die Transkription am Terminator zu beenden (SHAABAN et al., 1996; BOBKOVA & HALL, 1997; CHEDIN et al., 1998). Sobald die Polymerase den Terminator erreicht und erkannt hat, wird der ternäre Komplex aufgelöst, indem die synthetisierte RNA aus dem Komplex entlassen wird. Direkt nach Freisetzung der RNA dissoziiert die Polymerase III von der DNA (CAMPBELL & SETZER, 1992).

In der Hefe (*S. cerevisiae*) konnte gezeigt werden, dass die Polymerase nach Beendigung des ersten Zyklus an den gleichen Präinitiationskomplex zurückkehrt (Reinitiation) und nicht auf einen anderen aufspringt (DIECI & SENTENAC, 1996). Für die klassischen Gene im humanen System wurde ebenfalls beschrieben, dass die Polymerase nach der Termination ein zweites Mal an den Initiator rekrutiert wird. Dieser Vorgang unterscheidet sich allerdings von der primären Initiation, da die Assemblierung des Transkriptionskomplexes bereits erfolgt ist. Das bedeutet, dass der einmal assemblierte Komplex für mehrere Zyklen erhalten bleibt, wobei nicht klar ist, ob alle Transkriptionsfaktoren an der DNA gebunden bleiben (KOVELMANN & ROEDER, 1990; WESER, 2000).

Wie *in vitro*-Versuche zeigten, dauert die Assemblierung des Transkriptionskomplexes einige Minuten, während die RNA-Synthese nur Sekunden dauert (BIEKER et al., 1985; KOVELMANN & ROEDER, 1990; MATSUZAKI et al., 1994; BARDELEBEN et al., 1994; DIECI & SENTENAC, 1996). Wahrscheinlich sind die über hundert Reinitiationsvorgänge pro Stunde an immer dem gleichen Transkriptionskomplex für die außerordentliche Syntheseleistung der Polymerase III in Eukaryoten verantwortlich (KOVELMANN & ROEDER, 1990; DIECI & SENTENAC, 1996).

## **1.6 Das Retinoblastoma-Protein (Rb)**

Das Retinoblastoma-Protein (Rb) gehört zur Gruppe der Tumorsuppressorproteine (Rb, p107, p130, p53), die eine wichtige Rolle bei der Transkriptionskontrolle spielen. Bei Rb handelt es sich um ein 105 kDa großes nukleäres

Phosphoprotein, das im hypophosphorylierten Zustand proliferationsinhibierende Wirkung zeigt (LEE et al., 1987; LEE et al., 1988; BERNARDS et al., 1989; KOUZARIDES, 1993). Im Laufe des Zellzyklus wird Rb von Cyclin-abhängigen Kinasen phosphoryliert, was zu einer Reduktion der Aktivität von Rb führt; im hyperphosphorylierten Zustand hat Rb ein Molekulargewicht von 116 kDa (Übersicht: TAYA, 1997).

Der C-Terminus von Rb weist eine „Pocket“-Domäne auf, mit der hypophosphoryliertes Rb unterschiedliche zelluläre Proteine binden kann, die sowohl positiv als auch negativ an der Transkriptionsregulation bestimmter Gene beteiligt sind (z.B. ATF-2, E2F, Myo-D; Übersicht: KOUZARIDES, 1993).

Desweiteren wird die RNA-Synthese der Polymerase I und III durch Rb reguliert. Im Polymerase-I-System ist UBF (**u**pstream **b**inding **f**actor) das Zielprotein von Rb. UBF stimuliert die Transkription des 45S-rRNA-Gens durch die Interaktion mit der Polymerase I und wahrscheinlich auch SL1 (s. 1.4.2 und 1.4.4; Übersicht: TAYA, 1997).

Verschiedene Beobachtungen führten zu der Annahme, dass im Polymerase-III-System TFIIIB (was in diesem Falle TFIIIB entspricht, da diese Untersuchungen nur an den klassischen Polymerase-III-Genen durchgeführt wurden) der Angriffspunkt für Rb sein könnte (Übersicht: WHITE, 1997): Die Zugabe von rekombinantem Rb zu einer rekonstituierten *in vitro*-Transkription hatte eine Aktivitätsabnahme von TFIIIB( ) zur Folge, aber keine Reduktion der Bindungsaktivität von TFIIIC (TFIIIC2). Auch die Koelution einer Rb-Population mit TFIIIB( ) über mehrere Chromatographien sowie die Daten aus einer Immunopräzipitation, die zeigten, dass Rb mit Untereinheiten von TFIIIB( ) komplexiert vorliegt, wiesen darauf hin, dass TFIIIB( ) das Zielprotein für Rb darstellt (SUTCLIFFE et al., 1999).

Gegen eine stabile Komplexierung von Rb und TFIIIB sprechen allerdings Daten, die deutlich zeigen, dass eine Trennung von TFIIIB und Rb mit Hilfe einer Ammoniumsulfatfällung (30 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) bzw. einer ESF-Chromatographie relativ leicht möglich ist (HAERTEL, 1999; THOMAE, 2000).

Weiterhin zeigten Experimente mit murinen F9-Zellen, bei denen die Differenzierung von embryonalen Carcinomazellen (EC) zu parietalen Endodermzellen (PE) untersucht wurde, dass nicht TFIIIB (s. 1.4.2), sondern TFIIIC1 der

limitierende Faktor während der Differenzierungsphase ist und damit verantwortlich für die Repression der Polymerase-III-Transkription (THOMAE, 2000; MEISSNER et al., 2002). Untersuchungen hinsichtlich einer möglichen Interaktion zwischen Rb und einem der basalen Polymerase-III-Transkriptionsfaktoren brachten keine Anhaltspunkte für eine derartige Komplexierung. Im Gegenteil, gerade die transkriptionsstimulierende TFIIIC1-Fraktion enthielt eine große Menge an hypophosphoryliertem, aktivem Rb. Auch zeigten die undifferenzierten und die differenzierten Zellen keinen signifikanten Unterschied in ihrem Rb-Gehalt (THOMAE, 2000; MEISSNER et al., 2002).

### **1.7 Der Positive Cofactor 4 (PC4) und die DNA-Topoisomerase I**

Sowohl die DNA-Topoisomerase I als auch der Positive Cofactor 4 (PC4) ist als Aktivator der Polymerase-II-Transkription bekannt (KRETZSCHMAR et al., 1993; KRETZSCHMAR et al., 1994; MERINO et al., 1993; GE & ROEDER, 1994; Übersicht: KAISER & MEISTERERNST, 1996; SHYKIND et al., 1997). PC4 stabilisiert den am Promotor gebildeten TFIID/TFIIA-Komplex (KAISER et al., 1995), indem er mit transaktivierenden Domänen 5'-gebundener Faktoren und mit TFIIA interagiert und so die Transkription verschiedener Polymerase-II-Gene verstärkt (GE & ROEDER, 1994; KRETZSCHMAR et al., 1994). Die C-terminale Hälfte des Proteins kann mit einzelsträngiger DNA interagieren (BALLARD et al., 1988; KRETZSCHMAR et al., 1994), während die N-terminale Hälfte von PC4 doppelsträngige DNA destabilisiert und so möglicherweise zur Promotoröffnung beiträgt (WERTEN et al., 1998). Die Phosphorylierung von PC4 durch die Proteinkinase CK2 (s. 1.8) inhibiert die Bindung an doppelsträngige DNA und die stimulierende Aktivität des Proteins (GE & ROEDER, 1994; KRETZSCHMAR et al., 1994; KAISER et al., 1995). Der genaue Mechanismus, wie PC4 die Polymerase-III-Transkription stimuliert, ist allerdings noch nicht bekannt.

Die Topoisomerase I interagiert ebenfalls mit TFIID (MERINO et al., 1993) und verstärkt die Bildung eines aktiven TFIID/TFIIA-Komplexes am Promotor (SHYKIND et al., 1997). Außerdem stimuliert die DNA-Topoisomerase I die Polymerase-I-Transkription, indem sie die zunehmende Torsion während der

Elongation behebt (GARG et al., 1987; ZHANG et al., 1988). Der stimulierende Effekt der DNA-Topoisomerase I in der Polymerase-II- und -III-Transkription hängt dagegen - zumindest *in vitro* - nicht mit der Topoisomerase-Aktivität des Proteins zusammen (KRETZSCHMAR et al., 1993; MERINO et al., 1993; SHYKIND et al., 1997), was aber mit der Situation *in vivo* nicht unbedingt identisch sein muss (WANG & ROEDER, 1998).

### **1.8 Die Proteinkinase CK2**

Die früher als Casein Kinase bezeichnete Proteinkinase CK2 ist ein hochkonserviertes Protein, das wachstumsfördernde und onkogene Eigenschaften besitzt (Reviews: LITCHFIELD, & LUSCHER, 1993; ALLENDE & ALLENDE, 1995).

Die CK2 phosphoryliert Proteine, sowohl im Kern als auch im Zytoplasma, an Serin- und Threonin-Resten. Bei dieser Proteinkinase handelt es sich um ein Tetramer, das zum einen aus zwei katalytischen Untereinheiten,  $\alpha$  und  $\beta$ , zum anderen aus zwei regulatorischen Untereinheiten,  $\gamma$  und  $\delta$ , besteht.

JOHNSTON et al. (2002) zeigten, dass TFIIIB in einem stabilen Komplex mit der CK2 vorliegt. Nur in diesem Zustand soll TFIIIB aktiv sein und in den Polymerase-III-Transkriptionskomplex eingebunden werden können.

### **1.9 Zielsetzung**

Obwohl der Transkriptionsfaktor IIC1 bereits seit 15 Jahren bekannt ist, konnte bisher die genaue Struktur und Funktionsweise dieses Proteins nicht aufgeklärt werden. Es konnte gezeigt werden, dass TFIIIC1 bei der Transkriptionsregulation während des Zellzyklus und der Zelldifferenzierung eine Rolle spielt (HAERTEL, 1999; THOMAE, 2000; MEISSNER et al., 2002). Die genaue Wirkungsweise des Transkriptionsfaktors IIC1 im Ablauf des Transkriptionszyklus ist allerdings bisher nicht bekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher zum einen, die funktionelle Beziehung von TFIIIC1 zu anderen, die Polymerase-III-Transkription beeinflussenden Proteinen nachzuweisen. Zum anderen sollte der Faktor soweit gereinigt werden, dass einzelne Polypeptide des Multiproteinkomplexes im Hinblick auf ihre spätere Klonierung identifiziert werden können.



## 2 Material

### Radioaktive Nukleotide:

( <sup>-32</sup> P)GTP (3000 Ci/mmol)	Amersham Biosciences, Freiburg;
( <sup>-32</sup> P)ATP (7000 Ci/mmol)	Hartmann, Braunschweig ICN, Eschwege

### Unmarkierte Nukleotide:

Desoxy-/Ribonukleosidtriphosphate	Roche, Mannheim
-----------------------------------	-----------------

### Enzyme, Antikörper und Inhibitoren:

#### DNA-modifizierende Enzyme:

Restriktionsendonukleasen (jeweils mit geeignetem Puffer):	Roche, Mannheim; Biolabs, Schwalbach
T4-Polynukleotidkinase	Roche, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP)	Roche, Mannheim

#### Sonstige Enzyme:

Casein Kinase II (human, recombinant)	NEB, Frankfurt/Main
DNA-Topoisomerase I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Proteinase K	Roche, Mannheim
RNAse A	Roche, Mannheim
Taq-Polymerase	Sigma Aldrich, Deisenhofen

#### Antikörper:

Anti-Maus-Ig, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt	Amersham Biosciences, Freiburg
Anti-Kaninchen-Ig, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt	Amersham Biosciences, Freiburg
Anti-Maus-Ig, <sup>125</sup> I markiert (21,3 µCi/µg)	Amersham Biosciences, Freiburg
Anti-Kaninchen-Ig, <sup>125</sup> I markiert (21,3 µCi/µg)	Amersham Biosciences, Freiburg
Mouse-anti-Human Rb (gegen alle Formen)	PharMingen, San Diego
Casein Kinase II (H-286), rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz, Heidelberg
monoklonale Antikörper (Maus) gegen hTBP	
polyklonale Antikörper (Kaninchen) gegen hTFIIIB90	
polyklonale Antikörper (Kaninchen) gegen hTFIIIC63	

**Inhibitoren:**

Heparin, Natriumsalz, Grade I-A aus Schwein	Sigma Aldrich, Deisenhofen
-Amanitin	Roche, Mannheim
Prime RNase Inhibitor™	Eppendorf, Hamburg

**Kits:**

ECL Western Blotting detection reagent	Amersham Biosciences, Freiburg
QIAquick Nucleotide Removal Kit (250)	Qiagen, Hilden
EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit	Pierce, Rockford
ImmunoPure® Ultra-Sensitive ABC	Pierce, Rockford
Peroxidase Staining Kit	

**Marker:**

pBR 322 DNA-MspI Digest	Biolabs, Schwalbach
Proteinmarker (Mark 12 MW Standard)	Novex, San Diego
SeeBlue™ plus2 (Prestained Standard)	Novex, San Diego

**Gelelektrophoretische Materialien:**

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Dichlorodimethylsilan	Fluka, Buds (Schweiz)
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Formamid	Fluka, Buds (Schweiz)
Harnstoff	Gerbu, Gaiberg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
N,N,-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
N,N,N',N'-Tetramethylethylenamid (TEMED)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
ProSieve® 50 Gel Solution	Bio Whittaker, Rockland Maine
Xylen Cyanol FF	Serva, Heidelberg

**Chromatographie-Medien:**

Phenyl Sepharose® 6 FF (high sub) (1 ml Fertigsäule)	Amersham Biosciences, Freiburg
EMD-DEAE Fractogel 650 (S)	Merck, Darmstadt
EMD-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Fractogel 650 (S)	Merck, Darmstadt
Mono Q (Fertigsäule) HR 10/10	Amersham Biosciences, Freiburg
Mono S (Fertigsäule) HR 5/5	Amersham Biosciences, Freiburg
Phosphocellulose P 11	Whatman, London
Q Sepharose FF (Fast Flow)	Amersham Biosciences, Freiburg
Source 15 S	Amersham Biosciences, Freiburg
Superdex 200 HR 10/30 (Fertigsäule)	Amersham Biosciences, Freiburg

Sephadex G25  
Sephacryl 400 und 500

Amersham Biosciences, Freiburg  
Amersham Biosciences, Freiburg

**Reagenzien für mikrobiologische Arbeiten:**

Agar	Life Technologies, Paisley, UK
Agarose	Eurogentec, Borken
Ampicillin (Ratio®)	Ratiopharm, Ulm
Bacto-Trypton	Life Technologies, Paisley, UK
Hefeextrakt	Life Technologies, Paisley, UK
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid)	Life Technologies, Paisley, UK
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (X-Gal)	Roche, Mannheim

**Sonstige Materialien und Substanzen:**

DE81 Membran	Whatman, London
Dialyseschlauch	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Gerbu, Gaiberg
Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EDTA)	Gerbu, Gaiberg
Filterpapier 17CHR	Whatman, London
Glykogen	Fermentag, Littauen
Imaging Plate BAS-MP 2040	Fuji, Kanagawa, Japan
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Mikrokollodiumhülsen	Sartorius, Göttingen
Mikrospin-Säule Mobicol	MoBiTec, Göttingen
Milchpulver	Gifco, Detroit
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure (HEPES)	Gerbu, Gaiberg
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Phenol	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva, Heidelberg
Polaroid-Film Polapan 57	Polaroid, Frankfurt
Protein dye concentrate (Bradford)	Biorad, München
Rinderserumalbumin (BSA)	Boehringer Mannheim
RNAse Block Ribonuclease Inhibitor	Stratagene, Heidelberg
Spermin 4HCl	Serva, Heidelberg
Spermidin 3HCl	Serva, Heidelberg
Standard-Proteingemisch für Gelfiltration	Sigma Aldrich, Deisenhofen
StrataClean Resin Silica Partikel	Stratagene, Heidelberg
Szintillationscocktail Rotiszint ecoplus	Roth, Darmstadt
Transfermembran Immobilon P	Millipore, Bedford, USA
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Merck, Darmstadt
Verstärkerfolie (Intensifying Screen)	Du Pont, Nemours
X-Omat UV Film	Eastman-Kodak, Rochester

alle anderen nicht aufgeführten Chemikalien stammen von: Merck, Darmstadt

**Zellkultur:**

HEK-Tumorzelllinie  
HeLa-Tumorzelllinie

Institutseigene Linie  
Institutseigene Linie

**Zellkulturmaterialien:**

"Minimum Essential" Medium (S-MEM)	Life Technologies, Paisley, UK
Hybridoma-Medium	Life Technologies, Paisley, UK
"New born" Kälberserum	Life Technologies, Paisley, UK
Fätales Kälberserum	Life Technologies, Paisley, UK
Streptomycinsulfat	Serva, Heidelberg
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Life Technologies, Paisley, UK
L-Glutamin	Biochrom

**Bakterienstämme:**

*E.coli* XL1-Blue

Institutseigener Stamm

**Verwendete Plasmide und andere Desoxynukleinsäuren:**

**pUVA1** trägt das aus pVA über Sall/AluI -Restriktion gewonnene VAI-Gen in der HincII-Stelle von pUC 18 (SCHNEIDER et al., 1989).

**pUC 9** Institutseigenes Plasmid

**poly-(dIdC)** Roche, Mannheim

**Oligonukleotide (Primer):**

M13 sequencing Primer (17mer):

5'-gtaaacgacgccagt-3'

M13 reversed sequencing Primer (17mer)

5'-caggaaacagctatgac-3'

M13 sequencing Primer (24mer)

5'-cgccagggtttcccagtcacgac-3'

M13 reversed sequencing Primer (24mer)

5'-agcggataacaatttcacacagga-3'

### 3 Methoden

*Vorbemerkung: Die im Folgenden aufgeführten Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, in Reinstwasser einer Christ Labostil – Anlage angesetzt (Aqua bidest).*

#### 3.1 Anzucht und Stammhaltung von Bakterien

**Material:**

L-Broth (LB)-Medium:	5g NaCl; 5 g Hefeextrakt; 10 g Trypton; ad 1000 ml A.bid.
TB-Medium:	12 g Trypton; 24 g Hefeextrakt; 4 ml 100 % Glycerin; 2,31 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 12,5 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; ad 1000 ml A.bid.
Ampicillin:	100 mg/ml (Ampicillin ratio <sup>R</sup> )

**Durchführung:**

Alle Arbeiten mit Bakterien wurden unter Verwendung autoklavierten Materials unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Anzucht der Bakterien wurde entweder in LB-Medium (für analytische Zwecke) oder in TB-Medium (zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA) durchgeführt. Die jeweils angepflanzten Medien enthielten 100 µg/ml Ampicillin und wurden bei 37°C und 250 Rpm auf dem Schüttler inkubiert.

#### 3.2 Zellkultur

##### 3.2.1 Anzucht menschlicher Tumorzellen in Suspensionskultur

**Materialien:**

Eagle's Minimalmedium	
New Born Kälberserum	
Antibiotika-Lösung:	Penicillin: 1000 U/ml; Streptomycin: 755 U/ml
Streptomycinsulfat	
Natriumhydrogencarbonat	

**Durchführung:**

Anzucht und Stammhaltung der menschlichen Cervix-Karzinom-Zelllinie HeLa und der embryonalen Nierenzelllinie HEK erfolgte in „Eagle's minimal essential medium“ (S-MEM) unter Zusatz von 5% (v/v) „new born“ Kälberserum, 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin-Lösung, 0,1 mg/ml Streptomycinsulfat und 2,2

mg/ml Natriumhydrogencarbonat bis zu einer Zelldichte von  $4-6 \times 10^5$  Zellen pro ml Medium.

### 3.3 Präparation zellfreier Extrakte

#### 3.3.1 Präparation von zytoplasmatischem Extrakt (S100) aus HeLa- oder HEK-Zellen (nach WEIL et al., 1979)

##### Materialien:

Puffer 1:	30 mM Tris-HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl
Puffer 2:	10 mM Tris-HCl (pH 7,9); 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,5 mM DTT
Puffer 3:	300 mM Tris-HCl (pH 7,9); 1,4 M KCl; 30 mM MgCl <sub>2</sub>
DTT	
PMSF:	100 mM in Isopropanol

##### Durchführung:

Die Zellen wurden durch zehnmütige Zentrifugation bei  $1000 \times g$  (1300 Rpm, 4°C) sedimentiert und mit Puffer 1 gewaschen. Nach Bestimmung des „packed-cell-volume“ (PCV) wurden die Zellen anschließend durch Aufnahme in  $2,5 \times PCV$  hypotonem Puffer 2 und Inkubation für 20 Minuten im Eisbad zum Quellen gebracht. Zum Aufschluss der Zellen wurden diese im Potter homogenisiert, wobei die Vollständigkeit der Homogenisierung lichtmikroskopisch verfolgt wurde (Zerstörung der Zellmembran unter Erhalt der intakten Kerne). Nachdem durch Zufügen von 1/10 Volumenteil hypertonem Puffer 3 wieder isotomische Bedingungen hergestellt worden waren, folgte eine Ultrazentrifugation für 90 Minuten bei  $100000 \times g$  (= 33000 Rpm; Beckmann Ti 60) und 4°C, bei der Kerne und Zelltrümmer sedimentieren. Der „S100“-Überstand (S = Supernatant) wurde dekantiert mit Glycerin auf eine Endkonzentration von ca. 10% Glycerin verdünnt, mit 3 mM DTT und 0,2 mM PMSF versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Die Proteinkonzentration der Überstände betrug 10-15 mg/ml.

### 3.3.2 Präparation von Kernextrakt (modif. nach SHAPIRO et al., 1988)

#### Materialien:

Puffer 1:	30 mM Tris-HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl;
Puffer 2:	10 mM Hepes (pH 7,9); 0,75 mM Spermidin-3HCl; 0,15 mM Spermin-3HCl, 0,1 mM EDTA (pH 8); 0,1 mM EGTA (pH 8), 7,5 mM DTT; 10 mM KCl
Puffer 3:	0,5 M Hepes (pH 7,9); 7,5 mM Spermidin-3 HCl; 1,5 mM Spermin-3 HCl, 100 mM KCl; 2 mM EDTA; 7,5 mM DTT
Puffer 4	9 Volumen 75% (w/v) Saccharose, 1 Vol. Puffer 3
Puffer 5:	20 mM Hepes (pH 7,9); 0,75 mM Spermidin-3 HCl, 0,15 mM Spermin-3HCl, 0,2 mM EDTA; 0,2 mM EGTA, 7,5 mM DTT; 25% Glyzerin
Ammoniumsulfat-Lsg.:	gesättigte Lösung bei 0°C (>3,9 M Ammoniumsulfat)

#### Durchführung:

Bei einer Zelldichte von  $4-7 \times 10^5$  Zellen / ml Medium wurden die Zellen durch 10 min Zentrifugation bei 700 Rpm (170 x g) und 4°C pelletiert und dann in Puffer 1 gewaschen. Das PCV („packed cell volume“) wurde durch Aufnahme der Zellen in 100 ml Puffer 1 bestimmt (PCV= x-100 ml). Die Zellen wurden in 5 x PCV (hypotonem) Puffer 2 aufgenommen und für 10 Minuten auf Eisquellen gelassen. Nach erneuter Pelletierung und Aufnahme in 2 x PCV Puffer 2 wurden die Zellen durch fünfmaliges Pottern aufgeschlossen. Um die noch intakte Kernmembran zu schützen, wurde zügig durch Zugabe von 0,1 VT Puffer 4 wieder isotone Verhältnisse geschaffen. Danach wurden die Kerne durch 30-60 Sekunden Zentrifugation bei 10000 Rpm im Sorvall HB4-Rotor pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet aus den Kernen wurde in 3 ml/10<sup>9</sup> Zellen Puffer 5 durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren in einer 10 ml Glaspipette homogenisiert und in ein Becherglas großen Durchmessers überführt. Über 10 Minuten wurden 0,1 Volumenteile der gesättigten Ammoniumsulfatlösung tropfenweise zugesetzt und somit die Kerne aufgeschlossen. Nach Zugabe etwa der Hälfte der Ammoniumsulfatlösung bildete sich ein zäher Schleim. Nach weiteren 30 Minuten Rühren wurde die hochvisköse Lösung in Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und 90 Minuten bei 40000 Rpm (180000 x g, Beckmann Ti-55.2, 4°C) zentrifugiert. Danach wurde vorsichtig eine kleine Lipidschicht abgehoben und der Überstand dekantiert.

Dieser wurde unter zweimaligem Pufferwechsel 6-8 Stunden gegen Phosphocellulosepuffer dialysiert (3.5.6).

### 3.4 Gelelektrophoretische Methoden

#### 3.4.1 Agarose-Gele

Zur Größen- und Konzentrationsbestimmung großer DNA-Fragmente (>600 bp) dienen native Agarose-Gele. Die Elektrophorese erfolgt, je nach Trennproblem, in Gelen mit einem Agarosegehalt von 0,8 bis 1,5% (w/v).

**Material:**

Agarose	
5 x TBE-Puffer:	450 mM Tris; 450 mM Borsäure; 1,5 mM EDTA
10 x TBE-Probenpuffer:	10 x TBE (s.o.) mit 50% (w/v) Saccharose; 1% (w/v) Bromphenolblau; 1% (w/v) Xylencyanol
Geltyp:	Flachbett-Gele
Lauf:	0,5 bis 2 Stunden bei 5V/cm Elektrodenabstand

**Durchführung:**

Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1 x TBE-Puffer unter Aufkochen gelöst und nach kurzzeitigem Abkühlen in die Gelapparatur gegossen. Um eine Überladung bei präparativen Gelen zu vermeiden, sollte die maximale DNA-Menge 5 µg pro cm Gel-Breite nicht überschreiten. Die Gele wurden bereits vor dem Gießen mit Ethidiumbromid versetzt. Die Größe und Menge der aufgetragenen DNA-Fragmente wurde durch Vergleich mit Markerfragmenten bekannter Größe und Konzentration nach 3.6.5 bestimmt.

#### 3.4.2 Denaturierende Polyacrylamid-Harnstoff-Gele

Zur Analyse der durch *in vitro* Transkription synthetisierten, radioaktiv markierten RNA-Moleküle (3.7.1) wurden denaturierende 6%ige Polyacrylamid-Gele verwendet.



**Material:**

AA / BB-Lösung:	28,5% (w/v) Acrylamid; 1,5% (w/v) Bisacrylamid (30%ig)
Harnstoff	
5 x TBE-Puffer:	450 mM Tris; 450 mM Borsäure; 1,5 mM EDTA
Laufpuffer:	1 x TBE-Puffer
Silikonlsg.:	4% (v/v) Dichlordimethylsilan in Tetrachlormethan
TEMED	
APS:	10% (w/v)
Geltyp:	vertikales Gel
Lauf:	1 bis 4 Stunden bei 700 bis 1500 V

**Durchführung:**

6%ige Gele enthielten in einem Endvolumen von 50 bzw. 100 ml:

AA / BA-Lösung	10 ml	20 ml
Harnstoff	25 g	50 g
5 x TBE-Puffer	10 ml	20 ml
A.bid.	ad 50 ml	ad 100 ml
TEMED / APS	30 µl / 500 µl	50 µl / 1000 µl

Vor dem Zusammensetzen der Gelapparatur wurde eine der Glasplatten („Ohrenplatte“) mit Silikonisierungslösung behandelt. Die Gellösung wurden sterilfiltriert. Durch Zugabe von TEMED und APS wurde die Polymerisation eingeleitet. Nach einer Polymerisationszeit von mindestens 60 Minuten wurden die Proben aufgetragen. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel zur qualitativen Analyse autoradiographiert (3.9.1).

**3.4.3 Native Polyacrylamid-Gele für DNA-Analysen**

Zur Größenbestimmung und Präparation kleinerer DNA-Fragmente (<600 bp) wurden 5-20%ige native Polyacrylamid-Gele benutzt.

**Material:**

AA / BA-Lösung:	28,5% (w/v) Acrylamid; 1,5% (w/v) Bisacrylamid (30%)
5 x TBE-Puffer:	450 mM Tris; 450 mM Borsäure; 1,5 mM EDTA
10 x TBE-Probenpuffer:	s. 3.4.1.
TEMED	
APS:	10% (w/v)
Laufpuffer:	1 x TBE-Puffer
Geltyp:	vertikales Gel
Lauf:	1 bis 3 Stunden bei 40 mA

**Durchführung:**

5%ige Gele enthielten in einem Endvolumen von 40 ml:

30%ige AA / BA-Lsg.	6,7 ml
5 x TBE	8 ml
A.bid.	ad 40 ml
TEMED / APS	40 µl / 400 µl

Die Polymerisation wurde durch Zugabe von TEMED und APS gestartet. Der Probenauftrag erfolgte nach einer Polymerisationszeit von 30 Minuten. Als Laufpuffer diente 1 x TBE-Puffer. Nach dem Färben (3.6.8) und Fotografieren der Gele wurde bei präparativen Gelen die gesuchte Bande über UV-Licht (365 nm) ausgeschnitten und nach 3.6.9 elektroeluiert.

### 3.4.4 Nicht denaturierende Gele zur Auftrennung von nativen Protein-DNA-Komplexen (EMSA-Gele)

**Materialien:**

AA/BA-Lösung:	80% (w/v) : 1% (w/v)
100 x RA-Puffer:	0,67 M Tris-HCl (pH 7,9); 0,33 M Natriumacetat, 0,1 M EDTA
APS:	10% (w/v)
Laufpuffer:	1 x RA
Geltyp:	vertikales Gel (16 cm x 12,5 cm x 1,5 mm)
Lauf:	ca 3 h bei 120-150 V
Glyzerin:	87%
TEMED	

**Durchführung:**

Die Gele enthielten bei einem Endvolumen von 40 ml:

4 ml AA/BA-Lösung
0,4 ml 100 x RA-Puffer
1,1 ml Glyzerin
A. bid. ad 40 ml

Die Polymerisation wurde mit 40 µl TEMED und 400 µl APS gestartet. Der Probenauftrag erfolgte nach einer Polymerisationszeit von mindestens 30 Minuten bei einer angelegten Spannung von 80 V. Die Elektrophorese wurde bei 4°C durchgeführt. Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel bei 100°C getrocknet und anschließend autoradiographiert (3.9.1.) bzw. durch einen Phosphor Imager (3.9.3.) ausgewertet.

### 3.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (nach LAEMMLI, 1970)

#### Material:

AA/BA-Lösung:	30% (w/v) : 0,8% (w/v);
Trenngel:	12,5%ig: 13,2 ml AA/BA-Lsg.; 7 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,6); 0,29 ml 10% (w/v) SDS; 9 ml A.bid.; 15 µl TEMED & 300 µl 10% APS
Sammelgel:	2,5 ml AA/BA-Lsg.; 3 ml Tris-HCl (pH 6,8); 9,1 ml A.bid.; 0,145 ml 10% (w/v) SDS; 10 µl TEMED und 100 µl 10% APS
Gelkammer:	vertikaler Typ
Probenpuffer (5x):	50 mM Tris-HCl (pH 6,8); 10% Glycerin; 1% (w/v) SDS; 50 mM DTT; 0,01% (w/v) Bromphenolblau
Elektrophorese-puffer:	25 mM Tris-HCl (pH 6,8); 190 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS
Butanol:	n-Butanol, H <sub>2</sub> O gesättigt

#### Durchführung:

Glasplatten, Spacer und Probenkamm wurden gewaschen und über Nacht in 1 M NaOH oder 1%ige SDS-Lösung eingelegt. Die Gelkammer und die anderen Materialien wurden mit A. bidest. gespült, Glas und Spacer mit technischem Ethanol abgewaschen. Alle Lösungen wurden vor Gebrauch filtriert. Zunächst wurde das Trenngel in die Gelkammer gegossen und mit n-Butanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das n-Butanol abgegossen, mit A.bid. ausgespült und Sammelgel über das polymerisierte Trenngel gegeben. Die zu analysierenden Proteinfractionen wurden mit fünf-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer auf eine Endkonzentration von 1 x SDS gebracht, 5 Minuten bei 95°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte entweder über Nacht bei 10 mA oder am Tag bei 40 mA, anschließend wurden die Proteine nach 3.5.9 gefärbt.

### 3.5 Arbeiten mit Proteinen

#### 3.5.1 Reinigung von Proteinfractionen über Niederdruck-Chromatographie (Liquid Chromatography, LC), Phosphocellulose

**Material:**

Säulenmaterial:	Phosphocellulose P 11
Phosphocellulose (PC)-Puffer:	20 mM Hepes (pH 7,9); 100 mM KCl; 3 / 7,5 mM DTT; 0,2 mM PMSF; 10% (v/v) Glycerin
Transkriptionspuffer:	20 mM Tris/HCl, pH 7,9; 10% (v/v) Glycerin; 60 mM KCl; 5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 3 mM DTT; 0,2 mM PMSF

**Durchführung:**

Das Trockenmaterial des Kationenaustauschers Phosphocellulose (Whatman P 11) mußte vor Gebrauch in die Na<sup>+</sup>-Form gebracht werden (SCHWARTZ et al., 1974). Dazu wurden 200 g des Materials für eine Stunde in 2,5 l 0,75 M HCl gequollen. Nach Absaugen der Säure wurde die Phosphocellulose solange mit A.bid. gewaschen, bis ein pH von 4 erreicht war. In zweimal 1 l NaOH wurde jeweils eine halbe Stunde inkubiert und erneut mit A.bid bis zum Erreichen eines pH Wertes von 8 gespült. Das entgaste Material wurde in eine Chromatographiesäule gegossen und mit 5 bis 10 Säulenvolumina (SV) PC-Puffer equilibriert. Für die nach SEGALL et al. (1980) beschriebene Trennung der menschlichen Transkriptionsfaktoren IIIA, IIIB und IIIC darf eine Beladung von 10 mg Protein/ml Säulenbett nicht überschritten werden. Da jedoch etwa 50% der Proteine im Durchbruch (PCA) erscheinen, konnte die Beladungskapazität auf 20mg/ml Bettvolumen erhöht werden. Der Auftrag erfolgte mit 0,1-1 SV / Stunde. Während cytoplasmatische Extrakte (S 100) ohne vorherige Dialyse auf die Säule aufgetragen wurden, wurden Kernextrakte zuvor für ca. 6-8 Stunden gegen PC-Puffer dialysiert (3.5.6). Parallel zum Auftrag wurde mit der Fraktionierung des Säulenlaufes begonnen. Die erste Fraktion wurde mit einer Salzstärke von 0,1 M KCl in PC-Puffer bis zum Erreichen der Nulllinie des an eine UV-Einheit (280 nm) angeschlossenen Schreibers eluiert. Anschließend wurden die anderen Fraktionen mit 0,35 M, 0,6 M und 1 M KCl in PC-Puffer eluiert, die einzelnen Fraktionen dem Pro-

teinprofil entsprechend vereinigt und gegen 60 mM KCl Transkriptionspuffer (siehe oben, Kasten Material) dialysiert (3.5.6).

### 3.5.2 Reinigung von Proteinfractionen über Mitteldruck-Chromatographie

Alle Mitteldruckchromatographien wurden an einem Äkta Purifier von Amersham Pharmacia Biotech durchgeführt.

#### 3.5.2.1 Anionenaustauscher

**Material:**

Säulenmaterialien:	EMD-DEAE-Fractogel 650 (S) (EDF) MonoQ (Fertigsäule: 8 bzw. 1 ml)
Säulenpuffer:	Transkriptionspuffer (s. 3.5.1)

**Durchführung:**

Die Säule wurde mit 4-6 Säulenvolumina equilibriert. Es wurden maximal 10 mg Proteinfraction pro ml Säulenbett aufgetragen. Danach wurde je nach Anwendung mit einem Salzgradienten oder mit mehreren Salzsritten eluiert. Die Flussrate war abhängig von der Größe der Säule und vom anfallenden Druck. Gradienten wurden fraktioniert gesammelt. Die vollständige Elution der auf der Säule verbliebenen Proteine erfolgte mit 1 M KCl.

Das Säulenmaterial des starken Anionenaustauschers Mono Q aus extrem kleinen, gleichförmigen Partikeln gewährleistet eine hohe Trennschärfe. Dies bedingt einen großen Widerstand, was zu einem Verstopfen der Säule führen kann. Daher wurden die Proben vor dem Auftrag 20 Minuten bei 9000 Rpm und 4°C zentrifugiert.

#### 3.5.2.2 Kationenaustauscher

**Material:**

Säulenmaterial:	EMD-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -Fractogel 650 (S) (ESF) Mono S (Fertigsäule, 1 ml)
Säulenpuffer:	Transkriptionspuffer (s. 3.5.1)

**Durchführung:**

Die Säule wurde mit 4-6 SV equilibriert. Es wurden max. 10 mg Proteinfraction pro ml Säulenbett aufgetragen. Danach wurde je nach Anwendung mit ei-

nem Salzgradienten oder mit Salzschriften eluiert. Die Flussrate war abhängig von der Größe der Säule und dem anfallenden Druck. Gradienten wurden fraktioniert gesammelt. Die vollständige Elution der auf der Säule verbliebenen Proteine erfolgte mit 1 M KCl.

### 3.5.2.3 Gelfiltration, „Size Exclusion Chromatography“ (SEC)

**Material:**

Säulenmaterial:	Sephacryl S400 HR, S500 HR; Sephadex G25
Säule:	HR 10/30; XK 26/10
Säulenpuffer:	Transkriptionspuffer (s. 3.5.1)
Standardproteingemisch:	bestehend aus Dextranblau, BSA und Cytochrom C

**Durchführung:**

Bei der SEC werden Proteine nach ihrer Größe getrennt, da sich kleinere Proteine vorübergehend in die Gelmatrix einlagern, während größere Proteine oder Proteinkomplexe nicht in die Poren passen und dementsprechend schneller laufen. Ggf. erscheinen sie im Ausschlussvolumen. Kleinere Proteine eluieren ihrer Größe entsprechend, wobei die kleinsten Proteine zum Schluß erscheinen. Bei diesem Verfahren ergibt sich ein Verdünnungseffekt, weshalb konzentrierte Fraktionen aufgetragen werden sollten. Die Eichung der Sepharose-Gelfiltrationssäule erfolgte mit folgenden Markerkomponenten: Dextran Blau, BS und Cytochrom C. Vor dem Auftrag der Proteinfraction wurde die Säule mit mindestens zwei Säulenvolumina Transkriptionspuffer (s. 3.5.1) equilibriert. Der Auftrag (1 ml der zu analysierenden Fraktion) auf die HR 10/30-Säule (Amersham Biosciences) sowie die Elution erfolgte mit einer Flußrate von 0,5 ml/Minute. 7 ml nach dem Auftrag wurden 16 Fraktionen à 1 ml gesammelt. Ab einer Größe von 271 Bp (S400) und 1078 Bp (S500) erscheint die DNA im Ausschlussvolumen. Globuläre Proteine mit einem Molekulargewicht von  $4 \times 10^4 - 10^8$  können mit Sepharose S500 optimal aufgetrennt werden.

Das Sephadex G25-Material wird für das Abtrennen von Salzen aus Proteinfractionen eingesetzt.

### 3.5.2.4 Hydrophobe Interaktions-Chromatographie

**Material:**

Säulenmaterial:	Phenyl Sepharose® 6 FF (high sub) (1 ml Fertigsäule) von Amersham Biosciences
Säulenpuffer:	Transkriptionspuffer (s. 3.5.1)

**Durchführung:**

Bei der HIC werden Proteine nach dem Ausmaß ihrer hydrophoben Eigenschaften aufgetrennt. Einige der hydrophoben Aminosäuren befinden sich auf der Oberfläche der Proteine und können mit hydrophoben Liganden auf der HIC-Gelmatrix interagieren. Die Menge der hydrophoben Aminosäuren variiert zwischen den verschiedenen Proteinen und damit auch ihre Fähigkeit mit der HIC-Gelmatrix zu interagieren. Für die Adsorption der Proteine an die HIC-Gelmatrix werden Hochsalzbedingungen benötigt. Wenn über die Proteine in der Probe nichts Genaues bekannt ist, bietet sich eine Salzkonzentration von 1 M Ammoniumsulfat für den Auftrag auf die HIC an. Anschließend werden die Proteine durch eine schrittweise Elution mit Puffern fallender Salzkonzentration von der Säule abgelöst. Je nach Ausmaß ihrer Hydrophobizität eluieren die Proteine bei höherer oder niedrigerer Salzkonzentration des Elutionspuffers.

Vor dem Auftrag der Proteinfraction wurde die Säule mit mindestens 5 Säulenvolumina 1 M Ammoniumsulfat-haltigem Transkriptionspuffer (s. 3.5.1) equilibriert. Der Auftrag auf die Phenyl Sepharose® 6 FF (high sub) (1 ml Fertigsäule, Amersham Biosciences) erfolgte mit einer Flußrate von 0,5 ml/Minute, was auch der anschließenden Elutionsrate entsprach. Nach Auftrag der Probe wurde die Säule mit weiteren 5 Säulenvolumina (mit der Salzkonzentration des Auftrags) gewaschen. Anschließend wurde schrittweise mit Elutionspuffern fallender Ammoniumsulfat-Konzentration (bis 0 M Ammoniumsulfat) eluiert.

### 3.5.3 Präparation von Transkriptionsfaktoren und der Polymerase III

Die erste, grobe Gewinnung der Transkriptionsfaktoren erfolgt aus zytoplasmatischen (S100) oder Kern-Extrakten aus humanen Zelllinien über Phospho-

cellulose-Chromatographie (SEGALL ET AL., 1980; MATSUI ET AL., 1980). Aufgrund dieses Verfahrens kann man 4 Fraktionen voneinander abtrennen. Die Fraktionen werden nach der Elutionssalzstärke folgendermaßen benannt:

- PCA** als Durchbruch bei 100 mM KCl mit TFIIIA
- PCB** bei 350 mM KCl mit den Transkriptionsfaktoren IIIB , IIIB , Pol III
- PCC** bei 600 mM KCl mit den Transkriptionsfaktoren IIU, IIIC1-like, TBA, IIIC1, PBP, IIIC2 und ebenfalls der Pol III
- PCD** als 1M-Schritt mit TFIIIA

Um die Transkriptionsfaktoren kreuzkontaminationsfrei darzustellen, wird mindestens ein weiterer Chromatographieschritt benötigt.

### **3.5.3.1 Weitere chromatographische Trennung der PCB und PCC**

Die Standardauffrennung der PCB erfolgte über eine 27 ml EMD-DEAE-Fractogel-Säule (EDF). Dabei wurde die PCB gegen 1 x Transkriptionspuffer dialysiert aufgetragen und mit einem 200 ml-Gradienten von 60-450 mM KCl eluiert. 40 Fraktionen à 5 ml wurden aufgefangen. TFIIIB eluierte mit ca. 170 mM, TFIIIB mit 280 mM und Polymerase III mit 350 mM KCl (TEICHMANN & SEIFART, 1995).

Die Standardreinigung der PCC erfolgte über eine 8 ml MonoQ-Säule. Die PCC wurde gegen 1 x Transkriptionspuffer dialysiert aufgetragen und mit einem 200 ml-Gradienten von 60-450 mM KCl eluiert. 50 Fraktionen à 4 ml wurden aufgefangen. TFIIIC0 eluierte bei 160 mM KCl, TFIIIC1 bei 260 mM und TFIIIC2 bei 360 mM KCl (YOSHINAGA ET AL., 1987; OETTEL ET AL., 1997; OETTEL, 1998). Die Fraktionen wurden entweder weiter gereinigt oder gegen 1 x Transkriptionspuffer dialysiert (3.5.6).

### **3.5.3.2 Präparation von TFIIIB $\beta$ und Polymerase III**

Die TFIIIB -Fraktionen aus dem EDF-Lauf wurden vereinigt und mit Transkriptionspuffer ohne KCl verdünnt, bis die KCl-Konzentration bei etwa 150-200 mM KCl lag. Dann wurde die Fraktion auf eine 7 ml EMD Fractogel SO<sub>3</sub><sup>-</sup> -Säule aufgetragen und mit 250 mM, 400 mM und 1000 mM KCl eluiert. Die



TFIIIB -Aktivität eluierte in der 400 mM Fraktion. Sie war frei von von Polymerase III sowie von TFIIIC1 und TFIIIC2. Danach erfolgte eine Dialyse gegen 1 x Transkriptionspuffer (s. 3.5.1).

Die Polymerase-Fraktionen aus dem EDF-Lauf wurden vereinigt und mit Transkriptionspuffer ohne KCl verdünnt, bis die KCl-Konzentration bei etwa 300 mM KCl lag. Dann wurde diese Fraktion auf eine 7 ml ml Fractogel SO<sub>3</sub><sup>-</sup> Säule aufgetragen und mit 400 mM, 650 mM und 1000 mM KCl eluiert. Die Pol III-Aktivität eluierte in der 650 mM-Fraktion. Sie war weitgehend frei von TFIIIB sowie von TFIIIC1 und TFIIIC2. Die Fraktion wurde mit Glycerin auf eine Endkonzentration von ca. 50% (v/v) verdünnt und portioniert à 50 µl bei 80°C eingefroren.

### **3.5.3.3 Präparation der Pol III über single-strand-DNA-Cellulose**

Eine andere Gewinnung der Polymerase III erfolgte über single-strand-DNA-Cellulose. Hierbei wurden wieder die Polymerase-Fraktionen aus einer EDF-Chromatographie vereinigt und mit Transkriptionspuffer (s 3.5.1) ohne KCl verdünnt, bis eine Konzentration von ca. 130 mM KCl vorlag. Diese Fraktion wurde dann auf eine 2 ml ssDNA-Cellulose-Säule mit einer Geschwindigkeit von 0,25 ml/min aufgetragen. Die Polymerase III eluierte bei 400 mM KCl. Diese Fraktion war frei von jeglicher Kreuzkontamination. Die Fraktion wurde mit Glycerin auf eine Endkonzentration von ca. 50% (v/v) verdünnt und portioniert à 50 µl bei -80°C eingefroren.

### **3.5.3.4 Weitere Reinigung von TFIIIC1/TFIIIC0 über MonoS-Chromatographie**

Eine weitere Reinigung des TFIIIC1 lässt sich durch eine Chromatographie über eine MonoS-Säule erreichen. Das (wie in 3.5.3.1 beschrieben) gewonnene und gegen 1 x Transkriptionspuffer (s. 3.5.1) dialysierte MQ-TFIIIC1 wurde auf die 1 ml MonoS-Säule (Fertigsäule) aufgetragen und mit einem linearen Gradienten von 200 bis 600 mM KCl eluiert. Die TFIIIC1-Transkriptionsaktivität eluierte mit einem ersten deutlichen Maximum in einem Bereich von ca. 320-350 mM KCl und mit einem zweiten deutlichen Maximum in einem Bereich von ca. 430-480 mM KCl.

Diese Reinigungsstrategie führt auch beim Auftrag einer TFIIIC0-Fraktion zu einer Aufspaltung der TFIIIC1-like-Transkriptionsaktivität in zwei deutlich getrennte Maxima mit Elutionsbereichen vergleichbarer Salzstärken wie bei TFIIIC1.

### **3.5.3.5 Präparation einer über Phosphocellulose rechromatographierten TFIIIC2-Fraktion**

Mittels Rechromatographie der TFIIIC2-Fraktion wird die Polymerase abgetrennt, da diese bei einer niedrigeren KCl-Konzentration eluiert als TFIIIC2. Zur Präparation dieser Fraktion wurde die mittels 3.5.3.1 gewonnene und gegen 1 x Transkriptionspuffer (s. 3.5.1) dialysierte PCC standardmäßig auf eine 8 ml MonoQ-Säule aufgetragen und mit einem 200 ml-Gradienten von 60-450 mM KCl eluiert. Die Fraktionen im Bereich von ca. 360 mM KCl wurden wiederum auf eine Phosphocellulose-Säule aufgetragen. Die rechromatographierte TFIIIC2-Fraktion eluierte in einem Bereich von ca. 450-600 mM KCl und war jetzt Polymerase-III-frei.

### **3.5.4 Fällung von Proteinen mit Ammoniumsulfat**

#### ***Materialien:***

Ammoniumsulfat Dialyseschlauch
-----------------------------------

#### ***Durchführung:***

Die Proteinfractionen wurden in Dialyseschläuchen in Transkriptionspuffer dialysiert (s. 3.5.6), der die entsprechenden Ammoniumsulfatkonzentrationen enthielt. Dann wurde die Lösung 60 Minuten in einer Sorvall Zentrifuge bei 9000 Rpm (HB-4 Rotor; 4°C) zentrifugiert. Das Sediment wurde in einem geringen Volumen Transkriptionspuffer aufgenommen und ebenso wie der Überstand gegen Transkriptionspuffer dialysiert.

### **3.5.5 Proteinkonzentrationsbestimmung durch kolorimetrische Proteinquantifizierung (BRADFORD, 1976)**

Zur kolorimetrischen Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde das "Protein dye reagent concentrate" der Firma Biorad nach Vorschrift ange-

wandt und die Extinktion bei 595 nm im Vergleich zu BSA-Standardwerten gemessen.

### 3.5.6 Dialyse von Proteinlösungen

**Materialien:**

Dialyseschläuche	
Mikrokollodiumhülsen	
BSA:	20 mg/ml in Transkriptionspuffer (s. 3.5.1)

**Durchführung:**

Die Dialyse von Zellextrakten oder gereinigten Proteinfractionen erfolgte bei kleineren Mengen (100-500 µl) in Mikro-Kollodiumhülsen der Firma Sartorius, bei größeren Mengen in Dialyseschläuchen. Die Schläuche wurden zur Entfernung enzymatischer Verunreinigungen und zum Quellen vor Gebrauch kurz aufgekocht. Der Puffer wurde vor Verwendung mittels einer Wasserstrahlpumpe entgast. Die Proben wurden bei 4°C so lange gegen den gewünschten Puffer dialysiert, bis die Leitfähigkeit der Proben mit der des umgebenden Puffers übereinstimmte. Sehr empfindliche Proteinfractionen mit niedriger Proteinkonzentration (z.B. TFIIC1 (MQ)) wurden vor der Dialyse mit 0,2 mg/ml BSA versetzt.

### 3.5.7 Immunodetektion von Proteinen (Western-Blot)

Bei diesem Verfahren werden Proteine zunächst gelelektrophoretisch nach Größe getrennt (s. 3.4.5.). Anschließend werden die Proteine aus der Gelmatrix auf PVDF-Trägermembran (Immobilon-P Transfermembran) übertragen und dort immobilisiert. In einem weiteren Schritt können bestimmte Proteine durch Reaktion mit Antikörpern detektiert werden.

### 3.5.7.1 Transfer elektrophoretisch getrennter Proteine auf PVDF-Transfermembran

#### **Materialien:**

Transfermembran:	Immobilon -P-Transfermembran
Kathodenlösung:	25 mM Tris; 40 mM 6- Aminohexan; 20% (v/v) Methanol
Anodenlösung I:	30 mM Tris; 20% (v/v) Methanol
Anodenlösung II:	300 mM Tris; 20% (v/v) Methanol
Filterpapier:	Whatman 17CHR
Ponceau- Färber:	0,2 % (w/v) Ponceau S in 3% TCA
PBS:	150 mM NaCl; 16 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
PBS/Tween-Puffer:	0,05% (v/v) Tween 20 in PBS

#### **Durchführung:**

Die nach 3.4.5. über SDS-Page aufgetrennten Proteine wurden in einem "semidry-Blotting" Verfahren (KYHSE-ANDERSEN, 1984) auf eine Transfermembran übertragen. Die Transfermembran muss vor Gebrauch 15 Sekunden in 100% Methanol und anschließend 2 Minuten in A.bid. geschwenkt werden. Anschließend wurde sie 15 Minuten in Anodenlösung I equilibriert. Dann wurden auf die Graphitkathode der Blotapparatur zunächst zwei auf Gelgröße zu rechtgeschnittene, in Kathodenlösung getränkte Filterpapiere und anschließend das für ca. 15 Minuten in Kathodenlösung getränkte Gel blasenfrei aufgelegt. Darauf wurden in jeweils identischen Größen die Transfermembran und zwei Filterpapiere, welche vorher in Anodenlösung I getränkt worden sind, gelegt. Zum Abschluss wurden 2 weitere Whatman-Filterpapiere mit Anodenlösung II benetzt, blasenfrei aufgelegt und durch die Graphit-Anode komplettiert. Der Proteintransfer erfolgte ca. 2 Stunden bei 0,8 - 1 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche. Anschließend wurde die Bloteffizienz durch eine reversible Anfärbung der Proteine mit Ponceau-Lösung überprüft. Die Bahnen sowie die Größenstandards wurden auf der Membran mit einem Kugelschreiber markiert. Anschließend wurde die vollständige Entfärbung der rotgefärbten Proteinbanden durch Waschen der Membran mit PBS/Tween-Puffer erreicht.

Sollte die optimale Konzentration einer der Antikörper bestimmt werden, wurde ein „Streifenblot“ erstellt. Ein präparatives SDS-Gel mit nur einer präparativen Tasche und einer Testfraktion wurde wie üblich geblottet. Nach der Ponceaufärbung wurde die Membran in vertikale Streifen von 3 mm Breite

geschnitten. Die Streifen wurden separat in Streifenkammern gelegt und wie üblich (3.5.7.2.) geblockt und anschließend mit unterschiedlichen Verdünnungen des zu testenden Antikörpers inkubiert.

### 3.5.7.2 Nachweis spezifischer Proteine durch Antigen-Antikörper-Wechselwirkung

#### **Materialien:**

PBS:	150 mM NaCl; 16 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
PBS/ Tween:	0,05% (v/v) Tween 20 in PBS
Blockierungslösung:	10 % Magermilchpulver in PBS/ Tween 20
“Zweit“- Antikörper:	Anti-Hase-Ig, markiert mit <sup>125</sup> I (100 µCi/ ml) in Blockierungslsg. gelöst (0,6-1,2 µCi/ml); oder: Anti-Hase-Ig, gekoppelt mit Meerrettich Peroxidase (1:2000) in Blockierungslsg.
“Erst“- Antikörper:	Je nach Bedarf, in Blockierungslösung gelöst
ECL	Western blotting detection reagents

#### **Durchführung:**

Zur Absättigung der auf der Transfermembran vorhandenen Proteinbindungsstellen wurden die geblotteten Membranen 60 Minuten in Blockierungslösung inkubiert. Danach wurde die Membran mit einer entsprechenden Verdünnung des ersten Antikörpers bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach Entfernung der Antikörperlösung wurde die Membran 3 x (je 10 Minuten) mit PBS/Tween-Puffer gewaschen und dann bei RT zwei Stunden mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen in jeweils PBS/Tween und PBS-Puffer (je 10 Minuten) wurde die Membran im Falle des Iod-markierten Antikörpers 15 Sekunden in 100% Methanol geschwenkt und auf einem Whatman Papier getrocknet. Dann erfolgte der Nachweis der spezifischen Antikörper-Antigen-Wechselwirkung durch Autoradiographie mit Verstärkerfolie (3.9.1) bzw. durch einen Phosphor Imager (3.9.3).

Wurde der Peroxidase-gekoppelte Zweit-Antikörper verwendet, wurde die Membran nach dem letzten PBS-Waschschrift in 20 ml nach Vorschrift des Herstellers gemischter ECL-Lösung überführt, 1 bis 2 Minuten inkubiert, mit einer Folie überzogen und ohne Verstärkerfolie autoradiographiert. Die Expositionsdauer betrug zwischen 10 Sekunden und 30 Minuten.

### 3.5.8 *In vitro*-Biotinylierung von Proteinen mit dem EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit von Pierce

Die *in vitro*-Biotinylierung von Protein-Fractionen erfolgte mit Hilfe des EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit der Firma Pierce entsprechend der Anleitung des Herstellers.

### 3.5.9 Nachweis biotinylierter Proteine mit dem ImmunoPure® Ultra-Sensitive ABC Peroxidase Staining Kit von Pierce

Der Nachweis von biotinylierten Proteinen erfolgte mit Hilfe des ImmunoPure® Ultra-Sensitive ABC Peroxidase Staining Kit der Firma Pierce entsprechend der Anleitung des Herstellers.

### 3.5.10 Konzentrieren von Proteinlösungen für SDS-Gel-Elektrophorese mit StrataClean™ Resin

Diese Methode wurde zur Abtrennung von Proteinen von DNA entwickelt, kann aber auch zur Konzentrierung von Proteinfractionen benutzt werden. Es weist bei neutralem pH eine extrem hohe Affinität zu Proteinen und eine extrem geringe Affinität zu Nukleinsäuren auf. Im vorliegenden Fall wurden auf diese Weise Fractionen aus Gelfiltrationen konzentriert, auf die Transkriptionskomplexe aufgetragen wurden (3.7.1), um Western-Blot Analysen (3.5.7) durchführen zu können. 10 µl (50% w/v) StrataClean Resin binden 5µg BSA quantitativ (TIEFENBACH, 1998).

#### **Materialien:**

StrataClean Resin Silica Partikel:	(ca. 50 w/v)
------------------------------------	--------------

#### **Durchführung:**

Die Fractionen wurden mit 10-25 µl StrataClean Resin versetzt und bei RT für eine Stunde um die Querachse rotierend inkubiert. Danach wurde der Überstand bis auf ein geringes Restvolumen abgenommen. Das Präzipitat wurde mit 1 x SDS-Probenpuffer versetzt und auf ein SDS-Gel aufgetragen (3.4.5). Durch den Stromfluss wurden die Proteine vom Resin elektroeluiert und liefen ins Gel ein.

### 3.5.11 Anfärben von Proteinen mit Coomassie Brilliant Blue

**Materialien:**

Färbelösung:	0,15% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250; 50% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure
Entfärber:	30% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure

**Durchführung:**

SDS-Gele wurden durch Schütteln in Färbelösung 15 bis 60 Minuten gefärbt und anschließend im Entfärber entfärbt. Das Gel wurde zur Dokumentation photographiert.

### 3.5.12 Silberfärbung von Proteingelen nach BLUM ET AL., 1987

Diese Färbung wurde i.d.R. nach einer Coomassiefärbung durchgeführt. Die Fixierungslösung entfärbt die Coomassie-gefärbten Proteine vollständig.

**Materialien:**

Fixierungslösung:	50% (v/v) Methanol, 12,5% (v/v) Essigsäure
Lösung 1:	50% (v/v) Ethanol
Lösung 2:	30% (v/v) Ethanol
Lösung 3:	0,8 mM Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Silberfärbelösung:	2 g/l AgNO <sub>3</sub> ; 0,026% Formaldehyd
Entwickler:	60 g/l Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; 0,0185% Formaldehyd, 16 µM Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
A. bid.	

**Durchführung:**

Das (Coomassie-gefärbte) Gel wurde mindestens über Nacht, besser 24 Stunden in Fixierungslösung inkubiert, um die Proteine im Gel zu fixieren. Danach wurde 2 x in Lösung 1 und 1 x in Lösung 2 für je 20 Minuten gewaschen. Das Gel wurde dann für genau 60 sec in Lösung 3 inkubiert und sofort danach in A. bid. 3 x 20 Sekunden gewaschen. Nach der Inkubation für 1 Stunde in der Silberfärbelösung wurde die Entwicklerlösung zum Gel gegeben und solange inkubiert, bis eine optimale Färbung erreicht war. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 2 x in A. bid. für 20 Sekunden gewaschen und anschließend das Gel wieder in die Fixierungslösung gegeben. Das Gel wurde zur Dokumentation photographiert. Dies musste rasch passieren, da nach 2 bis 3 Stunden Flecken auf dem Gel auftraten.

## 3.6 Arbeiten mit Nukleinsäuren

### 3.6.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* für analytische Zwecke („Mini-Screen“)

**Material:**

LB-Medium:	s. 3.2
Ampicillin:	100 mg / ml
NaOH / SDS-Lsg.:	10 ml 0,2 N NaOH; 1 ml 10% SDS
Kaliumacetat:	3 M Kaliumacetat (pH 4,8)
RNAse-Lsg.:	0,1 mg / ml RNAseA in 0,5 mM Tris-HCl (pH 8,0)
Ethanol:	100% (v/v)

**Durchführung:**

Je 1 ml LB-Medium (mit 100 µg Ampicillin pro ml) wurden mit je einem über Antibiotikumresistenz vorselektionierten Bakterienklon unter Verwendung von sterilen Zahnstochern beimpft. Die Eppendorfgefäße wurden mit durchlöcherchten Deckeln verschlossen und bei 37°C und 250 Rpm über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation in der Tischzentrifuge bei 13000 Rpm wurden die Bakterien in je 100 µl A. bid. Resuspendiert und für 10 Minuten ins Eisbad gestellt. Anschließend wurde je 200 µl der NaOH/SDS-Lösung zupipettiert und die Proben für weitere 10 Minuten im Eisbad inkubiert. Nach Neutralisation durch Zugabe von je 150 µl eiskalter Natriumacetatlösung wurden die Ansätze für weitere 20 Minuten ins Eisbad gestellt. Nach fünfminütiger Zentrifugation wurde der Überstand abgehoben, die darin befindliche Plasmid-DNA mit 2 Volumenteilen Ethanol (100%) gefällt und 15 Minuten abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde schließlich in 40 µl A. bid. und 10 µl der RNAse-Lösung resuspendiert und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Je 10 µl dieser Plasmid-DNA Präparation wurden dann zur Restriktionsanalyse eingesetzt.



### 3.6.2 Präparative Plasmid-Isolierung mittels Qiagen Tip-2500-Säulen

#### **Material:**

Puffer P1:	50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA; 100 mg / ml RNase A
Puffer P2:	200 mM NaOH; 1% SDS
Puffer P3:	2,55 M Kaliumacetat (pH 4,8)
Puffer QBT:	750 mM NaCl; 50 mM MOPS; 15% (v/v) Ethanol; 0,15% TritonX-100; (pH 7,0)
Puffer QC:	1,0 M NaCl; 50 mM MOPS; 15% (v/v) Ethanol; (pH 7,0)
Puffer QF:	1,25 M NaCl; 50 mM MOPS; 15% (v/v) Ethanol; (pH 8,5)
Ethanol:	70% (v/v) Isopropanol
RNase A:	10 mg / ml

#### **Durchführung:**

500 ml einer in TB-Medium angezogenen Bakterienkultur (s. 3.1) wurden nach 18 bis 20 Stunden Inkubation bei 37°C (200 Rpm) 30 Minuten bei 3000 Rpm und 4°C abzentrifugiert (Heraeus 5520). Das bakterielle Sediment wurde in 50 ml gekühltem Puffer P1 vorsichtig resuspendiert und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden 50 ml Puffer P2 hinzugegeben, vorsichtig durchmischt und 5 Minuten bei RT inkubiert (Proteindenaturierung). Nach Zugabe von 50 ml Puffer P3 wurde die Lösung vorsichtig einige Sekunden geschwenkt, 30 Minuten im Eisbad inkubiert und anschließend 45 Minuten bei 4°C und 28000 Rpm (Beckmann SW-28) zentrifugiert. Der Überstand wurde dann auf eine zuvor mit 50 ml Puffer QBT equilibrierte Qiagen Tip-2500 Säule aufgetragen. Nach mehrmaligem Waschen der Säule mit je 200 ml Puffer QC (entspricht dem doppelten Überstandsvolumen) wurde die DNA mit 50 ml Puffer QF eluiert, durch Zugabe von 35 ml Isopropanol (0,7 VT) gefällt und anschließend durch dreißigminütige Zentrifugation bei 10000 Rpm (Sorvall HB4) und 4°C sedimentiert. Das DNA-Sediment wurde mit 30 ml Ethanol (70%) gewaschen, 15 Minuten bei 10000 Rpm zentrifugiert, getrocknet und in 1 ml A. bid. resuspendiert. Die Reinheit der Präparation wurde auf einem 1%igen Agarose-Gel (3.4.1) überprüft.

### 3.6.3 Phenolisierung von Nukleinsäuren

**Material:**

PCI:	50% (v/v) Phenol; 50% (v/v) Chloroform; 1% Isoamylalkohol
Natriumacetat-Lsg.:	0,6 M Natriumacetat (pH 4,8)
Ethanol:	100% (v/v)

**Durchführung:**

Die Phenolisierung von Nukleinsäuren dient der Abtrennung von Proteinen. Hierzu wurde zu der DNA- bzw. RNA-haltigen Lösung 1 VT Natriumacetat und 0,5 bis 1 VT PCI gegeben und ca. 1 Minute kräftig gemischt. Anschließend wurden die Proben in einer Tischzentrifuge bei 13000 Rpm 5 Minuten zentrifugiert. Die wässrige, obere Phase enthielt die DNA bzw. RNA, die anschließend durch Zugabe von ca. 3 VT Ethanol (100%) durch 15 minütige Zentrifugation bei 13000 rpm präzipitiert wurde.

### 3.6.4 Fällung von Nukleinsäuren unter Standardbedingungen

**Material:**

Ethanol-Natriumacetat-Lsg.:	100% Ethanol; 3 M Natriumacetat (pH 5,5)
Ethanol:	80% (v/v)

**Durchführung:**

Nukleinsäurehaltige Lösungen wurden mit 3 VT eines Ethanol/Natriumacetat-Gemisches (im Verhältnis 30:1) versetzt, durch 10 - 15 -maliges Kippen vorsichtig durchmischt und anschließend 15 Minuten in einer Tischzentrifuge bei 13000 Rpm zentrifugiert. Das Präzipitat wurde dann zur Entfernung von Salzresten kurz mit eiskaltem Ethanol (80%) gewaschen, erneut zentrifugiert, getrocknet und in A. bid. oder entsprechendem Puffer gelöst.

### 3.6.5 Bestimmung der Konzentration von Desoxyribonukleinsäuren

Bei größeren DNA-Mengen erfolgte die Konzentrationsbestimmung durch Extinktionsmessung bei 260 nm in 1 cm Quarzküvetten mit einem Beckmann-Spektralphotometer. Nach CHARGAFF (1955) wurde die DNA-Konzentration folgendermaßen ermittelt:

OD<sub>260</sub> = 1,0 entspricht 50 µg DNA/ml bei doppelsträngiger DNA  
bzw. 33 µg DNA/ml bei einzelsträngiger DNA

Zur Bestimmung der Konzentration kleinerer Mengen DNA wurde der visuelle Vergleich mit Proben bekannter Konzentration nach Agarose-Gelelektrophorese (3.4.1) und anschließender Ethidiumbromidfärbung (3.6.8) herangezogen.

### 3.6.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die unter 3.6.2 präparierte Plasmid-DNA diente als Matrize, aus der in der PCR spezifische Sequenzen amplifiziert wurden. Diese Methode wurde zur Amplifizierung von Fragmenten für die *in vitro* Transkription (3.7.1) eingesetzt.

#### Material:

Plasmid-DNA:	10 ng
10 x Reaktionspuffer	
Q-Solution	
Desoxynukleotidgemisch :	je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Taq-Polymerase:	5 U/µl
spezifische Oligonukleotide:	5'-spezifischer Primer (40 pmol/ml) 3'-spezifischer Primer (40 pmol/ml)

#### Durchführung:

Die Amplifizierung eines DNA-Fragmentes an Plasmid-DNA zwischen zwei spezifischen Primern erfolgte typischerweise nach folgendem Reaktionsschema:

Plasmid-DNA:	10 ng
10 x Reaktionspuffer:	5 µl
Q-Solution:	10 µl
Desoxynukleotide (dNTPs):	1,5 µl (300 mM / dNTP)
5'-spezifischer Primer:	40 pmol (bzw. 10 <sup>7</sup> cpm)
3'-spezifischer Primer:	40 pmol (bzw. 10 <sup>7</sup> cpm)
Taq-Polymerase:	0,5 µl (2,5U)
A. bid.:	ad 50 µl

Die Amplifizierung des interessierenden DNA-Fragmentes erfolgte in einem Stratagene Thermocycler mit beheizbarem Deckel. Insgesamt wurden 25 Zyklen durchgeführt, wobei jeder Zyklus aus 3 Segmenten wie folgt bestand:

94°C	1 Minute	(Denaturierung)
55°C	1 Minute	(Hybridisierung)
72°C	1,5 Minuten	(Elongation)

Zu Beginn des ersten Zyklus wurde ein dreiminütiger Denaturierungsschritt bei 96°C vorgeschaltet. Nach Beendigung des letzten Zyklus folgte eine zehnminütige Elongation bei 72°C. Die PCR-Ansätze wurden auf ein präparatives Polyacrylamid-Gel (3.4.3) aufgetragen. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt (3.6.8) und die gewünschte DNA-Bande ausgeschnitten. Die DNA wurde gemäß 3.6.9 elektroeluiert, unter Standardbedingungen gefällt (3.6.4), in 1 x TE-Puffer oder Aqua bidest. resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

### 3.6.7 Spaltung der DNA mit Restriktionsenzymen

Restriktionsendonukleasen dienen dem spezifischen Schutz von Bakterien gegen Einbau und Expression fremder DNA, indem sie spezifische Nukleotidsequenzen erkennen und die fremde DNA durch endolytische Spaltung inaktivieren. Bakterieneigene DNA ist hierbei durch Modifikation (z.B. Methylierung der Erkennungssequenz) vor der Spaltung geschützt.

**Material:**

Restriktionsendonukleasen 10 x Restriktionspuffer des jeweiligen Herstellers PCI: s. 3.3.3
--

**Durchführung:**

Ein typischer Restriktionsansatz enthielt neben der in A.bid. gelösten DNA 1/10 Volumenteil des 10 x Restriktionspuffers bezogen auf das Reaktionsvolumen und entsprechende Mengen an Restriktionsenzym (max. 10% des Reaktionsendvolumens = 5% Glycerin-Endkonzentration). Die Berechnung der benötigten Enzymeinheiten erfolgte in Bezug auf die vom Hersteller angegebene Unit-Definition (1 Unit schneidet 1 µg Lambda-DNA unter optimalen Bedingungen in einer Stunde). Die Inkubation erfolgte für ein bis mehrere Stunden bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur und wurde anschließend durch Zugabe von 1 VT PCI gestoppt (s. 3.6.3).

### 3.6.8 Färbung von Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid

Im Gel fixierte DNA-Fragmente lassen sich durch Ethidiumbromid, einer polyzyklischen, planaren und chromophoren Verbindung, die sich zwischen benachbarte Basenpaare der DNA einlagert, anfärben. Im UV-Licht (260-

365 nm) fluoresziert das interkalierende Agens bei einer Wellenlänge von 590 nm im rot-orangen Bereich des sichtbaren Spektrums.

**Material:**

Ethidiumbromid-Lösung:	1 mg/ml
------------------------	---------

**Durchführung:**

Zum Färben gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmente wurden die Gele für 15-30 Minuten unter leichtem Schütteln in Ethidiumbromidlösung gefärbt und danach 5 bis 10 Minuten in A. bid. entfärbt. Die angefärbten Nucleinsäuren wurden auf einem UV-Leuchtschirm bei 260 oder 365 nm sichtbar gemacht.

### 3.6.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Polyacrylamid-Gelen mittels Elektroelution

**Material:**

5 x TBE-Puffer:	450 mM Tris; 450 mM Borsäure; 1,5 mM EDTA
Dialyseschlauch:	in A. bid. vorgequollen und bei 100°C erhitzt

**Durchführung:**

Nach gelelektrophoretischer Trennung der DNA auf einem präparativen Polyacrylamid-Gel (3.4.3) wurde die DNA gefärbt (3.6.8) und das entsprechende Fragment unter langwelligem UV-Licht (365 nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten. Das Gelstück wurde nachfolgend in einen mit 1 x TBE-Puffer gefüllten Dialyseschlauch überführt und dieser an beiden Enden mit Dialyseklammern verschlossen. Die Elektroelution wurde für 30 Minuten bei 150 mA in einer Horizontal-Elektrophoresekammer in 1 x TBE durchgeführt. Das Auswandern der DNA aus dem Gelstück wurde anschließend mit Hilfe eines UV-Schirms (365 nm) kontrolliert. Nach vollständiger Elution wurde die Polarität des Stromflusses für 30 Sekunden geändert, um die an der Dialysemembran adsorbierte DNA zu lösen. Der DNA-haltige Puffer wurde abgesaugt und die DNA unter Standardbedingungen (3.6.4) gefällt. Nach Resuspension in A. bid. oder entsprechendem Puffer und Konzentrationsbestimmung gemäß 3.6.5 wurde die DNA bei -20°C aufbewahrt.

### 3.6.10 Dephosphorylierung linearisierter DNA

Zur Subklonierung von DNA-Fragmenten ist es notwendig, einen Ringschluß des zur Ligation eingesetzten linearisierten Vektors weitestgehend zu verhindern. Dies geschieht durch Abspaltung der 5'-Phosphatgruppen. Ebenso müssen für die radioaktive Markierung von 5'-Enden zunächst die 5'-Phosphatgruppen der zu markierenden DNA-Fragmente abgespalten werden. Katalysiert wird diese Reaktion durch das Enzym alkalische Phosphatase („CIP“: calf intestine phosphatase).

**Material:**

CIP:	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm; 1 U/ $\mu$ l
10 x CIP-Puffer:	500 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA
CIP-Stopp-Lsg.:	200 mM EGTA
PCI:	Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (50:50:1)
Ethanol:	100% (v/v)

**Durchführung:**

Ein typischer Dephosphorylierungsansatz enthielt (Endvolumen: 50  $\mu$ l):

Fragment bzw. linearisiertes Plasmid:	0,5-5 $\mu$ g
10 x CIP-Puffer:	5 $\mu$ l
CIP:	0,5-1 U / $\mu$ g DNA
A. bid.:	ad 50 $\mu$ l

Nach 50min. Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion mit 2,5  $\mu$ l Stopplösung beendet. Bei nachfolgender 5'-Endmarkierung wurde der Ansatz zusätzlich 45 Min. bei 65°C inkubiert. Durch zweimaliges Phenolisieren (3.6.3) wurde das Enzym entfernt. Die DNA wurde unter Standardbedingungen gefällt (3.6.4).

### 3.6.11 Auffüllen 5'- überhängender Enden

**Material:**

10 x Klenow-Puffer:	250 mM Tris-HCl (pH 7,5); 25 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM DTT
Klenow-Enzym:	5 U / $\mu$ l
Desoxyribonukleotide:	je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP gelöst in 1 x Klenow-Puffer

**Durchführung:**

Ein typischer Reaktionsansatz enthielt in einem Endvolumen von 50  $\mu$ l:

Fragment-DNA :	100-750 ng
10 x Klenow-Puffer:	5 µl
dNTP:	je 1 µl
Klenow-Enzym:	2 U
A. bid.:	ad 50 µl

Der Ansatz wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, die DNA wie unter 3.6.10 beschrieben aufgearbeitet und zur Ligation (3.6.12) eingesetzt.

### 3.6.12 Ligation von DNA

#### **Material:**

10 x Ligasepuffer:	500 mM Tris-HCl (pH 7,4); 100 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM ATP; 10 mM Spermidin
T4 DNA-Ligase:	1 U/ml
Vektor-DNA	

#### **Durchführung:**

Ein typischer Ligationsansatz enthielt:

dephosphorylierte Vektor-DNA:	50 ng
Fragment-DNA :	500 ng
10 x Ligasepuffer :	3 µl
T4 DNA-Ligase :	2 U
A. bid.:	ad 30 µl
Der Reaktionsansatz wurde für 12-15 Stunden bei 15°C inkubiert.	

Nachfolgend wurden mit dem Ansatz entweder kompetente *E. coli* Zellen transformiert (3.6.13), oder der Ansatz wurde bei -20°C aufbewahrt.

### 3.6.13 Transformation

Die Aufnahme freier DNA durch Bakterienzellen ist normalerweise kein effizienter Vorgang. Aus diesem Grunde müssen die Zellen zuvor durch eine Behandlung mit CaCl<sub>2</sub> „kompetent“, d.h. aufnahmebereit gemacht werden (DAGERT & EHRLICH, 1979).

#### **Material:**

CaCl <sub>2</sub> -Puffer:	10 mM Pipes (pH 7,0); 60 mM CaCl <sub>2</sub> ; 15% (v/v) Glycerin
LB-Medium:	s. 3.1
<i>E. coli</i> :	XL1-Blue; BL21

#### **Durchführung:**

Zur Herstellung der „Ca<sup>2+</sup>-Zellen“ wurden 50 ml LB Flüssigmedium mit 2 ml einer Übernachtskultur eines *E. coli* Stammes beimpft und im Schüttelinkubator

bei 250 Rpm und 37°C bis zu einer optischen Dichte (OD<sub>590</sub>) von 0,35 angezchtet. Die für 10 Minuten im Eisbad abgekühlte Bakteriensuspension wurde 5 Minuten bei 7000 Rpm (8000 x g, Sorvall SS-34, 4°C) zentrifugiert, das Sediment gewaschen und anschließend vorsichtig in 10 ml eiskaltem CaCl<sub>2</sub>-Puffer resuspendiert. Unter gelegentlichem Schwenken wurden die Zellen für 30 Minuten im Eisbad inkubiert, erneut für 5 Minuten abzentrifugiert und schließlich in 2 ml eiskaltem CaCl<sub>2</sub>-Puffer aufgenommen. Nach ca. 2 Stunden im Eisbad wurden die Zellen entweder direkt zur Transformation eingesetzt oder portioniert bei -80°C eingefroren.

Im Transformationsansatz wurden jeweils 200 µl der „kompetenten“ Zellen mit 50 -100 ng Plasmid-DNA des Ligationsansatzes gemischt. Nach 30 Minuten Inkubation im Eisbad wurde der Ansatz für 45 Sekunden auf 42°C erwärmt und anschließend sofort für 3 Minuten im Eisbad inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl vorgewärmten (37°C) LB-Medium wurden die Zellen für 60 Minuten bei 37°C inkubiert.

### 3.6.14 Selektion positiver Transformanten

Da die verwendeten Plasmide ein Ampicillin-Resistenzgen tragen, läßt sich eine Selektion positiver Transformanten anhand ihrer Ampicillinresistenz durchführen.

**Material:**

LB-Ampicillin Agarplatten:	LB-Kulturmedium (s. 3.1); 1,5% (w/v)
Agar:	50 mg/l
Ampicillin:	100mg/l

**Durchführung:**

Jeweils 50-250 µl Aliquots der Transformationsansätze (3.6.13) wurden auf LB-Ampicillin Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden für 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Alle eindeutig positiven Transformanten wurden zur weiteren Charakterisierung im „Mini-Screen“ (3.6.1) eingesetzt.



### 3.6.15 Abtrennung der freien Nukleotide von DNA-Fragmenten

Die Abtrennung freier Nukleotide von DNA-Fragmenten, z.B. nach  $\gamma$ -Markierung, erfolgte über QIAquick™ Nucleotide Removal Kit der Firma Qiagen entsprechend der Anleitung des Herstellers.

### 3.6.16 Radioaktive 5'-Endmarkierung von ds- oder ss-DNA

#### **Material:**

T4 Polynukleotidkinase:	10 U/ $\mu$ l
10 x Kinase-Puffer:	500 mM Tris-HCl (pH 7,6); 100 mM MgCl <sub>2</sub> ; 50 mM DTT; 1 mM Spermidin; 1 mM EDTA
<sup>32</sup> P-dATP:	7000Ci / mmol

#### **Durchführung:**

An einzelsträngigen DNA-Primern wurde mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase die gammaständige Phosphatgruppe von <sup>32</sup>P-dATP auf die 5'OH-Gruppe übertragen.

Ein typischer Markierungsansatz enthielt in einem Endvolumen von 50  $\mu$ l:

DNA:	80 pmol
10 x Kinase-Puffer:	5 $\mu$ l
<sup>32</sup> P-dATP:	100-150 $\mu$ Ci
T4-Polynukleotidkinase:	10 U

Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch 10minütiges Erhitzen auf 75°C gestoppt. Nichtinkorporierte Nukleotide wurden gemäß (3.6.15) abgetrennt.

## 3.7 *In vitro*-Transkription

### 3.7.1 *In vitro*-Transkription

Die *in vitro*-Transkription an klonierten Genen im zellfreien System stellt das zentrale Testsystem zum funktionellen Nachweis und zur Charakterisierung von Transkriptionskomponenten dar. Zudem ermöglicht sie die Analyse der Abfolge einzelner Abschnitte des Transkriptionszyklus *in vitro*. Ein Transkriptionsansatz enthielt alle notwendigen Proteinkomponenten in vorgereinigter

Form (Polymerase, Transkriptionsfaktoren), Matrizen-DNA und Nukleotide, sowie  $^{32}\text{P}$ -GTP zur radioaktiven Markierung der gebildeten Genprodukte.

**Material:**

Transkriptionspuffer:	s. 3.5.1
Nukleotidgemisch:	10 mM ATP, CTP, UTP und 0,5 mM GTP in 67 mM Tris, pH 7,9
$^{32}\text{P}$ -GTP:	20 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$
Plasmid-DNA:	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
Fragment-DNA:	100 ng/ $\mu\text{l}$
Proteinase K-Mix:	0,4mg/ml Proteinase K, 100 mM Tris HCl (pH 7,9); 20 mM EDTA (pH 8,0); 2% (v/v) SDS; 0,2 mg/ml tRNA
Ribonuklease Inhibitor:	40 U / $\mu\text{l}$
EDTA:	5 mM

**Durchführung:**

Ein typischer  $^{32}\text{P}$ -GTP-markierter Transkriptionsansatz enthielt:

NTP-Mix für Pol III:	5 $\mu\text{l}$
$^{32}\text{P}$ -GTP:	0,3 $\mu\text{l}$
Plasmid-bzw. Fragment-DNA:	0,5 $\mu\text{l}$ Plasmid-DNA bzw. 75 bis 200 ng Fragment-DNA
EDTA (5 mM):	0,5 $\mu\text{l}$
Ribonuklease Inhibitor:	0,5 $\mu\text{l}$
Transkriptionspuffer:	ad 50 $\mu\text{l}$

**a) Reaktion ohne Vorinkubation – „Standard-Transkription“**

Zunächst wurden die Reaktionsansätze im 5Eiswasserbad bei 0°C erstellt. Das Volumen, wenn nicht anders angegeben, 50  $\mu\text{l}$  betrug. DNA, Nukleotide, EDTA, RNase Block und Puffer wurden zusammengegeben und anschließend bei 30°C für 90 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Proteinase K ad 100  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen abgestoppt. Danach wurde dieser Ansatz mindestens 15 Minuten bei RT weiterinkubiert. Anschließend wurde die synthetisierte RNA isoliert (3.7.2) und gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.4.2). Das Gel wurde autoradiographiert (3.9.1) und die erhaltenen Signale durch einen Phosphor Imager quantifiziert (3.9.3).

**b) Reaktion mit Vorinkubation zur Komplexassemblierung und Isolierung mittels Gelfiltration**

Sollten nach der Assemblierung der Transkriptionsfaktoren an der DNA die dabei entstandenen Komplexe über Gelfiltration isoliert werden, so wurden

zunächst nur DNA, EDTA und die Proteinfractionen in 24 Transkriptionsansätzen à 50 µl zusammengegeben und 60 Min. bei 30°C im Wasserbad vorinkubiert. Danach wurden diese Vorinkubationsansätze vereinigt und 1 ml auf die S400 HR10/30 oder S500 HR 10/30-Säule aufgetragen. Nach Isolation der Transkriptionskomplexe erfolgte, nach Zugabe der Nukleotide, des <sup>32</sup>P-GTP und der jeweiligen Proteinfractionen, eine weitere Inkubation für 60 Min.

### 3.7.2 Aufarbeitung von RNA aus *in vitro* Transkriptionsansätzen

#### **Materialien:**

PCI:	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50/50/1)
Denaturierungslösung:	0,2% Bromphenolblau; 0,2% Xylencyanol in 80% (v/v) Formamid
Natriumacetat-Lsg:	0,6 M Natriumacetat, pH 5,5
Glykogen:	20 mg/ml
Ethanol:	100%

#### **Durchführung:**

Der Ansatz mit der *in vitro* synthetisierten RNA, der mit Proteinase K/SDS behandelt wurde, wurde mit 1 VT Natriumacetatlösung versehen, um die Fällung der Nukleinsäuren vorzubereiten. Die tRNA im Proteinase K/SDS Gemisch fungierte als weitere Fällungshilfe. Die Abtrennung der Proteine und deren Abbauprodukte wurde durch Zugabe von 1 VT PCI erreicht. Nach 10min. Zentrifugation bei 13000 Rpm wurde die wässrige Phase abgezogen und in 2,5 VT 100% Ethanol überführt. Die Sedimentierung der RNA erfolgte durch 15min. Zentrifugation bei 13000 Rpm. Nach dem Abziehen des Ethanols wurde das Sediment in 6-8 µl Denaturierungslösung aufgenommen und 15-20 Min. bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 95°C denaturiert, im Eiswasserbad abgekühlt und auf ein denaturierendes Polyacrylamid-Harnstoff-Gel aufgetragen (3.4.2). Die Analyse des Gels erfolgte durch Autoradiographie (3.9.1) und ggf. auch durch Auswertung am Phosphor Imager (3.9.3).

## 3.8 Nachweis von Protein-DNA-Interaktionen

### 3.8.1 „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA)

Diese Methode zum Nachweis von Protein-DNA Interaktionen (NACH STRAUSS & VARSHAVSKY, 1984) beruht auf der veränderten elektrophoretischen Mobilität eines Komplexes eines bestimmten Proteins mit einem radioaktiv markiertem DNA-Fragment im Vergleich zu dem nicht komplexierten DNA-Fragment („Freie Probe“).

#### **Materialien:**

poly-(dIdC):	1 mg/ml
-markiertes DNA-Fragment:	PCR-amplifiziertes VAI-Fragment
pUC 9:	1 mg/ml
Proteinfractionen	
Transkriptionspuffer	siehe 3.5.1

#### **Durchführung:**

Ein 25 µl EMSA-Ansatz in Transkriptionspuffer enthielt 0,5-4 µg pUC 9 und 0,5-4 µg poly-(dIdC) als Kompetitor DNA. Nach der radioaktiven Markierung des 24mer M13 rev-Primers (3.6.16) und der Abtrennung der freien Nukleotide (3.6.15), wurde mit Hilfe dieses Primers und des 24mer M13 seq-Primers, ein VAI-Fragment mittels PCR synthetisiert (3.6.6). Die Effizienz der Markierung wird quantitativ durch Bestimmung der Szintillationsstrahlung ermittelt (3.9.2) und pro Probe ca. 10000 CPM eingesetzt.

Zunächst erfolgte eine Inkubation der entsprechenden Proteinfraction mit der Kompetitor-DNA bei 30°C für 15 Minuten. Danach wurde mit der radioaktiv markierten spezifischen DNA für weiter 90 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze auf Eis gestellt und bei 4°C auf ein PAA-Gel für native Protein-DNA-Komplexe aufgetragen (3.4.3).

## 3.9 Bestimmung radioaktiver Strahlung

### 3.9.1 Qualitativ durch Autoradiographie

Nach gelelektrophoretischer Trennung radioaktiv markierter Nukleinsäuren wurde das Gel oder die Membran mit handelsüblicher Frischhaltefolie über-

zogen und ein Röntgenfilm sowie eine Verstärkerfolie („intensifying screen“) aufgelegt. Der Film wurde in lichtundurchlässiger Verpackung 1-8 Tage bei -80°C exponiert. Nach Entwicklung und Fixierung des Films erscheinen die markierten RNA- bzw. DNA-Fragmente als geschwärzte Banden.

### **3.9.2 Quantitativ durch Bestimmung der Szintillationsstrahlung**

Angewandt wurde diese Methode zur Quantifizierung von DE81-Membranfeldern und zur Bestimmung der Markierungseffizienz von DNA-Fragmenten (3.6.16). Hierzu wurde das Membranfeld bzw. ein Aliquot des markierten Fragmentes mit 5 ml Szintillationscocktail (Rotiszint) in ein Zählerröhrchen gegeben und in einem Beckman Szintillationszähler (LS 5000 TD) die Impulsrate pro Zeiteinheit in „counts per minute“ (cpm) bestimmt. Die Messung wurde je nach Signalstärke 2-4 mal durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt.

### **3.9.3 Qualitativ und quantitativ mittels Analyse durch einen Phosphor Imager**

Mit Hilfe dieser Methode kann die Stärke der radioaktiven Strahlung der verschiedenen Proben in kurzer Zeit sehr exakt ermittelt werden. Vor dem Auflegen werden alte Daten, die noch auf der Imaging Plate (IP) gespeichert sind, in einem „Eraser“ gelöscht, und diese nun informationsleere IP auf das Gel aufgelegt. Die Expositionsdauer beträgt nur ca.  $\frac{1}{10}$  der Zeit, die ein Röntgenfilm benötigt. Die IP wird nach der Exposition in einem Fuji FLA -3000 Fluorescent Image Analyzer / Phosphor Imager gescannt (mit dem Programm „Image Reader V. 1.7 E“), d. h. die genaue Signalstärke wird ermittelt. Die Auswertung der gespeicherten Daten erfolgt mit Hilfe eines Computers mit dem Programm „Science Lab 98, Image Gauge, Version 3.1“.

## 4 Ergebnisse

Für eine effiziente und spezifische Transkription sind außer der DNA-abhängigen RNA-Polymerase III weitere Proteine bzw. Proteinkomplexe, die so genannten Transkriptionsfaktoren, notwendig (SEGALL et al., 1980; MATSUI et al., 1980). Wie bereits in der Einleitung beschrieben, unterscheiden sich die Promotor-Klassen in den für die Transkription notwendigen Transkriptionsfaktoren. Lediglich TBP, TFIIB150 und der Transkriptionsfaktor IIC1 werden für die Transkription aller Polymerase-III-Gene benötigt. Bei den 5'-regulierten Genen (s. 1.2.3) wirkt TBP, neben PBP, als primär DNA-bindender Faktor, der über Protein-Protein-Interaktion weitere Faktoren rekrutiert. Bei den klassischen Polymerase-III-Genen (s. 1.2.1 und 1.2.2) hingegen wird TBP – komplexiert mit TFIIB90 und TFIIB150 als TFIIB – selbst über Protein-Protein-Interaktion durch einen bereits an die DNA gebundenen Faktor in den Transkriptionskomplex eingebunden.

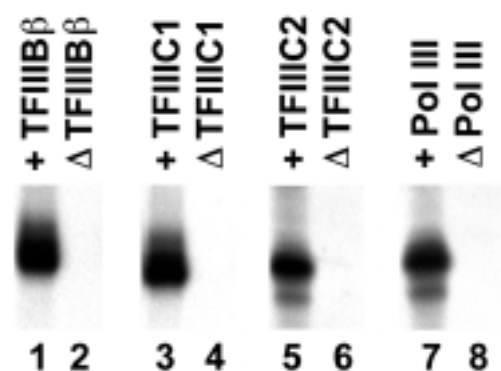
Für den Transkriptionsfaktor IIC1, der für die Transkription aller Polymerase-III-abhängigen Gene essentiell benötigt wird, konnte eine wichtige Rolle bei der Regulation der Polymerase-III-Transkription während der Zelldifferenzierung, der Zellproliferation und des Zellzyklus nachgewiesen werden (HAERTEL, 1999; THOMAE, 2000; MEISSNER et al., 2002).

Obwohl YOSHINAGA et al. den Transkriptionsfaktor IIC1 bereits 1987 identifiziert haben, konnte bisher weder seine Struktur noch seine Funktionsweise aufgeklärt werden. Die Schwierigkeiten, TFIIC1 näher zu charakterisieren, liegen unter anderem darin, dass es außerordentlich schwer ist, den Faktor über mehrere Chromatographie-Schritte zu reinigen und dabei seine Aktivität zu erhalten. Der Verlust der Transkriptionsaktivität von TFIIC1 während der Reinigung stellt ein schwerwiegendes Problem dar. Deshalb war der Schwerpunkt der vorliegenden Dissertation die Etablierung einer Reinigungsstrategie, durch die TFIIC1 isoliert und gleichzeitig die Aktivität erhalten werden kann.

## 4.1 Untersuchungen zur Funktion von TFIIC1

### 4.1.1 Der Transkriptionsfaktor IIC1 wird für die Transkription aller Polymerase-III-abhängigen Gene essentiell benötigt

Für eine effiziente *in vitro*-Transkription am VA I-Gen ist als erster Transkriptionsfaktor TFIIC2 als die DNA-bindende Aktivität notwendig. TFIIC2 wiederum ist für die Rekrutierung von TFIIB in den entstehenden Transkriptionskomplex verantwortlich. Weiterhin müssen TFIIC1 sowie die Polymerase III anwesend sein, damit eine effiziente Polymerase-III-Transkription stattfinden kann.



**Abb. 1:**  
**Aktivitäten des rekonstituierten Systems in der *in vitro*-Transkription.**

Alle Transkriptionsansätze enthielten Nukleosidtriphosphate und je 1 µg VA I-Plasmid als Matrizen-DNA. Das konstituierte System beinhaltete grundsätzlich jeweils 2 µl ESF-TFIIB, 2 µl ESF-Polymerase III, 10 µl MQ-TFIIC1 sowie 5 µl über PC rechromatographierten MQ-TFIIC2 (s. 4.2.3). Zur Überprüfung der einzelnen Aktivitäten wurde die jeweilige zu analysierende Fraktion im System ausgespart. Die Ansätze wurden für 90 Minuten bei 30°C inkubiert, die Aufarbeitung erfolgte nach 3.7.2.

- Bahn 1:* rekonstituiertes System in Anwesenheit von TFIIB  
*Bahn 2:* rekonstituiertes System in Abwesenheit von TFIIB  
*Bahn 3:* rekonstituiertes System in Anwesenheit von TFIIC1  
*Bahn 4:* rekonstituiertes System in Abwesenheit von TFIIC1  
*Bahn 5:* rekonstituiertes System in Anwesenheit von TFIIC2  
*Bahn 6:* rekonstituiertes System in Abwesenheit von TFIIC2  
*Bahn 7:* rekonstituiertes System in Anwesenheit von Polymerase III  
*Bahn 8:* rekonstituiertes System in Abwesenheit von Polymerase III

In Abb. 1 ist ein rekonstituiertes Transkriptionssystem dargestellt, bei dem jeweils ein Faktor ausgespart wurde. Auf diese Weise lässt sich zum einen feststellen, ob es sich um einen essentiellen Transkriptionsfaktor handelt, zum anderen, ob untereinander Kreuzkontaminationen bestehen. Die Bahnen 1, 3, 5 und 7 zeigen die Transkriptionsaktivität des jeweiligen Proteinmixes, wenn alle notwendigen Faktoren und die Polymerase III anwesend sind; in Bahn 2

wurde TFIIB ausgespart, in Bahn 4 TFIIC1, in Bahn 6 TFIIC2 und in Bahn 8 die Polymerase III. In Abwesenheit dieser Faktoren oder der Polymerase III ist keinerlei Transkriptionsaktivität zu verzeichnen. Dies bedeutet zum einen, dass keine Kreuzkontaminationen untereinander bestehen, zum anderen verdeutlicht dieses Experiment, dass die drei Transkriptionsfaktoren TFIIC2, TFIIB und TFIIC1 für die Polymerase-III-Transkription von essentieller Bedeutung sind. Über TFIIC2 ist sowohl strukturell als auch funktionell sehr viel bekannt und auch TFIIB ist bereits recht gut untersucht. Über die Struktur und die genaue Funktion von TFIIC1 ist dagegen noch nichts bekannt, weshalb die weitere Reinigung dieses Faktors das Hauptziel darstellt. Aber auch seine Funktion war in den folgenden Experimenten Gegenstand der Untersuchung.

#### **4.1.2 Überprüfung der Spezifität der TFIIC2-Bindungsverstärkung an den AB-Box-Genen durch TFIIC1**

Der Transkriptionsfaktor IIC1 bindet nicht primär an die DNA, sondern wird durch Protein-Protein-Interaktion von bereits gebundenen Proteinen an die DNA geführt. Bis vor kurzem war unklar, ob TFIIC1 vor TFIIB in den Komplex eingebunden wird oder ob es sich umgekehrt verhält. Dass aber grundsätzlich eine Interaktion zwischen TFIIC2 und TFIIC1 stattfinden muss, wurde aus Footprint- und EMSA-Experimenten geschlossen, bei denen die Anwesenheit von TFIIC1 zu einer Erweiterung des TFIIC2-Schutzes im Footprint bzw. zu einer Bindungsverstärkung von TFIIC2 an die DNA führte (YOSHINAGA et al., 1987; WANG & ROEDER, 1996; OETTEL et al., 1997).

Neben der klassischen Reinigung wurde versucht, eine einfache biochemische Methode einzusetzen, um Kreuzkontaminationen der Transkriptionsfaktoren und der Polymerase III zu beseitigen. Hierfür sollte die unterschiedliche Stabilität der Transkriptionsfaktoren beim Erhitzen einer Fraktion genutzt werden. Diese bei unterschiedlichen Temperaturen erhitzten Fraktionen wurden schließlich ebenfalls eingesetzt, um die Spezifität der TFIIC2-DNA-Bindungsverstärkung in Anwesenheit von TFIIC1 zu überprüfen. Hierbei wurde das



Verhalten der erhitzten Fraktionen im EMSA mit dem Verhalten in der *in vitro*-Transkription verglichen.

Um die Temperaturstabilität der verschiedenen Faktoren und der Polymerase III zu untersuchen, wurden 50 µl der jeweiligen Fraktion für 15 Minuten unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt: 0°C / 25°C / 30°C / 37°C / 42°C / 47°C / 52°C.

Direkt im Anschluss wurden diese Fraktionen in ein rekonstituiertes Transkriptionssystem (grundsätzlich bestehend aus ESF-TFIIB , ESF-Polymerase III, MQ-TFIIC1 und MQ-TFIIC2; s. 3.5.3) eingesetzt und somit überprüft, bei welcher Temperatur es zu einem Aktivitätsverlust bzw. zur Inaktivierung kommt.

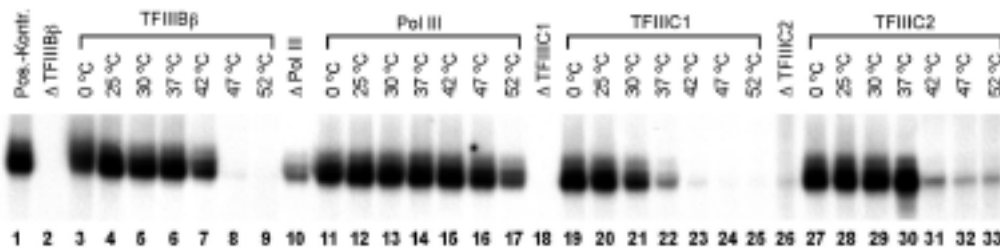
#### **4.1.2.1 Aktivitätsnachweis der erhitzten TFIIC1-Fraktion in der *in vitro*-Transkription**

Für den Nachweis der drei Transkriptionsfaktoren sowie der Polymerase III wurden *in vitro*-Transkriptionen durchgeführt. Eingesetzt wurde jeweils ein rekonstituiertes Transkriptionssystem, in dem bis auf den nachzuweisenden Faktor bzw. die Polymerase alle notwendigen Proteinfaktionen sowie Nucleotide und VA I-Plasmid als Template anwesend waren.

Wurde durch die Inkubation der Fraktionen bei den verschiedenen Temperaturen der zu analysierende Faktor bzw. die Polymerase inaktiviert, kann keine Transkription erfolgen. Das Ausmaß der Inaktivierung spiegelt sich in der Anzahl der entstandenen Transkripte wider und kann anschließend qualitativ mittels Autoradiographie (s. 3.9.1) oder quantitativer Analyse durch einen Phosphor-Imager (s. 3.9.3) ausgewertet werden.

Abb. 2 zeigt das Ergebnis dieses Experiments: In Bahn 1 ist die Positivkontrolle (unbehandelte Fraktionen des eingesetzten rekonstituierten Transkriptionssystems) aufgetragen. In Bahn 2, 10, 18 und 26 sind die Negativkontrollen des jeweiligen Systems gezeigt. Lediglich in Bahn 10 ist eine leichte Kreuzkontamination mit Polymerase zu erkennen, ansonsten sind die Systeme kreuzkontaminationsfrei.

Betrachtet man die Bahnen 3 bis 9, in denen die temperaturbehandelte TFIIB $\beta$ -Fraktion eingesetzt wurde, so zeigt sich, dass TFIIB $\beta$  bis 37°C stabil bleibt (Bahn 6) und es bei 42°C nur zu einem leichten Rückgang in der Transkriptionsaktivität kommt (Bahn 7). Ab einer Temperatur von 47°C (Bahn 8) erfolgt die komplette Inaktivierung von TFIIB $\beta$ .



**Abb. 2: Überprüfung der Temperaturstabilität von TFIIC1, TFIIC2, TFIIB $\beta$  und der Polymerase III in der *in vitro*-Transkription.**

Alle Transkriptionsansätze enthielten Nukleosidtriphosphate und je 1  $\mu$ g VA I-Plasmid als Matrizen-DNA. Das konstituierte System beinhaltete jeweils 2  $\mu$ l ESF-TFIIB $\beta$ , 2  $\mu$ l ESF-Polymerase III, 10  $\mu$ l MQ-TFIIC1 sowie 5  $\mu$ l MQ-TFIIC2. Zur Überprüfung der Aktivität der hitzebehandelten Fraktionen wurde die jeweilige Fraktion im System ausgespart. Die Ansätze wurden für 90 Minuten bei 30°C inkubiert, die Aufarbeitung erfolgte nach 3.7.2.

- Bahn 1:* Positivkontrolle des konstituierten Transkriptionssystems  
*Bahn 2:* Negativkontrolle des TFIIB $\beta$ -defizienten Transkriptionssystems  
*Bahn 3-9:* + je 2  $\mu$ l des bei 0°C/25°C/30°C/37°C/42°C/47°C/52°C inkubierten ESF-TFIIB $\beta$   
*Bahn 10:* Negativkontrolle des Polymerase-III-defizienten Transkriptionssystems  
*Bahn 11-17:* + je 2  $\mu$ l der bei 0°C/25°C/30°C/37°C/42°C/47°C/52°C inkubierten ESF-Polymerase III  
*Bahn 18:* Negativkontrolle des TFIIC1-defizienten Transkriptionssystems  
*Bahn 19-25:* + je 10  $\mu$ l des bei 0°C/25°C/30°C/37°C/42°C/47°C/52°C inkubierten MQ-TFIIC1  
*Bahn 26:* Negativkontrolle des TFIIC2-defizienten Transkriptionssystems  
*Bahn 27-33:* Zugabe von je 5  $\mu$ l des bei 0°C/25°C/30°C/37°C/42°C/47°C/52°C inkubierten MQ-TFIIC2

Der zweite Block (Bahn 11 bis 17) zeigt die Temperaturstabilität der Polymerase III. Bis 42°C (Bahn 15) ist kein Verlust an Transkriptionsaktivität zu verzeichnen und bei 47°C (Bahn 16) nur ein kaum merklicher. Erst bei 52°C (Bahn 17) ist eine Abnahme der Transkriptionsaktivität zu erkennen.

In Block drei ist die Temperaturstabilität von TFIIC1 dargestellt (Bahn 19 bis 25), hier zeigt sich die deutlichste Temperatursensibilität. Bereits bei 30°C (Bahn 21) ist ein Aktivitätsrückgang zu beobachten, bei 37°C (Bahn 22) ist schon ein ganz erheblicher Verlust an Aktivität zu verzeichnen und bei 42°C (Bahn 23) ist so gut wie keine Transkriptionsaktivität mehr nachweisbar. D.h.

der Bereich, in dem die Aktivität beeinträchtigt wird, liegt für TFIIIC1 zwischen 30°C und 37°C.

Der letzte Block zeigt die Temperaturstabilität von TFIIIC2 (Bahn 27 bis 33), der bei einer Erwärmung bis 37°C (Bahn 30) keinerlei Aktivitätsverlust aufweist. Bei 42°C (Bahn 31) kommt es dann allerdings zu einem abrupten Aktivitätseinbruch.

In Hinsicht auf das ursprüngliche Ziel, Kreuzkontaminationen in der TFIIIC1-Fraktion durch einfaches Erhitzen zu beseitigen, erwies sich diese Methode als ungeeignet, da TFIIIC1 selbst besonders temperatursensitiv ist.

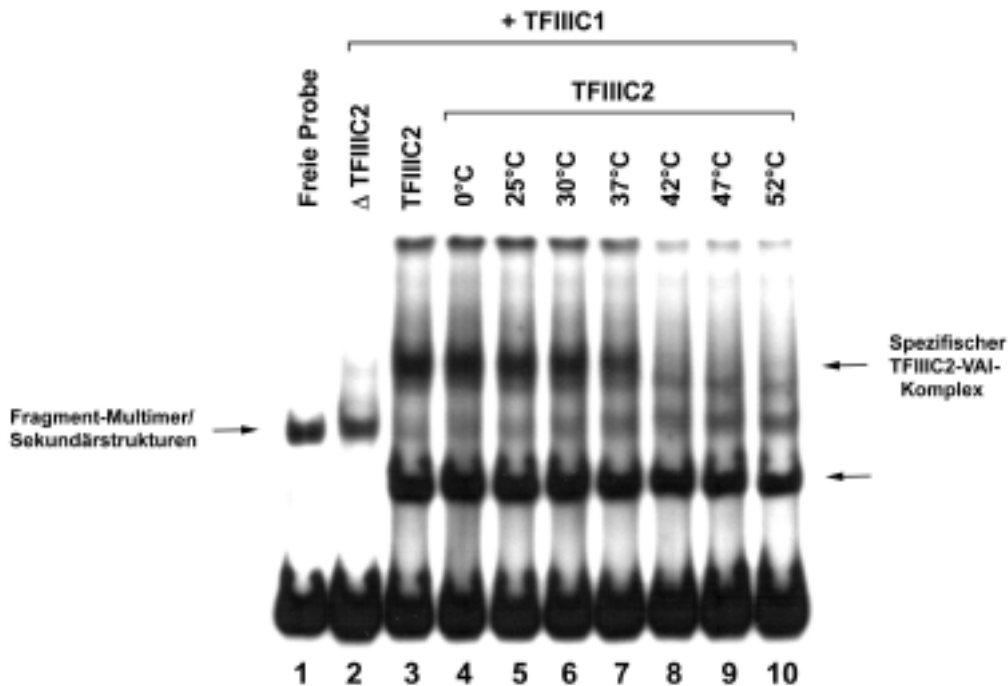
#### **4.1.2.2 Aktivitätsnachweis der erhitzten Fraktionen im EMSA**

Um die erhitzten TFIIIC2-Fractionen auch in ihrer Funktion hinsichtlich der DNA-Bindung zu überprüfen, wurden EMSAs durchgeführt (s. 3.4.4), wobei auch die Bindungsverstärkung in Anwesenheit von TFIIIC1 von zentralem Interesse war.

Abb. 3 zeigt den Einfluss der Temperaturbehandlung auf TFIIIC2 und seine Bindungsaktivität in Anwesenheit von TFIIIC1. Bahn 1 zeigt das proteinfreie, radioaktiv markierte VA I-Fragment (s. 3.6.16). Die in dieser Probe auftretende zweite Bande (mit einem Pfeil markiert) wird vermutlich von Multimeren oder Sekundärstrukturen des VA I-Fragments verursacht. In Bahn 2 wurden 4 µl einer TFIIIC1-Fraktion zu dem markierten VA I-Fragment gegeben, die aber erwartungsgemäß keine Bindungsaktivität aufweist. Bahn 3 zeigt die Bindungsaktivität einer TFIIIC2-Kontrollfraktion in Anwesenheit von TFIIIC1. In Bahn 3 bis 10 tritt ein Komplex auf, der eine höhere elektrophoretische Mobilität besitzt als der spezifische TFIIIC2-DNA-Komplex; seine Rolle ist bisher nicht geklärt (SCHNEIDER et al., 1990). Der spezifische TFIIIC2-DNA-Komplex ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

In Bahn 4 bis 10 wurde der jeweils bei 0°C, 25°C, 30°C, 37°C, 42°C, 47°C sowie 52°C inkubierte TFIIIC2 auf seine Bindungsaktivität in Anwesenheit von TFIIIC1 untersucht. Hier zeigt sich, dass bei 37°C die Bindungsaktivität eine geringfügige Abschwächung aufweist (Bahn 7), bei 42°C verschwindet sie schließlich fast komplett (Bahn 8). Der spezifische TFIIIC2-DNA-Komplex bildet sich also nur bis 37°C aus, ab 42°C ist er nicht mehr nachweisbar. Dies

bedeutet, dass die Bindungsaktivität von TFIIC2 bei 42°C inaktiviert wird, was mit den Ergebnissen aus der *in vitro*-Transkription übereinstimmt.



**Abb. 3: Analyse des Einflusses von TFIIC1 auf hitzebehandelten TFIIC2 im EMSA.**

Vorgehensweise wie unter 3.8.1 beschrieben. Kompetitiert wurde mit 1 µg Poly-dIdC und 0,5 µg pUC9.

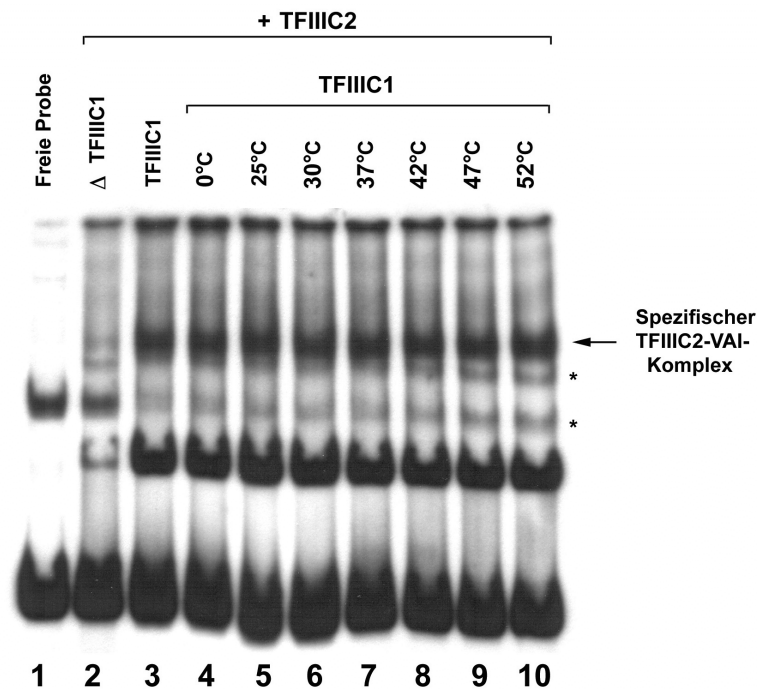
- Bahn 1: Freie DNA
- Bahn 2: + 4 µl MQ-TFIIC1
- Bahn 3: + 4 µl MQ-TFIIC1 + 4 µl MQ-TFIIC2
- Bahn 4-10: + je 4 µl MQ-TFIIC1 + je 4 µl des bei 0°C/25°C/30°C/37°C/42°C/47°C/52°C inkubierten MQ-TFIIC2

Betrachtet man dagegen das Verhalten des Komplexes im unteren Bereich des EMSA, so ist keinerlei Effekt durch die Temperatur zu verzeichnen. Es lässt sich daher vermuten, dass es sich hierbei um einen unspezifischen Komplex handelt.

Abb. 4 zeigt den Einfluss des temperaturbehandelten TFIIC1 auf die Bindungsaktivität von unbehandeltem TFIIC2. Bahn 1 zeigt das proteinfreie, radioaktiv markierte VA I-Fragment. In Bahn 2 wurden 4 µl TFIIC2 zu dem VA I-Fragment gegeben und es zeigt sich ein zwar schwacher, aber erkennbarer TFIIC2-DNA-Komplex. Diese geringe Stärke (durch die Zugabe einer nur geringen Menge TFIIC2) wurde gewählt, um die Bindungsverstärkung in Anwe-

senheit von TFIIIC1 deutlich darstellen zu können. Wie Bahn 3 bis 10 zeigen, führt die Zugabe von TFIIIC1, unabhängig davon, welcher Temperatur (zwischen 0°C und 52°C) es zuvor ausgesetzt war, zu einer deutlichen Verstärkung des TFIIIC2-DNA-Komplexes (vgl. Bahn 2 mit Bahn 3 bis 10).

In Bahn 2 bis 10 treten weitere Protein-DNA-Komplexe unterhalb des spezifischen TFIIIC2-DNA-Komplexes auf (mit Sternchen gekennzeichnet), deren Bedeutung bzw. Spezifität nicht geklärt ist.



**Abb. 4:** Analyse des Einflusses von hitzebehandeltem TFIIIC1 auf die TFIIIC2-DNA-Bindung im EMSA.

Vorgehensweise wie unter 3.8.1 beschrieben. Kompetitiert wurde mit 1 µg Poly-dIdC und 0,5 µg pUC9.

- Bahn 1:* Freie DNA  
*Bahn 2:* + 4 µl MQ-TFIIIC2  
*Bahn 3:* + 4 µl MQ-TFIIIC2 + 4 µl MQ-TFIIIC1  
*Bahn 4-10:* + je 4 µl MQ-TFIIIC2 + je 4 µl des bei 0°C/25°C/30°C/37°C/42°C/47°C/52°C inkubierten MQ-TFIIIC1

Da die in diesem Experiment aufgetretene Bindungsverstärkung auch noch in einem Bereich auftritt, in dem die Transkriptionsaktivität von TFIIIC1 längst inaktiviert wurde, stellt sich die Frage, ob es sich bei der beobachteten Bindungsverstärkung überhaupt um eine spezifische Interaktion zwischen

TFIIIC2 und TFIIIC1 handelt. Um dies näher zu untersuchen, wurde eine TFIIIC1-Fraktion erneut bei verschiedenen Temperaturen inkubiert, dieses Mal in einem Bereich von 40°C bis 95°C.

Dieser höher erhitzte TFIIIC1 wurde ebenfalls im EMSA auf die Bindungsverstärkung bei TFIIIC2 untersucht (Daten nicht gezeigt).

Die Bindungsverstärkung, die die bei 40°C erhitzte TFIIIC1-Fraktion bewirkte, war auch bei allen höher erhitzten Proben zu beobachten. Selbst die bei 95°C erhitzte TFIIIC1-Fraktion führte zu einer Verstärkung des TFIIIC2-DNA-Komplexes.

Die beobachtete Bindungsverstärkung wurde bisher auf eine spezifische TFIIIC1-TFIIIC2-Interaktion zurückgeführt (YOSHINAGA et al., 1987; WANG & ROEDER, 1996; OETTEL et al., 1997), was aber nach diesen Daten nicht haltbar ist, sondern im Gegenteil eine spezifische Interaktion zwischen TFIIIC1 und TFIIIC2 ausgeschlossen werden muss.

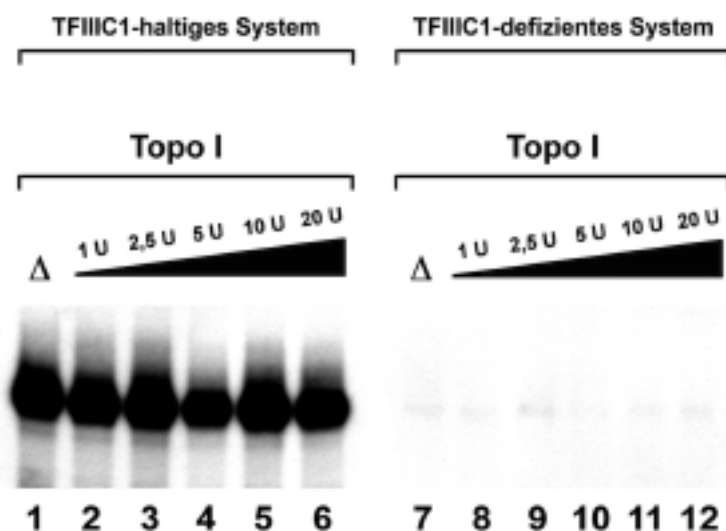
#### **4.1.3 Einfluss der DNA-Topoisomerase I auf das Polymerase-III-Transkriptionssystem**

Wie bereits in der Einleitung erwähnt (s. 1.4.3), konnten WANG & ROEDER 1998 über eine Immunopräzipitation mit Antikörpern gegen TFIIIC220 einen Komplex isolieren, den sie als „Holo-TFIIIC“ bezeichneten. Dieser Komplex enthielt unter anderem den Positive Cofactor 4 (PC4) sowie die DNA-Topoisomerase I. WANG & ROEDER beschrieben, dass für eine effiziente VA I-Transkription wenigstens einer der beiden genannten Faktoren benötigt wird.

Da die Reinigungsstrategie von WANG & ROEDER erheblich von der in unserem Labor etablierten abweicht, sollte überprüft werden, ob die Topoisomerase I auch in unserem System eine Rolle spielt und ob es sich bei der Topoisomerase I und TFIIIC1 um das gleiche Wirkprinzip handeln könnte; daher wurde der Einfluss von rekombinanter Topoisomerase I auf ein rekonstituiertes Transkriptionssystem untersucht.

In Abb. 5 ist in den Bahnen 1 und 7 die Grundaktivität des jeweiligen Systems gezeigt. Im TFIIIC1-haltigen System ist eine effiziente VA I-Transkription zu sehen (Bahn 1), während im TFIIIC1-defizienten System keine Transkription möglich ist (Bahn 7). Gibt man zu beiden Systemen steigende Mengen der

Topoisomerase I (von 1 U bis 20 U, Bahn 2 bis 6 und 8 bis 12), tritt keine Veränderung in der Transkriptionseffizienz auf. Es werden weder die Signale im TFIIIC1-haltigen System stärker, noch kann die Topoisomerase I im zweiten System TFIIIC1 ersetzen und so die Transkription rekonstituieren.



**Abb. 5:** *Untersuchung des Einflusses der Topoisomerase I auf ein TFIIIC1-haltiges und ein TFIIIC1-defizientes in vitro-Transkriptionssystem.*

Alle Transkriptionsansätze enthielten Nukleosidtriphosphate und je 1 µg VA I-Plasmid als Matrizen-DNA. Das konstituierte System beinhaltete jeweils 5 µl EDF- TFIIIB , 4 µl ESF-Polymerase III, 5 µl ESF-TFIIIC1 sowie 5 µl MQ-TFIIIC2. Eingesetzt wurde rekombinante Topoisomerase I von MBI Fermentas. Bahn 1 bis 6 enthält das TFIIIC1-haltige Transkriptionssystem, Bahn 7 bis 12 das TFIIIC1-defiziente Transkriptionssystem.

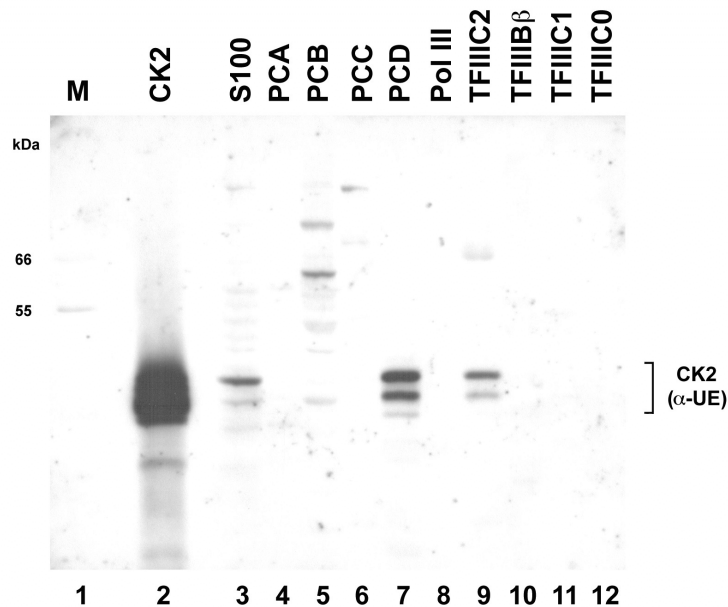
*Bahn 1+7:* Keine Zugabe von Topoisomerase I  
*Bahn 2-6 + 8-12:* + je 1 U / 2,5 U / 5 U / 10 U / 20 U Topoisomerase I

#### 4.1.4 Überprüfung eines möglichen Zusammenhangs zwischen TFIIIC1 und CK2

Die Proteinkinase CK2 (früher Casein Kinase II; s. 1.8) ist ein 130 kDa großes, hochkonserviertes Protein in Eukaryoten, das wachstumsfördernde und onkogene Eigenschaften aufweist (Reviews: LITCHFIELD & LUSCHER, 1993; ALLENDE & ALLENDE, 1995).

JOHNSTON et al. (2002) zeigten mit Hilfe von Koimmunopräzipitationsversuchen, dass CK2 einen stabilen Komplex mit TFIIIB bildet und die RNA-Polymerase-III-Transkription in menschlichen Zellen aktiviert.

Aufgrund der Tatsache, dass in unserem Labor TFIIC1 stets im Zusammenhang mit einer Aktivierung der *in vitro*-Transkription stand, sollte geklärt werden, ob es sich bei TFIIC1 möglicherweise um CK2 handeln könnte. Daher wurde unser rekonstituiertes Transkriptionssystem auf die Anwesenheit von CK2 überprüft.



**Abb. 6: Überprüfung verschiedener Proteinfractionen auf ihren CK2-Gehalt im Western Blot.**

Die Fraktionen wurden auf ein SDS/12,5%PAA-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel für 2 Stunden bei 250 mA auf eine PVDF-Membran geblottet. Das weitere Vorgehen ist unter 3.5.7.2 beschrieben. Eingesetzt wurde ein polyklonaler Antikörper gegen die  $\alpha$ -Untereinheit von CK2, der mit der  $\beta$ -Untereinheit kreuzreagiert.

<i>Bahn 1:</i>	40 $\mu$ l Mark12	<i>Bahn 7:</i>	20 $\mu$ l PCD
<i>Bahn 2:</i>	500 ng rekombinante CK2	<i>Bahn 8:</i>	10 $\mu$ l ss-Polymerase III
<i>Bahn 3:</i>	5 $\mu$ l S100 (Zellextrakt)	<i>Bahn 9:</i>	75 $\mu$ l DC-TFIIC2
<i>Bahn 4:</i>	5 $\mu$ l PCA	<i>Bahn 10:</i>	30 $\mu$ l ESF-TFIIB
<i>Bahn 5:</i>	20 $\mu$ l PCB	<i>Bahn 11:</i>	100 $\mu$ l MQ-TFIIC1
<i>Bahn 6:</i>	20 $\mu$ l PCC	<i>Bahn 12:</i>	100 $\mu$ l MQ-TFIIC1-like

Abb. 6 zeigt einen Western Blot mit den grob gereinigten Ausgangsfraktionen bis hin zu den sehr weit gereinigten Komponenten des rekonstituierten Transkriptionssystems. In Bahn 2 befindet sich die Positivkontrolle in Form von rekombinanter CK2. Bahn 3 bis 12 zeigt die unterschiedlichen Reinigungsstufen vom Zellextrakt (S100) bis hin zu den einzelnen hochgereinigten Fraktionen, die unter anderem auch für die Generierung von Transkriptionskomplexen



eingesetzt wurde (s. 4.2.10). Für den Western Blot wurden Antikörper gegen die 44 kDa große  $\beta$ -Untereinheit von CK2 verwendet (der Antikörper ist kreuzreaktiv mit der gleichgroßen  $\alpha$ -Untereinheit).

Im S100 (Bahn 3) ist CK2 erwartungsgemäß detektierbar. Nach der Auftrennung des S100 über eine Phosphocellulose-Chromatographie findet sich in der PCA-Fraktion keine CK2 (Bahn 4), in der PCB-Fraktion eine sehr geringe Menge (Bahn 5) und in der PCC-Fraktion nur Spuren (Bahn 6, fototechnisch nicht darstellbar, da es sich an der Nachweisgrenze befindet). Die Hauptmenge erscheint sehr stark und deutlich in der PCD-Fraktion (Bahn 7). Betrachtet man die weit gereinigten Fraktionen im einzelnen, so zeigt sich, dass in der über Single-strand-DNA-Cellulose gereinigten Polymerase-III-Fraktion keinerlei CK2 enthalten ist (Bahn 8), ebenso sind die MQ-TFIIC1-Fraktion (Bahn 11) und die MQ-TFIIC0-Fraktion (Bahn 12) CK2-frei. Auffällig ist dagegen der ausgesprochen deutliche CK2-Gehalt der TFIIC2-Fraktion (Bahn 9), die über eine Double-strand-DNA-Cellulose gereinigt wurde. Noch interessanter ist allerdings die Tatsache, dass die ESF-TFIIB  $\beta$ -Fraktion (Bahn 10) vollkommen CK2-frei ist, was nach JOHNSTON et al. nicht zu erwarten gewesen wäre.

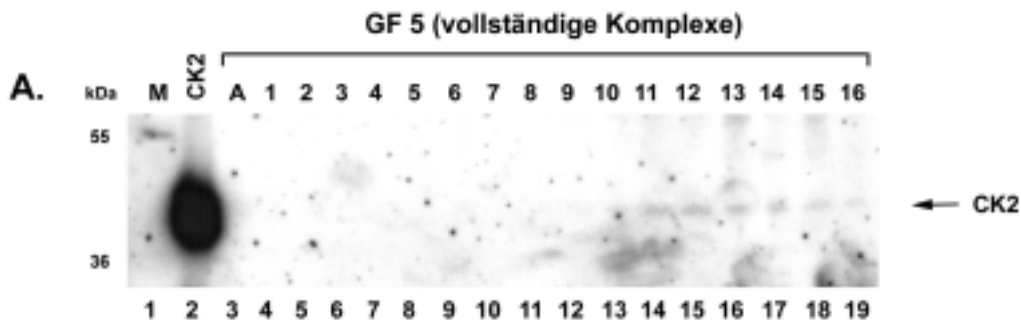
Somit konnte gezeigt werden, dass es sich bei TFIIC1 und CK2 um zwei verschiedene Proteinkomplexe handeln muss.

In einem anderen Zusammenhang (s. 4.2.10) waren aus den zuletzt genannten Fraktionen des rekonstituierten Transkriptionssystems unter Standardbedingungen vollständige Transkriptionskomplexe am VA I-Plasmid generiert worden. Diese Transkriptionskomplexe können aufgrund ihrer Größe über eine S500-Gelfiltrationssäule von den freien, nicht in den Komplex eingebundenen Proteinen abgetrennt werden (s. 3.5.2.3): Während die an die DNA gebundenen Transkriptionskomplexe im Ausschlussvolumen eluieren, erscheinen die freien Proteine im Trennbereich der Säule.

Da in der für die Assemblierung der Transkriptionskomplexe eingesetzten TFIIC2-Fraktion CK2 (s. Abb. 6, Bahn 9) enthalten war, sollte überprüft werden, ob sich CK2 auch in den assemblierten, transkriptionsaktiven Komplexen

nachweisen lässt und damit unter Umständen eine Rolle bei der Initiation oder Reinitiation der Polymerase-III-Transkription spielt.

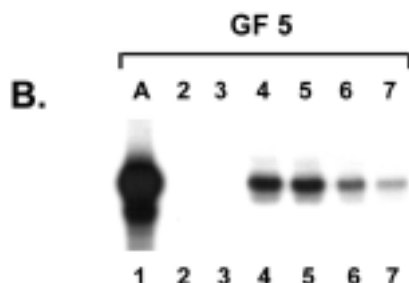
Abb. 7 A zeigt den Western Blot gegen CK2 mit sämtlichen Fraktionen der Gelfiltration, über die die vollständigen Transkriptionskomplexe gereinigt wurden (s. 3.5.2.3). Bahn 3 zeigt den Auftrag (GF 5, s. 4.2.10) auf die S500-Gelfiltrationssäule, Bahn 4 bis 19 alle Fraktionen dieser Chromatographie, Bahn 2 rekombinantes CK2 als Positivkontrolle.



**Abb. 7:** Überprüfung der Gelfiltrationsfraktionen mit vollständigen Transkriptionskomplexen auf ihren CK2-Gehalt im Western Blot sowie ihre Transkriptionsaktivität in der *in vitro*-Transkription.

**A. Western Blot.** Bevor die Gelfiltrations-Fraktionen auf ein SDS/8%PAA-Gel aufgetragen wurden, wurden sie mittels StrataClean Resin auf ein Volumen von 100  $\mu$ l gebracht. Der Laufpuffer enthielt Tris/Tricine. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 2 Stunden bei 260 mA auf eine PVDF-Membran geblottet. Weiteres Vorgehen siehe unter 3.5.7.2. Eingesetzt wurde ein polyklonaler Antikörper gegen die  $\gamma$ -Untereinheit von CK2, der mit der  $\beta$ -Untereinheit kreuzreagiert.

- Bahn 1: 40  $\mu$ l Mark 12
- Bahn 2: 200 ng CK2
- Bahn 3: 100  $\mu$ l Auftrag (GF5) auf die Gelfiltration
- Bahn 4-19: Fraktion 1 bis 16 der Gelfiltration mit dem Ansatz GF5



Das Signal der Positivkontrolle in Bahn 2 ist sehr stark und markiert die Laufhöhe der -Untereinheit von CK2 (bzw. ). Die Komplex-haltigen Gelfiltrationsproben (hauptsächlich Fraktion 4 und 5, Bahn 4 und 5; vgl. Transkriptionsaktivität in Abb. 7 B) weisen keinerlei CK2 auf. Im Bereich der hinteren Fraktionen (11 bis 16, Bahn 14 bis 19) erscheinen in Abb. 7 A schwache Signale, die die Anwesenheit von CK2 in den abgetrennten, freien Proteinen widerspiegeln. Die aktiven Transkriptionskomplexe (Abb. 7 B, Fraktion 4 und 5 in Bahn 4 und 5) enthalten also kein CK2.

Dass in der Auftragsprobe kein Signal erscheint, liegt daran, dass von der Auftragsfraktion lediglich 100 µl eingesetzt wurden, während die Gelfiltrationsproben der vier Läufe untereinander vereinigt (je Probe ca. 3,5 ml) und mit Hilfe der StrataClean Resin-Methode auf ein adäquates Volumen gebracht wurden. D. h. das in den 100 µl Auftrag enthaltene CK2 lag vermutlich unterhalb der Nachweisgrenze und wurde deshalb nicht detektiert.



Die Überprüfung der Reinigungseffizienz zeigte allerdings, dass auf dieser Stufe immer noch insgesamt zuviele Proteine enthalten sind, so dass die Identifizierung von Untereinheiten, die zu TFIIIC1 gehören könnten, unmöglich war. Für die Isolierung von TFIIIC1-Untereinheiten und eine anschließende Klonierung ist also eine effizientere Reinigung von grundlegender Wichtigkeit.

#### **4.2.2 Phosphocellulose- und MonoQ-Chromatographie**

Mittels einer Phosphocellulose-Chromatographie (SEGALL et al., 1980; MATSUI et al., 1980) werden aus einem zytoplasmatischen Zellextrakt (S100, s. 3.3.1) vier Fraktionen gewonnen, die in der Reihenfolge ihrer Elution als PCA, PCB, PCC und PCD bezeichnet werden.

Für die weitere Reinigung der PCC-Fraktion wird diese auf eine MonoQ-Säule (starker, hochauflösender Anionentauscher; s. 3.5.2.1) aufgetragen und mit einem linearen Salzgradienten von 60 bis 450 mM KCl eluiert. Auf diese Weise erhält man drei unterschiedliche, transkriptionsaktive Fraktionen, die als TFIIIC0-, TFIIIC1- und TFIIIC2-Fraktion bezeichnet werden (YOSHINAGA et al., 1987; OETTEL et al., 1997). Weiterhin eluiert im Bereich zwischen der TFIIIC1- und der TFIIIC2-Fraktion der Transkriptionsfaktor PBP, der für die Transkription der 5'-regulierten Polymerase-III-Gene notwendig ist.

#### **4.2.3 Hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC)**

Das weitere, standardisierte Vorgehen beinhaltete eine Kationenaustauscher-Chromatographie in Form eines EMD  $\text{SO}_3^-$  Fractogel- (ESF; s. 3.5.2.2 und 4.2.1) oder eines ResourceS-Säulenlaufs. Da mit diesen Chromatographien allerdings kein nennenswerter Reinigungseffekt erreicht werden konnte (Daten nicht gezeigt), sollte die Hydrophobe Interaktions-Chromatographie als vollkommen neue Reinigungsstrategie eingesetzt werden.

Die Prinzip der HIC (s. 3.5.2.4) ist dem der Ionenaustauscherchromatographie genau entgegengesetzt: Während bei letzterer die Proteine unter Niedrigsalzbedingungen auf die Säule aufgetragen und durch steigende Salzkonzentra-

tionen eluiert werden, erfolgt der Auftrag auf die HIC unter Hochsalzbedingungen und die Elution bei Niedrigsalz.

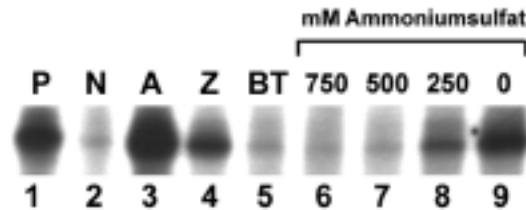
Diese Methode könnte sich als vorteilhaft erweisen, da die TFIIC1-haltigen Fraktionen für den Auftrag auf die HIC-Säule im undialysierten Zustand mit Ammoniumsulfat versetzt werden können, womit der Aktivitätsverlust durch den Dialyseschritt vermieden werden könnte.

Für die hydrophobe Interaktions-Chromatographie wurde eine MQ-TFIIC1-Fraktion durch die Zugabe einer 3 M Ammoniumsulfatlösung (bei 4°C) auf eine Endkonzentration von 1 M Ammoniumsulfat gebracht. Vor dem Auftrag auf die Säule (1 ml-Fertigsäule mit Phenyl Sepharose® 6 FF {high substituted} als Säulenmaterial, s. 3.5.2.4) wurde die Probe für zehn Minuten bei 4°C zentrifugiert, um eventuell ausgefallenes Protein vom Überstand abzutrennen.

Nach dem Auftrag wurden vier Elutionsschritte mit Transkriptionspuffer (s. 3.5.1) durchgeführt, der fallende Ammoniumsulfatkonzentrationen enthielt: 750 mM, 500 mM, 250 mM und 0 M Ammoniumsulfat.

Aufgrund des hohen Salzgehalts mussten alle Elutionsschritte sowie die Auftragsprobe dialysiert werden, bevor sie in der *in vitro*-Transkription auf Aktivität untersucht werden konnten.

Abb. 8 zeigt die *in vitro*-Transkription mit den HIC-Fraktionen, die zu einem TFIIC1-defizienten Transkriptionssystem (Bahn 2) am VA I-Gen gegeben wurde. In den Bahnen 1 und 2 befinden sich die Positiv- und Negativkontrolle des eingesetzten Transkriptionssystems. In Bahn 3 ist die Aktivität der Auftragsfraktion nach Ammoniumsulfatzugabe vor der Zentrifugation (A) gezeigt, in Bahn 4 die Ammoniumsulfat-versetzte Auftragsfraktion nach der Zentrifugation (Z). Es wird deutlich, dass bei einer Konzentration von 1 M Ammoniumsulfat bereits ein erheblicher Teil der TFIIC1-Aktivität ausfällt, durch die Zentrifugation abgetrennt wird und gar nicht erst auf die Säule gelangt. Im Durchbruch (BT; Bahn 5), dem 750 mM-Schritt (Bahn 6) und dem 500 mM-Schritt (Bahn 7) ist auch nach Dialyse keinerlei TFIIC1-Transkriptionsaktivität nachweisbar. Dagegen findet sich eine gewisse Transkriptionsaktivität im 250 mM-Schritt (Bahn 8) und eine sehr deutliche im 0 M-Schritt (Bahn 9).



**Abb. 8:** *Untersuchung der TFIIC1-Aktivität in den HIC-Fractionen in der in vitro-Transkription.*

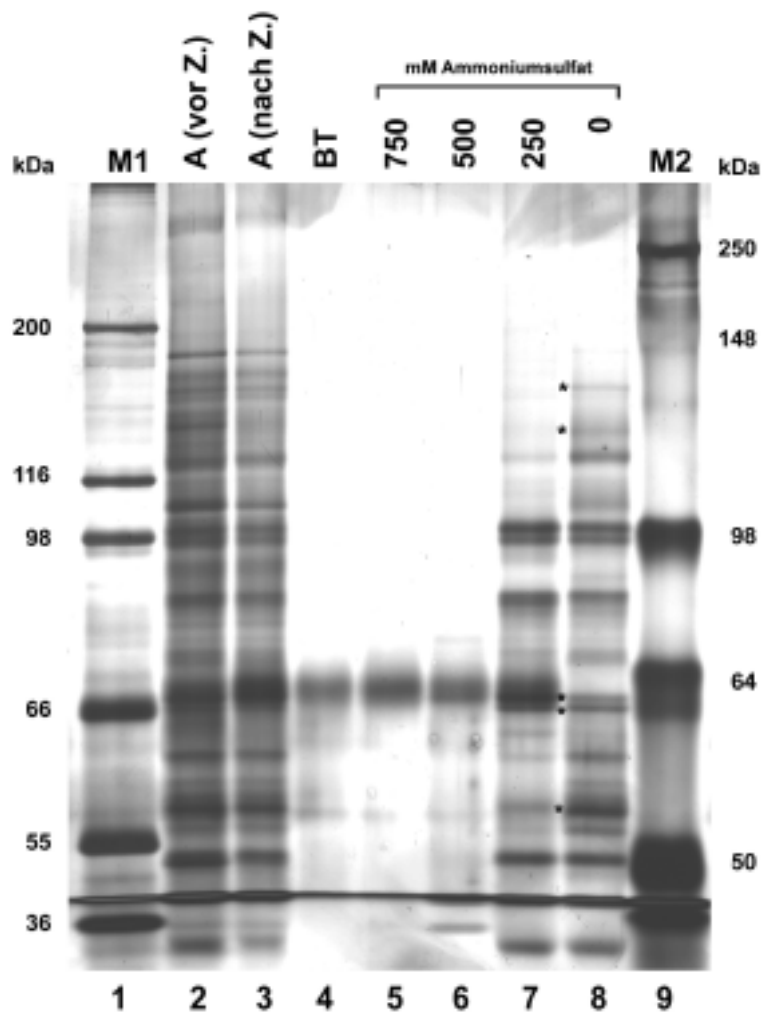
Alle Transkriptionsansätze enthielten Nukleosidtriphosphate und je 1 µg VA I-Plasmid als Matrizen-DNA. Das rekonstituierte System beinhaltete jeweils 2,5 µl ESF-TFIIB, 3 µl ESF-Polymerase III sowie 5 µl MQ-TFIIC2. Alle HIC-Fractionen wurden durch Dialyse auf 60 mM KCl gebracht.

- Bahn 1:* Positivkontrolle des TFIIC1-defizienten Transkriptionssystems  
*Bahn 2:* Negativkontrolle des TFIIC1-defizienten Transkriptionssystems  
*Bahn 3:* + 10 µl der (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-versetzten Auftragsfraktion VOR der Zentrifugation  
*Bahn 4:* + 10 µl der (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-versetzten Auftragsfraktion NACH der Zentrifugation  
*Bahn 5:* + 10 µl des Durchbruchs  
*Bahn 6:* + 10 µl des 750 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Schritts der HIC  
*Bahn 7:* + 10 µl des 500 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Schritts der HIC  
*Bahn 8:* + 10 µl des 250 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Schritts der HIC  
*Bahn 9:* + 10 µl des 0 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Schritts der HIC

Je 50 µl der HIC-Fractionen wurden anschließend auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen und nach der elektrophoretischen Auftrennung silbergefärbt (s. 3.5.12), um den Reinigungseffekt der HIC zu überprüfen (Abb. 9).

Bahn 2 zeigt die Ammoniumsulfat-versetzte MQ-TFIIC1-Fraktion vor der Zentrifugation (A (vor Z.)). Bahn 3 enthält die gleiche Fraktion nach der Zentrifugation (A (nach Z.)). Es zeigt sich eine gewisse Reduktion im Proteingehalt, was mit dem Verlust an Transkriptionsaktivität in der *in vitro*-Transkription übereinstimmt (vgl. Abb. 8, Bahn 3 und 4).

Der Durchbruch (BT; Bahn 4), der 750 mM- sowie der 500 mM-Elutionschritt (Bahn 5 und 6) enthalten so gut wie keine Proteine. Bei der deutlich hervortretenden Bande in Höhe von ca. 68 kDa handelt es sich um BSA, das zum Blocken der Dialysehütchen eingesetzt wurde.



**Abb. 9: Analyse der HIC-Fractionen im silbergefärbten SDS-Gel.**

Es wurden je 50  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Fraktion auf ein SDS/10%PAA-Gel aufgetragen. Bis auf den 0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Schritt waren alle HIC-Fractionen dialysiert. Das Gel wurde anschließend silbergefärbt (s. 3.5.12).

- Bahn 1:* 40  $\mu\text{l}$  Mark12
- Bahn 2:*  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -versetzten Auftragsfraktion VOR der Zentrifugation
- Bahn 3:*  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -versetzten Auftragsfraktion NACH der Zentrifugation
- Bahn 4:* Durchbruch der HIC
- Bahn 5:* 750 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Schritt der HIC
- Bahn 6:* 500 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Schritt der HIC
- Bahn 7:* 250 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Schritt der HIC
- Bahn 8:* 0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Schritt der HIC
- Bahn 9:* 25  $\mu\text{l}$  SeeBlue plus 2

Der 250 mM-Schritt (Bahn 7) weist bereits einen deutlich höheren Proteingehalt auf, der 0 M-Schritt (Bahn 8) schließlich enthält die meisten Proteine. Was sich im Vergleich mit nachfolgend durchgeführten Experimenten (s. 4.2.9



und 4.2.10) als sehr interessant herausstellte, ist die Tatsache, dass auch hier Proteinbanden mit einer Größe von ca. 58, 66, 68, 141 sowie 162 kDa erkennbar sind (zwischen Bahn 7 und 8 mit einem Stern markiert), die, unter Vorbehalt, mit denjenigen korrelieren, die später in Abb. 25 gefunden wurden (Abb. 9, Bahn 7 und 8; vgl. Abb. 25, Bahn 6 und 7: 43, 57, 65, 69, 140 und 164 kDa). Da aber Abb. 9, Bahn 7 und 8, den gesamten Inhalt der jeweiligen Proteinfraction bestehend aus einer Vielzahl von Proteinen zeigt, die größtenteils mit TFIIC1 in keinerlei Zusammenhang stehen, und Abb. 25 keine weiteren Hinweise auf potentielle Untereinheiten von TFIIC1 liefert, kann keine der anderen distinkten Banden in Bahn 7 und 8 mit TFIIC1 in Verbindung gebracht werden.

Für die Größenbestimmung der Polypeptide wurde der ungefärbte Marker in Bahn 1 herangezogen.

Wie das silbergefärbte SDS-Gel zeigte, war der Reinigungseffekt über die HIC-Chromatographie in dieser Form eher gering. Es wurde daher ein Versuch unternommen, die Methode zu optimieren, um eine bessere Reinigung zu erzielen.

Im Folgenden wurde dem Problem, dass bei 1 M Ammoniumsulfat zuviel TFIIC1-Aktivität ausfällt, dadurch begegnet, dass nur noch eine Konzentration von 500 mM Ammoniumsulfat gewählt wurde. Dies führte jedoch auch zu keinem Erfolg, da TFIIC1 bei 500 mM Ammoniumsulfat nicht an das Säulenmaterial band und somit in keinem Eluat nachweisbar war.

Diese Erfahrungen zeigten, dass die Hydrophobe Interaktions-Chromatographie offensichtlich für die Reinigung von TFIIC1 ungeeignet ist.

#### **4.2.4 Optimierung der Reinigungsstrategie auf Stufe der Phosphocellulose**

Bei der standardisierten Phosphocellulose-Chromatographie werden drei Elutionsschritte durchgeführt (350 mM, 600 mM und 1 M KCl), aus denen jeweils die PCB-, PCC- und PCD-Fraktion hervorgeht. Um schon vor der MonoQ-Chromatographie eine im Proteingehalt reduzierte TFIIC1-haltige Phosphocellulose-Fraktion zu präparieren, wurde zwischen die klassische PCB und

PCC ein weiterer Elutionsschritt eingeschoben, indem mit 350 mM, 450 mM und 600 mM KCl eluiert wurde.

Die aus dieser Chromatographie resultierenden und potentiell TFIIIC1-haltigen PC<sub>0,35-0,45</sub>- und PC<sub>0,45-0,6</sub>-Fraktionen wurden nacheinander unter Standardbedingungen einer MonoQ-Chromatographie unterzogen und anschließend in der *in vitro*-Transkription auf TFIIIC1-Transkriptionsaktivität untersucht. Wie sich hierbei jedoch herausstellte, wird die TFIIIC1-Aktivität aufgesplittet und befindet sich sowohl in der PC<sub>0,35-0,45</sub>-Fraktion als auch in der PC<sub>0,45-0,6</sub>-Fraktion (Daten nicht gezeigt). Bei beiden MonoQ-Chromatographien ist in der *in vitro*-Transkription sowohl die TFIIIC1- als auch die TFIIIC1-like-Aktivität bei den bekannten Salzstärken nachweisbar.

Durch die Aufspaltung der TFIIIC1-Aktivität eignet sich diese Methode nicht für die Reinigung des Faktors im größeren Maßstab und den Erhalt sehr aktiver TFIIIC1-Fraktionen.

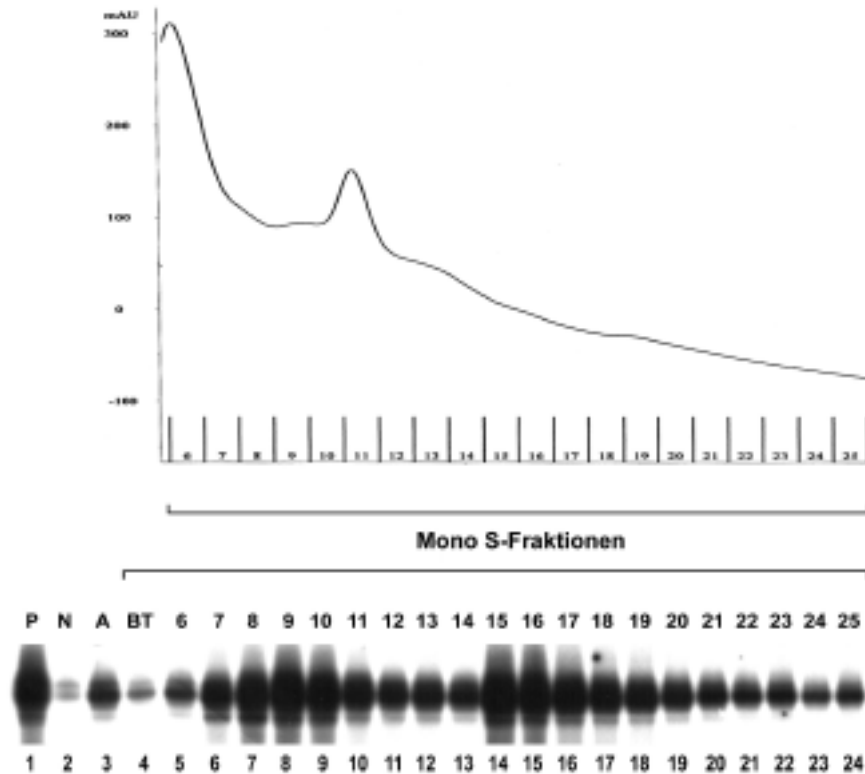
Es zeigte sich allerdings, dass mit dieser Methode die Kreuzkontamination der TFIIIC2-Fraktion (MQ aus PC<sub>0,45-0,6</sub>) mit Polymerase III verhindert wird, da diese in der PC<sub>0,35-0,45</sub> eluiert (Daten nicht gezeigt). Diese Strategie ist also für die Reinigung von TFIIIC2 durchaus interessant.

#### **4.2.5 Reinigung von TFIIIC1 über eine MonoS-Chromatographie**

Wie bereits oben erwähnt wurde (s. 4.2.1), schloss sich der MonoQ-Chromatographie im Standard-Reinigungsverfahren eine Kationenaustauscher-Chromatographie in Form eines ESF- oder ResourceS-Säulenlaufs an, der zwar (bei einer schrittweisen Elution) zu einer Konzentrierung, aber zu keiner nennenswerten Reinigung des TFIIIC1 führte. Hier bot sich ein anderes Säulenmaterial an: Das MonoS-Material als starker (d.h. mit über einen breiten pH-Bereich deprotoniert vorliegenden funktionellen Gruppen; s. 3.5.2.2), hochauflösender Kationenaustauscher besteht aus kleineren und vor allem gleichmäßigeren Partikeln als das ESF- oder ResourceS-Material, so dass auf diese Weise eine bessere Trennleistung erreicht werden kann.

Auf die MonoS-Säule wurden vereinigte und über Gelfiltration (Sephadex G25, s. 3.5.2.3) entsalzte MonoQ-TFIIIC1-Fraktionen aufgetragen, die an-

schließlich mit einem linearen Salzgradienten von 200 bis 600 mM KCl von der Säule eluiert wurden.



**Abb. 10: Analyse der MonoS-Chromatographie in der *in vitro*-Transkription.**

Alle Transkriptionsansätze enthielten Nukleosidtriphosphate und je 1 µg VA I-Plasmid als Matrizen-DNA. Das rekonstituierte System beinhaltete jeweils 10 µl PCB und 5 µl MQ-TFIIC2. Das Diagramm zeigt den Proteingehalt der MonoS-Fractionen 6 bis 25 (UV-Messung bei 280 nm während der Chromatographie).

- Bahn 1:* Positivkontrolle des TFIIC1-defizienten Transkriptionssystems
- Bahn 2:* Negativkontrolle des TFIIC1-defizienten Transkriptionssystems
- Bahn 3:* + 10 µl der Auftragsfraktion
- Bahn 4:* + 10 µl des Durchbruchs
- Bahn 5-24:* + je 5 µl der Fraktion 6 bis 25 der MonoS-Chromatographie

Anschließend wurde eine *in vitro*-Transkription mit einem TFIIC1-defizienten Transkriptionssystem am VA I-Gen durchgeführt (Abb. 10 unten). In Bahn 1 und 2 befinden sich die Positiv- bzw. Negativkontrolle (P; N) dieses Systems, wobei sich nur eine geringfügige Basalaktivität des Systems ergibt (Bahn 2). Bahn 3 zeigt die Aktivität der Auftragsfraktion (A; vereinigte, TFIIC1-haltige MonoQ-Fractionen). Der Durchbruch (BT; Bahn 4) weist eine kaum über der

Basalaktivität liegende Transkriptionsaktivität auf. Ab Fraktion 6 bis Fraktion 25 (Bahn 5 bis 24) wurde jede Fraktion des Gradienten auf TFIIIC1-Aktivität getestet.

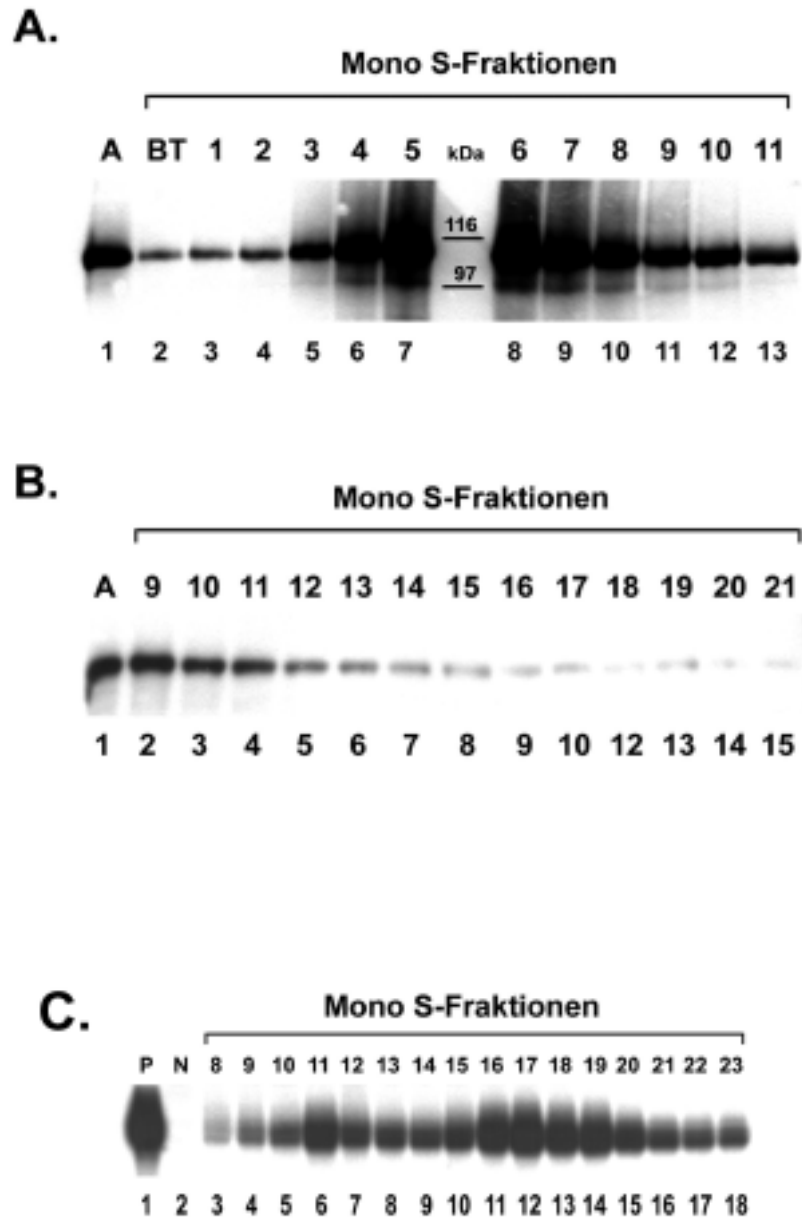
Es zeigen sich zwei auffällige Aktivitätsmaxima, wobei das eine Maximum um Fraktion 9 (Bahn 8) bei etwa 330 mM KCl auftritt, das andere um Fraktion 15 (Bahn 14) bei ca. 425 mM KCl. Das Auftreten dieser zwei Aktivitätspeaks, die möglicherweise zwei verschiedene Formen von TFIIIC1 widerspiegeln, war in allen nachfolgenden MonoS-Chromatographien reproduzierbar (Daten nicht gezeigt).

Auch hinsichtlich der Reinigungseffizienz ist die Chromatographie über MonoS ein Erfolg: Wie das Chromatogramm des MonoS-Säulenlaufs zeigt (Abb. 10 oben), eluiert der größte Anteil an Proteinen bei niedrigen Salzkonzentrationen. Besonders das zweite Maximum der TFIIIC1-Transkriptionsaktivität weist einen nur geringen Proteingehalt auf. Sehr auffällig ist auch die insgesamt sehr starke Transkriptionsaktivität dieser MS-TFIIIC1-Fractionen, besonders im Vergleich zu derjenigen des Auftrags. Der sonst häufig beobachtete Aktivitätsverlust bei weit gereinigten Fraktionen lässt sich hier nicht erkennen.

Im Gegensatz zur bisherigen Reinigung über Kationenaustauscher konnten also mit Hilfe der MonoS-Chromatographie zum einen zwei unterschiedliche Formen von TFIIIC1 voneinander getrennt werden, zum anderen ergaben sich auch nach dieser sehr weiten Reinigung äußerst transkriptionsaktive und saubere TFIIIC1-haltige Fraktionen.

#### **4.2.5.1 Untersuchungen zum Rb-Gehalt der MonoS-Fractionen**

Wie sich in früheren Experimenten herausgestellt hatte (HAERTEL, 1999), zeigt sich über alle Chromatographien der Standard-Reinigung eine auffällige Ko-elution des Retinoblastoma-Proteins (Rb) mit TFIIIC1. Auch mit Hilfe anderer Reinigungsverfahren (Ni-NTA-Agarose, Ammoniumsulfatfällung, Gelfiltration) gelang es bisher nicht, Rb und TFIIIC1 voneinander zu trennen (HAERTEL, 1999). Aus diesem Grund sollte untersucht werden, wie sich Rb über die MonoS-Chromatographie verhält.



**Abb. 11:** Überprüfung einer MonoS-Präparation auf ihren Rb-Gehalt im Western Blot sowie ihre TFIIIC1-Transkriptionsaktivität in der in vitro-Transkription.

**A. Western Blot.** Es wurden je 80 µl der jeweiligen Fraktion auf ein SDS/8%PAA-Gel aufgetragen.

Bahn 1: Auftragsfraktion

Bahn 2: Durchbruch der MonoS-Chromatographie

Bahn 3-13: Fraktion 1 bis 11 der MonoS-Chromatographie

**B. Western Blot.** Es wurden je 80 µl der jeweiligen Fraktion auf ein SDS/8%PAA-Gel aufgetragen.

Bahn 1: Auftragsfraktion

Bahn 2-15: Fraktion 9 bis 21 der MonoS-Chromatographie

**C. *in vitro*-Transkription.** Alle Transkriptionsansätze enthielten Nukleosidtriphosphate und je 1 µg VA I-Plasmid als Matrizen-DNA. Das rekonstituierte System beinhaltete jeweils 10 µl PCB und 5 µl MQ-TFIIC2.

*Bahn 1:* Positivkontrolle des TFIIC1-defizienten Transkriptionssystems  
*Bahn 2:* Negativkontrolle des TFIIC1-defizienten Transkriptionssystems  
*Bahn 3-18:* + je 5 µl der Fraktion 8 bis 23 der MonoS-Chromatographie

Abb. 11 A zeigt einen Western Blot mit Antikörpern gegen alle Phosphorylierungsstufen von Rb; aufgetragen wurde eine weitere MonoS-Präparation. Bahn 1 zeigt den Auftrag (A), Bahn 2 den Durchbruch (BT), Bahn 3 bis 13 die vorderen Fraktionen des MonoS-Säulenlaufs (Fraktion 1 bis 11).

Abb. 11 B zeigt ebenfalls einen Western Blot gegen Rb. Hier wurden die hinteren Fraktionen der gleichen Präparation aufgetragen. In Bahn 1 befindet sich noch einmal der Auftrag (A), in Bahn 2 bis 15 die Fraktionen 9 bis 21 des MonoS-Säulenlaufs.

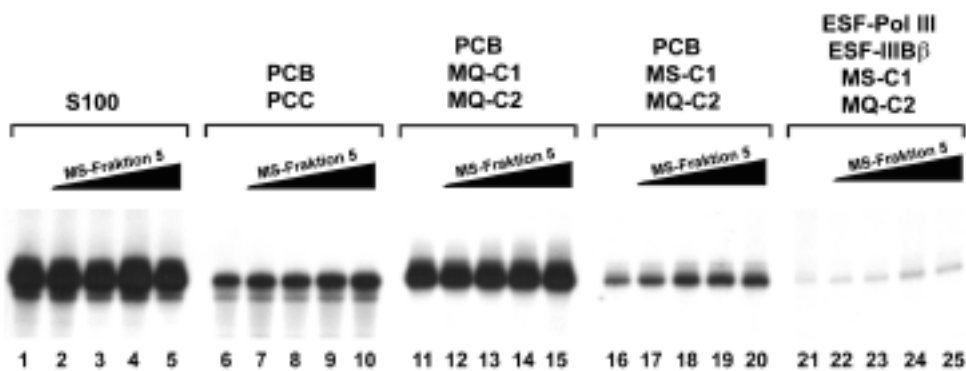
Der erste Transkriptionsspeak dieser Präparation befand sich in Fraktion 11 bei 340 mM KCl (Abb. 11 C, Bahn 6), der zweite in Fraktion 17 bei 445 mM KCl (Abb. 11 C, Bahn 12). Abbildung 11 A und B belegt, dass Rb über die MonoS-Chromatographie weitestgehend von den TFIIC1-haltigen Fraktionen abgetrennt werden kann, da Rb schon bei etwa 250 mM KCl eluiert und sich damit hauptsächlich in den sehr frühen Fraktionen (Fraktion 4 bis 8, Abb. 11 A, Bahn 6 bis 9) befindet. Abb. 11 B lässt eine gewisse Rb-Kontamination in der transkriptionsaktiven Fraktion 11 erkennen, während Fraktion 17 annähernd Rb-frei ist. Eventuell lassen sich Rb und TFIIC1 durch eine Stufen-Elution noch besser voneinander trennen.

#### **4.2.5.2 Überprüfung des Effektes bei Zugabe einer Rb-haltigen Fraktion zu einem aktiven *in vitro*-Transkriptionssystem**

Die Tatsache, dass die TFIIC1-haltigen MonoS-Fraktionen eine überraschend hohe Transkriptionsaktivität aufweisen, könnte die Abtrennung von Rb zur Ursache haben. Daher sollte überprüft werden, ob die nachträgliche Zugabe einer Rb-haltigen Fraktion zu einem aktiven Transkriptionssystem eine Verminderung der Transkriptionsaktivität zur Folge hat.

Abb. 12 zeigt fünf Transkriptionssysteme unterschiedlicher Reinigungsstufe und Zusammensetzung:

- Block 1: S100-Extrakt (Bahn 1 bis 5)
- Block 2: PCB / PCC (Bahn 6 bis 10)
- Block 3: PCB / MQ-TFIIC1 / MQ-TFIIC2 (Bahn 11 bis 15)
- Block 4: PCB / MS-TFIIC1 (Fraktion 17, 2. Peak, s. Abb. 11 C) / MQ-TFIIC2 (Bahn 16 bis 20)
- Block 5: ESF-Pol III / ESF-TFIIB -Fraktion / MS-TFIIC1 (s.o.) / MQ-TFIIC2 (Bahn 21 bis 25).



**Abb. 12:** Überprüfung des Effektes bei Zugabe einer Rb-haltigen Fraktion zu aktiven Transkriptionssystemen verschiedener Reinigungsebenen.

Alle Transkriptionsansätze enthielten Nukleosidtriphosphate und je 1 µg VA I-Plasmid als Matrizen-DNA. Folgende Proteinmische wurden eingesetzt:

*PM 1:* 5 µl S100 (Zellextrakt) / *PM 2:* 10 µl PCB, 20 µl PCC / *PM 3:* 10 µl PCB, 5 µl MQ-TFIIC2, 10 µl MQ-TFIIC1 / *PM 4:* 10 µl PCB, 5 µl MQ-TFIIC2, 5 µl MS-TFIIC1 / *PM 5:* 1,4 µl ESF-Polymerase III, 2 µl ESF-TFIIB, 5 µl MQ-TFIIC2, 5 µl MS-TFIIC1.

*Bahn 1, 6, 11, 16, 21:* Basisaktivität des PM 1, PM 2, PM 3, PM 4, PM 5  
*Bahn 2-5, 7-10, 12-15, 17-20, 22-25:* + je 2,5 / 5 / 7,5 / 15 µl der Rb-haltigen MS-Fr. 5

Die jeweils erste Probe (Bahn 1, 6, 11, 16 und 21) zeigt die Grundaktivität der Transkriptionssysteme ohne die Zugabe einer Rb-haltigen Fraktion.

In den jeweils folgenden vier Bahnen wurden 2,5 µl / 5 µl / 7,5 µl / 15 µl der Rb-haltigen Fraktion 5 der ersten MonoS-Präparation (s. Abb. 11 A) zugegeben (Bahn 2-5, 7-10, 12-15, 17-20 und 22-25).

In allen fünf Systemen kommt es keinesfalls zu einer Inhibition der Transkription durch die Zugabe der Rb-haltigen Fraktion. Im Gegenteil, bis auf den S100-Extrakt ist in allen Systemen sogar eine leichte Stimulation zu be-

obachten (Bahn 6 bis 25). Die ausgeprägte Transkriptionsaktivität der MonoS-TFIIC1-Fractionen wird also nicht durch die Abtrennung von Rb verursacht. Möglicherweise wurde ein anderer Inhibitor über die MonoS-Chromatographie von den TFIIC1-Fractionen abgetrennt, der auch nicht in der Rb-haltigen Fraktion 5 enthalten ist.

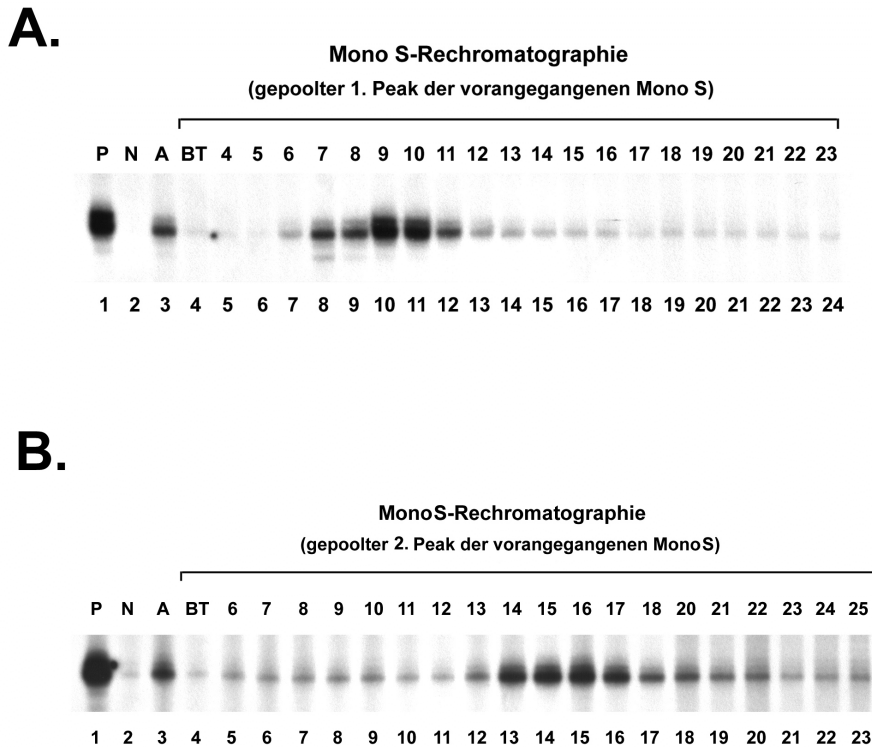
#### **4.2.5.3 Untersuchung der beiden Aktivitätspeaks der MonoS-Chromatographie**

Für das Auftreten der beiden Aktivitätsmaxima kann es verschiedene Ursachen geben: Zum einen könnte es sich um unterschiedlich modifizierte Formen von TFIIC1 handeln (z.B. ein unterschiedlicher Grad an Phosphorylierungen, Acetylierungen oder Methylierungen), zum anderen könnte eine Assoziation mit anderen Proteinen das unterschiedliche chromatographische Verhalten hervorrufen. Auch die Anreicherung eines Inhibitors in den Fraktionen zwischen den beiden vermeintlichen Aktivitätsmaxima ist möglich. Selbst ein technisches Problem wie das Überladen der Säule ist letztlich nicht auszuschließen, so dass es zu keiner wirklichen Auftrennung der Proteine kommt. Um diese möglichen Ursachen zu überprüfen, wurden die beiden Aktivitätsmaxima einzeln über die MonoS-Säule rechromatographiert.

Die Fraktionen des transkriptionsaktiven ersten Peaks der MonoS-Chromatographie (Abb. 10, Fraktion 6 bis 12) wurden vereinigt, mit KCl-freiem Tris-Puffer auf ca. 200 mM KCl verdünnt und erneut auf die MonoS aufgetragen. Eluiert wurde, wie schon bei der ersten MonoS-Chromatographie, mit einem linearen Salzgradienten von 200 bis 600 mM KCl.

Die Fraktionen des transkriptionsaktiven zweiten Peaks der MonoS-Chromatographie (Abb. 10, Fraktion 15 bis 21) wurden ebenfalls vereinigt und auf etwa 200 mM KCl verdünnt, bevor sie ein zweites Mal auf die MonoS-Säule aufgetragen und mit einem linearen Gradienten von 200 bis 600 mM KCl eluiert wurden.





**Abb. 13:** *Analyse der MonoS-Rechromatographie beider Aktivitätsmaxima in der in vitro-Transkription.*

Alle Transkriptionsansätze enthielten Nukleosidtriphosphate und je 1 µg VA I-Plasmid als Matrizen-DNA. Das rekonstituierte System beinhaltete jeweils 10 µl PCB und 5 µl MQ-TFIIC2.

**A. *In vitro*-Transkription** des ersten, über MonoS rechromatographierten Peaks.

- Bahn 1:* Positivkontrolle des TFIIC1-defizienten Transkriptionssystems  
*Bahn 2:* Negativkontrolle des TFIIC1-defizienten Transkriptionssystems  
*Bahn 3:* + 10 µl der Auftragsfraktion  
*Bahn 4:* + 10 µl des Durchbruchs  
*Bahn 5-24:* + je 5 µl der Fraktion 4 bis 23 der MonoS-Rechromatographie

**B. *In vitro*-Transkription** des zweiten, über MonoS rechromatographierten Peaks.

- Bahn 1:* Positivkontrolle des TFIIC1-defizienten Transkriptionssystems  
*Bahn 2:* Negativkontrolle des TFIIC1-defizienten Transkriptionssystems  
*Bahn 3:* + 10 µl der Auftragsfraktion  
*Bahn 4:* + 10 µl des Durchbruchs  
*Bahn 5-24:* + je 5 µl der Fraktion 6 bis 25 der MonoS-Chromatographie

Abb. 13 A zeigt die anschließende *in vitro*-Transkription mit den Fraktionen des rechromatographierten ersten Aktivitätspeaks der vorangegangenen MonoS-Chromatographie. Als Rekonstitutionssystem wurde ein TFIIC1-defizientes Transkriptionssystem eingesetzt. Bahn 1 zeigt die Positivkontrolle,

Bahn 2 die Negativkontrolle, die keinerlei Basalaktivität aufweist. In Bahn 3 wurde der Auftrag (A), in Bahn 4 der Durchbruch (BT) und in Bahn 5 bis 24 die Fraktionen 4 bis 23 der MonoS-Rechromatographie auf TFIIC1-Aktivität untersucht. Es findet sich ausschließlich Transkriptionsaktivität in den Fraktionen 7 bis 11 mit dem Maximum in Fraktion 9 bei 330 mM KCl. Es tritt kein zweites Aktivitätsmaximum im Bereich um 430 mM KCl auf (Fraktion 16).

In Abb. 13 B ist die *in vitro*-Transkription mit den Fraktionen des über MonoS rechromatographierten zweiten Aktivitätspeak dargestellt. Die Bahnen 1 und 2 zeigen die Positiv- bzw. Negativkontrolle des Transkriptionssystems (P; N), Bahn 3 den Auftrag (A), Bahn 4 den Durchbruch (BT). In Bahn 5 bis 24 sind die Fraktionen 6 bis 25 der Rechromatographie gezeigt und in Fraktion 14 bis 17 (Bahn 13 bis 16, zwischen 420 und 470 mM KCl) ist ein deutlicher Transkriptionspeak erkennbar. Das Maximum liegt in Fraktion 16 (Bahn 15) bei etwa 450 mM KCl. Hier findet sich jedoch auch in den Fraktionen 7 bis 10 (im Bereich von ca. 330 mM KCl) eine schwache Transkriptionsaktivität. Dies kann zum einen durch eine Überlagerung der Aktivität des ersten Peaks (aufgrund seiner Elution über einen relativ breiten Bereich) verursacht sein oder andererseits durch eine Modifikation der TFIIC1-Transkriptionsaktivität, durch die Teile der einen Form (die des zweiten Peaks) in die andere Form (die des ersten Peaks) überführt werden.

#### **4.2.6 Weitere Reinigung von TFIIC1 mittels Rechromatographie über MonoQ**

Die Fraktionen des zweiten Aktivitätsmaximums (Abb. 10, Fraktion 15 bis 17) wiesen einen weitaus geringeren Proteingehalt auf, als jede gereinigte TFIIC1-Fraktion zuvor. Es bot sich daher eine Rechromatographie über die hochauflösende MonoQ-Säule an, da einerseits durch den weitaus geringeren Proteingehalt des Auftrags eine bessere Trennung der enthaltenen Proteine möglich ist, andererseits wurden bei den vorangegangenen Chromatographien eventuell Interaktionspartner von TFIIC1 abgetrennt, was zu einem geänderten chromatographischen Verhalten des Faktors führen könnte.

Letztlich besteht nach einer so weiten Reinigung ebenfalls die Aussicht auf die Identifizierung einzelner Untereinheiten von TFIIC1.

Die TFIIC1-haltigen Fraktionen des zweiten Peaks einer MonoS-Präparation (400 – 460 mM KCl) wurden mit KCl-freiem Tris-Puffer auf etwa 150 mM KCl verdünnt und auf eine 1 ml-MonoQ-Säule aufgetragen. Es wurde eine Vorelu-tion mit 200 mM KCl durchgeführt, anschließend wurde mit einem linearen Salzgradienten von 200 bis 300 mM KCl eluiert.

Die Überprüfung der Transkriptionsaktivität erfolgte in der *in vitro*-Transkrip-tion: Bahn 1 bis 6 in Abb. 14 A zeigen die Aktivität der Fraktionen 9 bis 14, wobei ein deutliches Maximum in Fraktion 12 erkennbar ist. Die Fraktionen 11 bis 13 eluierten bei einer Salzstärke von 255 bis 265 mM KCl, was exakt dem bekannten Elutionsverhalten von TFIIC1 über die MonoQ entspricht.



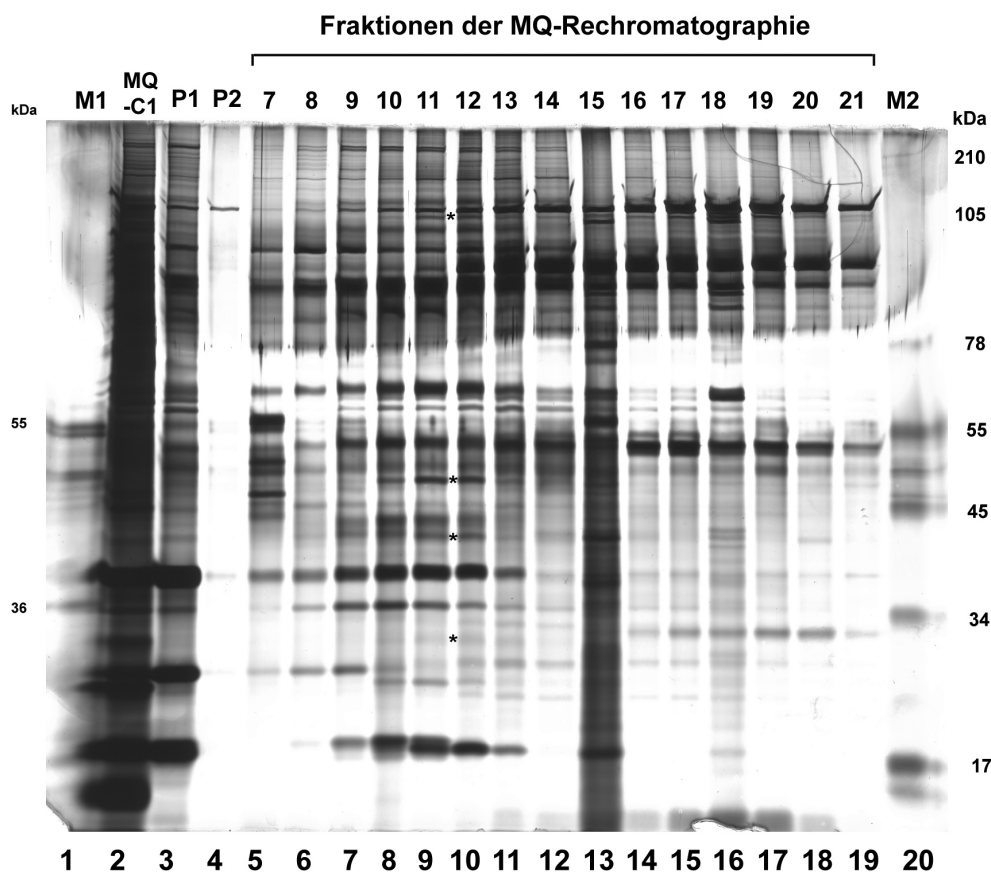
**Abb. 14:** Analyse eines über MonoQ rechromatographierten zweiten Peaks einer MS-TFIIC1-Präparation in der *in vitro*-Transkription sowie in einem silbergefärbten SDS-Gel.

**A. *In vitro*-Transkription.** Alle Transkriptionsansätze enthielten Nukleosidtriphosphate und je 0,8 µg VA I-Plasmid als Matrizen-DNA. Das konstituierte System beinhaltete jeweils 3 µl ESF-Polymerase III, 1,5 µl MS-TFIIB und 5 µl MQ-TFIIC2.

Bahn 1-6: + je 10 µl der Fraktion 9 bis 14 der MonoQ-Rechromatographie

Abb. 14 B zeigt ein silbergefärbtes SDS-Gel (hergestellt mit ProSieve® 50 Gellösung), das mit einem Tris/Tricine-haltigen Puffer elektrophoretisch aufgetrennt wurde und sich daher wie ein Gradientengel verhält. In Bahn 5 bis 19 wurden die Fraktionen 7 bis 21 der MonoQ-Rechromatographie aufgetragen, in Bahn 2 eine MonoQ-TFIIC1-Fraktion, in Bahn 3 und 4 jeweils eine Fraktion des ersten bzw. zweiten Peaks der MonoS-Chromatographie. Vor Auftrag auf das 8%ige Polyacrylamidgel wurden die 1 ml-Fractionen der MonoQ-Rechromatographie mit Hilfe von StrataClean Resin (s. 3.5.10) auf ein Volumen von ca. 80 µl gebracht.

B.



**B. Silbergefärbtes SDS-Gel.** Bevor die jeweiligen MQ-Fractionen auf ein SDS/8%PAA-Gel aufgetragen wurden, wurden sie mit Hilfe von StrataClean Resin auf ein Volumen von 100  $\mu$ l gebracht. Der Laufpuffer enthielt Tris/Tricine. Das Gel wurde nach der Elektrophorese silbergefärbt.

- Bahn 1:* 40  $\mu$ l Mark12  
*Bahn 2:* + 30  $\mu$ l einer MQ-TFIIIC1-Fraktion  
*Bahn 3:* + 50  $\mu$ l des ersten Peaks einer MS-TFIIIC1-Präparation  
*Bahn 4:* + 50  $\mu$ l des zweiten Peaks einer MS-TFIIIC1-Präparation  
*Bahn 5-19:* Fraktionen 7 bis 21 der MQ-Rechromatographie  
*Bahn 20:* 25  $\mu$ l SeeBlue plus 2

Da es sich um eine gesamte Proteinfraction handelt, ist eine Vielzahl von Proteinbanden erkennbar, so dass keine einzelnen Polypeptide eindeutig mit TFIIIC1 in Verbindung gebracht werden konnten. Aus der Rückschau der Ergebnisse (s. 4.2.10, Tabelle) erscheinen allerdings diejenigen Proteinbanden, die mit einem Stern markiert sind, als sehr interessante Kandidaten für Polypeptide, die mit TFIIIC1 in Zusammenhang stehen. Bei den markierten Proteinbanden (zwischen Bahn 9 und 10) handelt es sich um Polypeptide mit einer Größe von ca. 105 kDa, 48 kDa, 41 kDa und 31 kDa. Diese Polypeptide

befinden sich vor allem in den transkriptionsaktiven Fraktionen 11 und 12. Leider sind die Banden des ungefärbten Markers, die normalerweise wesentlich schärfer und damit präziser sind, auf diesem Gel schlecht oder gar nicht erkennbar (Bahn 1), so dass für die Größenangaben der Polypeptide die Markerbanden des vorgefärbten Markers herangezogen werden mussten. Die Größenangaben aus diesem silbergefärbten SDS-Gel sind also nur bedingt mit denjenigen aus anderen SDS-Gelen vergleichbar.

Mit der Chromatographie über MonoS und einer nachfolgenden MonoQ-Rechromatographie ist es gelungen, eine TFIIC1-Fraktion so weit zu reinigen, dass eine Zuordnung von TFIIC1-Untereinheiten auf einem silbergefärbten SDS-Gel möglich erscheint.

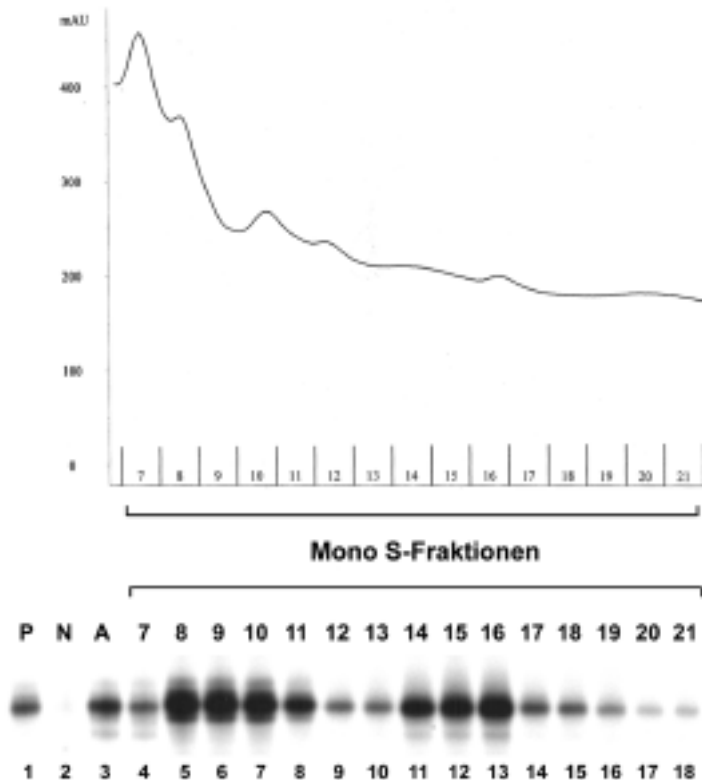
#### **4.2.7 Reinigung des Transkriptionsfaktors IIC1-like über MonoS-Chromatographie**

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, enthält die aus der MonoQ-Chromatographie resultierende TFIIC0-Fraktion eine dem Transkriptionsfaktor IIC1 funktionell gleiche Aktivität, die als TFIIC1-like bezeichnet wird. Da die MQ-TFIIC0-Fraktion verglichen mit der MQ-TFIIC1-Fraktion weniger Gesamtprotein enthält, bietet sie günstigere Ausgangsbedingungen für die nachfolgenden Chromatographien. Weiterhin können Informationen über Aufbau und Funktion von TFIIC1-like möglicherweise Hinweise auf TFIIC1 geben. Da TFIIC1 und TFIIC1-like in ihrer Funktion austauschbar sind, ist es denkbar, dass beide Aktivitäten gemeinsame Polypeptide besitzen.

Es sollte also untersucht werden, ob TFIIC1-like das gleiche chromatographische Verhalten über die MonoS-Säule aufweist wie TFIIC1 oder ob sich dieser Faktor anders verhält. Hierfür wurde eine MonoQ-TFIIC0-Fraktion unverdünnt auf die MonoS aufgetragen, da diese Fraktion nach der MonoQ-Chromatographie einen Salzgehalt von nur etwa 160 mM KCl hat. Es wurde eine Vorelution bis 200 mM KCl durchgeführt. Wie bei der MonoS-Chromatographie mit TFIIC1 wurde anschließend mit einem linearen Salzgradienten von 200 bis 600 mM KCl eluiert.

#### 4.2.7.1 Identifizierung *TFIIIC1-like*-haltiger MonoS-Fractionen in der *in vitro*-Transkription

TFIIIC1-like lässt sich, ebenso wie TFIIIC1, mit Hilfe eines TFIIIC1-defizienten Systems in der *in vitro*-Transkription nachweisen.



**Abb. 15:** Analyse der MonoS-Chromatographie mit *TFIIIC1-like* in der *in vitro*-Transkription.

Alle Transkriptionsansätze enthielten Nukleosidtriphosphate und je 0,5 µg VA I-Plasmid als Matrizen-DNA. Das konstituierte System beinhaltete jeweils 2 µl MS-TFIIIB, 1 µl ss-Polymerase III sowie 5 µl MQ-TFIIIC2.

- Bahn 1:* Positivkontrolle des TFIIIC1-defizienten Transkriptionssystems  
*Bahn 2:* Negativkontrolle des TFIIIC1-defizienten Transkriptionssystems  
*Bahn 3:* + 10 µl der Auftragsfraktion  
*Bahn 4-18:* + je 5 µl der Fraktion 7 bis 21 der MonoS-Chromatographie

Abb. 15 (unten) zeigt in Bahn 1 und 2 die Positiv- bzw. Negativ-Kontrolle des Systems, in Bahn 3 die Aktivität des Auftrags und in Bahn 4 bis 18 die Fraktionen 7 bis 21 der MonoS-Chromatographie.

Interessanterweise treten hier, ebenso wie bei der Chromatographie der TFIIIC1-Fraktion, zwei deutliche Aktivitätsspeaks auf: Der erste um Fraktion 8

und 9 bei etwa 330 mM KCl (Bahn 5 und 6), der zweite in Fraktion 15 und 16 bei etwa 480 mM KCl (Bahn 12 und 13).

Auch hier eluiert ein Großteil der Proteine vor den beiden TFIIIC1-like-Aktivitätspeaks, wodurch ein beachtlicher Reinigungseffekt, besonders im Bereich des zweiten Aktivitätsmaximums, erreicht werden kann (s. Chromatogramm, Abb. 15, oben).

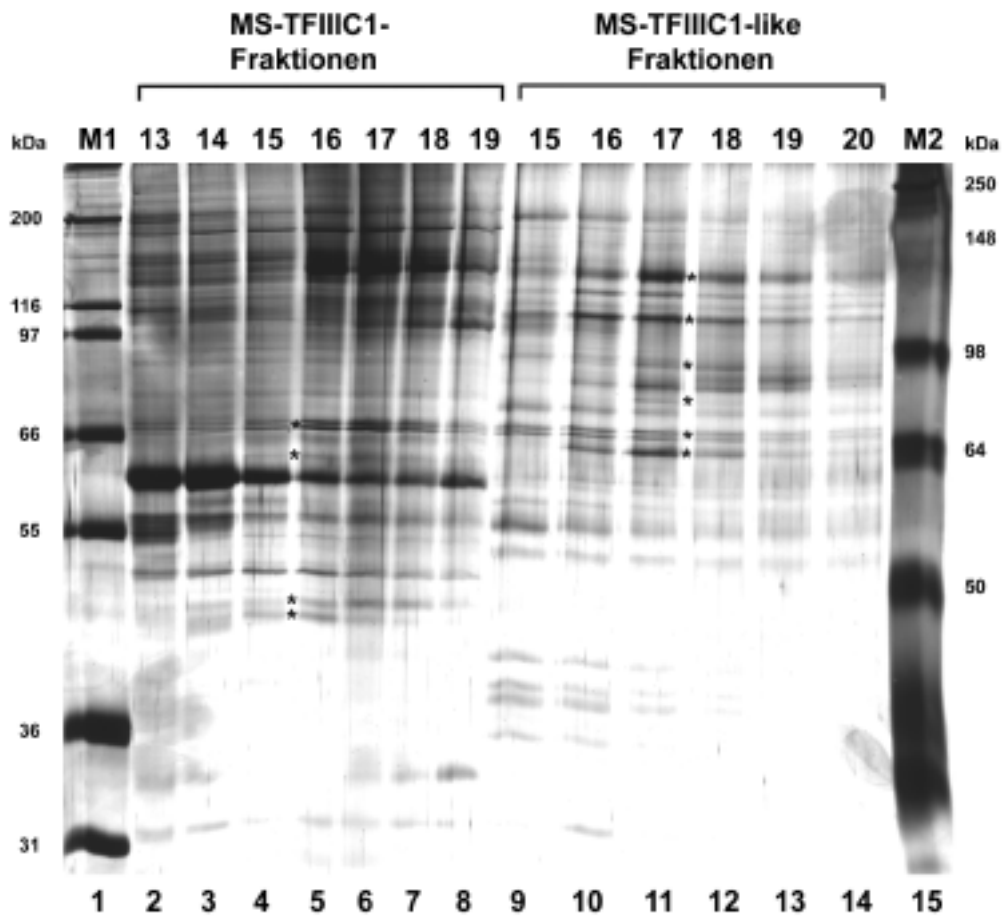
#### **4.2.7.2 SDS-PAGE mit MS-TFIIIC1- und MS-TFIIIC1-like-Fraktionen und Analyse nach der Silberfärbung**

Um einen direkten Vergleich der TFIIIC1- und der TFIIIC1-like-haltigen Fraktionen zu haben, wurden Fraktionen des jeweils zweiten Peaks einer MS-TFIIIC1- bzw. MS-TFIIIC1-like-Präparation auf ein SDS-Gel aufgetragen und nach der elektrophoretischen Auftrennung silbergefärbt (Abb. 16).

Bahn 2 bis 8 zeigt die Fraktionen 13 bis 19 der MS-TFIIIC1-Chromatographie, Bahn 9 bis 14 die Fraktionen 15 bis 20 der MS-TFIIIC1-like-Chromatographie. Von den TFIIIC1-like-Fraktionen wurden je 200 µl aufgetragen, von den TFIIIC1-Fraktionen nur je 50 µl. Selbst die vierfache Menge des zweiten Peaks von TFIIIC1-like erreicht nicht den Proteingehalt des zweiten Peaks von TFIIIC1.

Auch auf diesem Gel lassen sich Polypeptide erkennen (mit Sternen markiert, zwischen Bahn 4 und 5 sowie zwischen Bahn 11 und 12), die hauptsächlich in denjenigen Fraktionen erscheinen, die die TFIIIC1- bzw. TFIIIC1-like Transkriptionsaktivität enthalten (TFIIIC1-Aktivität in Fraktion 15 bis 17 mit dem Maximum in Fraktion 16; TFIIIC1-like-Aktivität in Fraktion 16 bis 19 mit dem Maximum in Fraktion 17 und 18; Daten nicht gezeigt).

Bei den MS-TFIIIC1-Fraktionen treten Polypeptide mit ca. 46, 47, 64, 68 und 70 kDa Größe auf; die 68 und 70 kDa-Polypeptide sind allerdings auch schon in Fraktion 13 und 14, (Bahn 2 und 3) und auch noch in Fraktion 18 und 19 (Bahn 7 und 8) zu sehen, lassen aber in den transkriptionsaktiven Fraktionen 15, 16 und 17 (Bahn 4 bis 6) eine deutlich höhere Konzentration erkennen. Im höhermolekularen Bereich sind insgesamt sehr viele Proteine zu sehen, so dass die Detektion einer Bande, die mit der Transkriptionsaktivität korreliert, nicht eindeutig möglich ist.



**Abb. 16:** Vergleichende Analyse der MS-TFIIC1- und der MS-TFIIC1-like-Chromatographien im silbergefärbten SDS-Gel.

Es wurden je 50  $\mu$ l der MS-TFIIC1-Fractionen sowie 200  $\mu$ l der MS-TFIIC1-like-Fractionen auf ein SDS/8%PAA-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend silbergefärbt.

- Bahn 1:* 40  $\mu$ l Mark12  
*Bahn 2-8:* MS-TFIIC1-Fractionen 13 bis 19  
*Bahn 9-14:* MS-TFIIC1-like-Fractionen 15 bis 20  
*Bahn 15:* 25  $\mu$ l SeeBlue plus 2

Bei den TFIIC1-like-haltigen MonoS-Fractionen zeigten sich Polypeptide mit etwa 65, 68, 70, 74, 88, 108 und 141 kDa Größe. Hier sind die 68 und 70 kDa-Polypeptide allerdings bereits in der kaum transkriptionsaktiven Fraktion 15 (Bahn 9) gut sichtbar, während sie in der sehr aktiven Fraktion 18 (Bahn 12) eher schwach ausgeprägt sind. Das 65 kDa-Polypeptid korreliert dagegen deutlicher mit der Transkriptionsaktivität (Fraktion 16 bis 19, Bahn 10 bis 13).



Auch das 88 kDa-Polypeptid weist ein ähnliches Elutionsverhalten wie die Transkriptionsaktivität auf.

Leider tritt bei diesem Gel ein technisches Problem auf: Bei den relativ viel Gesamtprotein enthaltenden MS-TFIIC1-Fraktionen sind im oberen Bereich durch die vielen Proteinbanden einzelne Polypeptide, die mit der Transkriptionsaktivität korrelieren, äußerst schwer detektierbar, während in den MS-TFIIC1-like-Fraktionen, die sehr viel weniger Proteine enthalten, einzelne Polypeptide im unteren Bereich aufgrund der Unschärfe im Gel kaum erkennbar sind. Hierdurch ergeben sich nur wenige, in der Größe vergleichbare Polypeptide, die zu TFIIC1 bzw. TFIIC1-like gehören könnten.

Aber auch dieses Gel demonstriert, dass auf Stufe der MonoS bereits ein sehr guter Reinigungserfolg erzielt werden konnte, so dass einzelne Polypeptide mit der Transkriptionsaktivität verglichen werden können. Um eine noch bessere Reinigung zu erreichen, sollte auch mit dem zweiten Peak des MS-TFIIC1-like eine MonoQ-Rechromatographie durchgeführt werden.

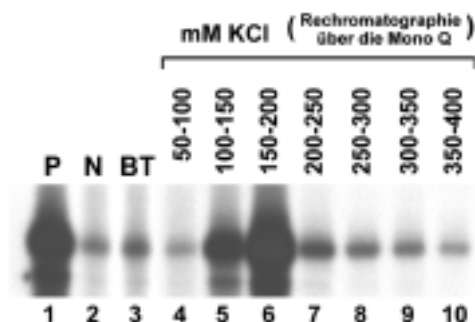
#### **4.2.8 Weitere Reinigung von TFIIC1-like mittels Rechromatographie über MonoQ**

Zwei Versuche, TFIIC1-like mittels linearem Salzgradienten (wie bei der Reinigung von TFIIC1 über MonoQ-Rechromatographie) zu eluieren, führten zu keinem Erfolg, da die TFIIC1-like-Aktivität im Gradienten nicht eindeutig zu detektieren war. Also wurde beim nächsten Versuch zur schrittweisen Elution übergegangen.

Aufgetragen wurde auch hier der proteinärmere, zweite Aktivitätspeak (s. Abb. 15, oben) aus der TFIIC1-like-MonoS-Präparation. Es wurden die Fraktionen 14 bis 17 (s. Abb. 15, unten, Bahn 11 bis 14) vereinigt und mit KCl-freiem Tris-Puffer auf ca. 50 mM KCl verdünnt. Nach dem Waschen der Säule wurde mit 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM, 350 mM und 400 mM KCl schrittweise eluiert.

Im TFIIC1-defizienten Transkriptionssystem wurden diese Fraktionen anschließend auf TFIIC1-like-Aktivität untersucht. Abb. 17 zeigt in Bahn 1 und 2 die Positiv- und Negativkontrolle des Systems, bei dem sich eine geringfügige

Grundaktivität herausstellt. Der Durchbruch (BT; Bahn 3) scheint Spuren von TFIIC1-like zu enthalten, seine Aktivität liegt etwas über der der Negativkontrolle.



**Abb. 17:**

**Analyse eines über MonoQ rechromatographierten zweiten Peaks einer MS-TFIIC1-like-Präparation in der in vitro-Transkription.**

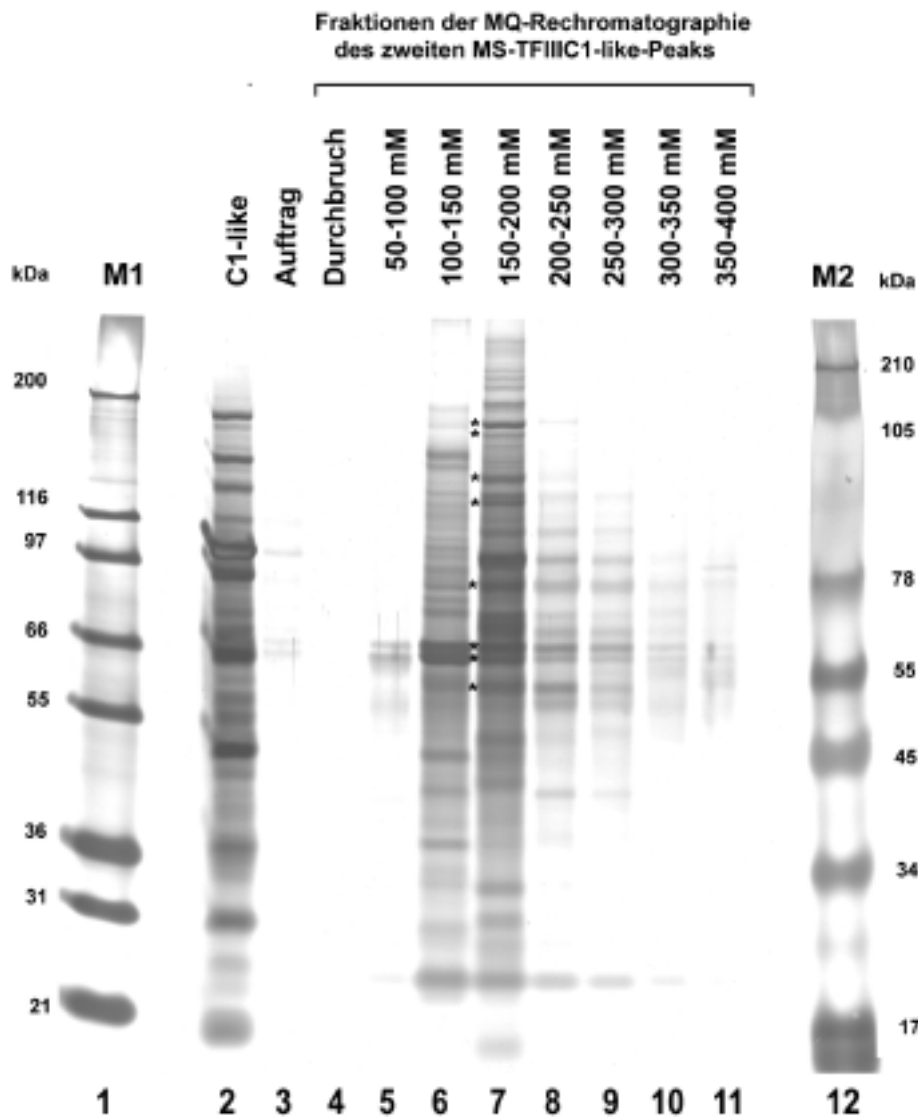
Alle Transkriptionsansätze enthielten Nucleosidtriphosphate und je 0,5 µg VA I-Plasmid als Matrizen-DNA. Das konstituierte System beinhaltet jeweils 1 µl ss-Polymerase III, 3 µl ESF-TFIIB und 5 µl MQ-TFIIC2.

- Bahn 1:* Positivkontrolle des TFIIC1-defizienten Transkriptionssystems  
*Bahn 2:* Negativkontrolle des TFIIC1-defizienten Transkriptionssystems  
*Bahn 3:* + 10 µl des Durchbruchs  
*Bahn 4-10:* + je 10 µl des 50-100 / 100-150 / 150-200 / 200-250 / 250-300 / 300-350 / 350-400-mM KCl-Schritt der MQ-Rechromatographie

Vergleicht man die einzelnen Elutionsschritte, so wird deutlich, dass bei 150 mM KCl bereits ein beachtlicher Teil der TFIIC1-like-Aktivität von der Säule gelöst wird (Bahn 5). Der 200 mM-Schritt enthält den Großteil an TFIIC1-like und weist eine sehr gute Transkriptionsaktivität auf (Bahn 6), während im 250 mM-Schritt (Bahn 7) nur noch eine sehr geringe und in den folgenden Elutionsschritten keine Aktivität detektierbar ist (Bahn 8 bis 10).

#### **4.2.8.1 Analyse der rechromatographierten MonoQ-TFIIC1-like-Fractionen über SDS-PAGE**

In Abb. 18, Bahn 2, wurde zum Vergleich der Banden eine TFIIC1-like-Präparation aufgetragen, die mit einem 450 bis 600 mM-Schritt von einer ESF-Säule eluiert worden war. Bahn 3 zeigt den Auftrag auf die MonoQ (MS-TFIIC1-like, 2. Peak, verdünnt) und Bahn 4 den Durchbruch. In den Bahnen 5 bis 11 wurden die sieben Elutionsschritte der MonoQ-Rechromatographie aufgetragen, die allerdings vor Auftrag auf das 8 %ige Polyacrylamidgel mit Hilfe der StrataClean Resin-Methode auf ein Volumen von ca. 100 µl gebracht werden mussten.



**Abb. 18:** Analyse des über MonoQ rechromatographierten zweiten Peaks der MS-TFIIC1-like-Präparation im silbergefärbten SDS-Gel.

Bevor die rechromatographierten MQ-TFIIC1-Fractionen auf ein SDS/8%PAA-Gel aufgetragen wurden, wurden sie mit Hilfe von StrataClean Resin auf ein Volumen von 100  $\mu$ l gebracht. Der Laufpuffer enthielt Tris/Tricine. Nach der elektrophoretischen Trennung wurde das Gel silbergefärbt.

*Bahn 1:* 30  $\mu$ l Mark12

*Bahn 2:* 100  $\mu$ l einer MQ-TFIIC1-like Präparation

*Bahn 3:* 100  $\mu$ l der Auftragsfraktion

*Bahn 4:* 100  $\mu$ l des Durchbruchs

*Bahn 5-11:* 50-100 / 100-150 / 150-200 / 200-250 / 250-300 / 300-350 / 350-400-mM KCl-Schritt der MQ-Rechromatographie

*Bahn 12:* 30  $\mu$ l SeeBlue plus 2

Leider verhält sich die TFIIIC1-like-Transkriptionsaktivität genauso wie der größte Teil der restlichen, in der Auftragsfraktion enthaltenen Proteine und eluiert hauptsächlich im 150-200 mM-Schritt. Zum einen ist dadurch kein besonders guter, zusätzlicher Reinigungseffekt erreicht worden, zum anderen ist eine eindeutige Zuordnung einzelner Polypeptide zu TFIIIC1-like relativ schwierig. Es sind acht Polypeptide erkennbar, die möglicherweise mit TFIIIC1-like in Zusammenhang stehen und eine Größe von etwa 58, 65, 66, 86, 123, 141, 165 und 177 kDa besitzen.

Möglicherweise kann diese Chromatographie durch feinere Elutionsschritte optimiert werden, so dass aufgrund der Daten aus der *in vitro*-Transkription eine bessere Zuordnung möglicher Untereinheiten zu TFIIIC1-like im SDS-Gel getroffen werden kann.

#### **4.2.9 *In vitro*-Biotinylierung von TFIIIB $\beta$ -, TFIIIC2- und TFIIIC1-haltigen Fraktionen**

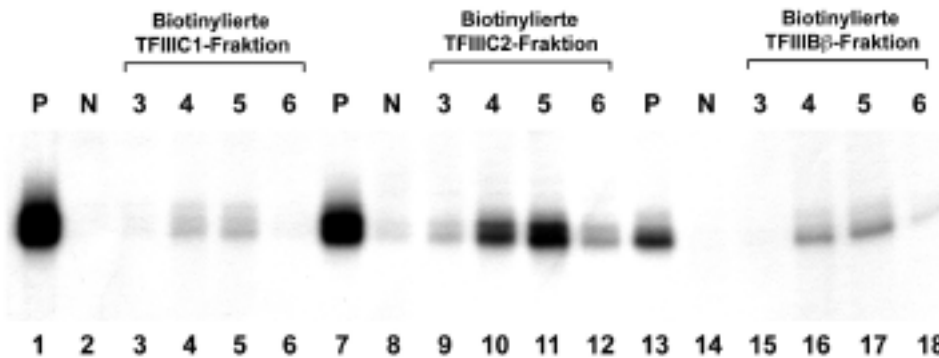
Hintergrund für die *in vitro*-Biotinylierungsversuche war der Gedanke, eine biotinylierte TFIIIC1-Fraktion für das Generieren von Transkriptionskomplexen zu verwenden, die anschließend über eine Gelfiltration von den freien Proteinen abgetrennt werden. Mögliche biotinylierte TFIIIC1-Untereinheiten können mit Hilfe des ABC-Kits (ImmunoPure® Ultra-Sensitive ABC Peroxidase Staining Kit; ABC steht für Avidin-Biotinylated Enzyme Complex; s. 3.5.9) detektiert werden, um auf diese Weise unter Umständen eine Aussage über ihre Identität und Größe treffen zu können.

Der Versuch, eine PCC-Fraktion zu biotinylieren (s. 3.5.8) und anschließend die biotinylierten Transkriptionsfaktoren IIC1 und IIC2 über eine Standard-MonoQ-Chromatographie voneinander zu trennen, schlug fehl (Daten nicht gezeigt). Nach der Biotinylierung eluierte TFIIIC2 nicht mehr bei etwa 360 mM KCl, sondern verteilte sich über den gesamten Gradienten, so dass die biotinylierten TFIIIC1-Fraktionen mit biotinyliertem TFIIIC2 kontaminiert und für die Komplexbildung unbrauchbar waren.

Im nächsten Versuch wurden eine MQ-TFIIIC1-, eine MQ-TFIIIC2- sowie eine ESF-TFIIIB -Fraktion für die *in vitro*-Biotinylierung eingesetzt. Die biotinylierte TFIIIC2- und TFIIIB -Fraktion sollten als Kontrolle dieser Methode dienen, da

die Untereinheiten dieser Proteinkomplexe bekannt sind und deshalb mit dem ABC-Kit nachweisbar sein müssen (s. Abb. 21 und 22).

In den entsprechenden Transkriptionssystemen (TFIIIC1-, TFIIIC2- oder TFIIIB -defizient) wurden die drei biotinylierten Aktivitäten auf ihre Transkriptionsaktivität untersucht (Abb. 19). Eingesetzt wurden die gleichen Mengen wie für eine Standard-*in vitro*-Transkription.



**Abb. 19:** Überprüfung der biotinylierten Fraktionen auf Aktivität in der *in vitro*-Transkription.

Alle Transkriptionsansätze enthielten Nukleosidtriphosphate und je 1 µg VA I-Plasmid als Matrizen-DNA. Das Testsystem für TFIIIC1 beinhaltet jeweils 10 µl PCB und 5 µl MQ-TFIIIC2; das Testsystem für TFIIIC2 enthielt jeweils 10 µl MQ-TFIIIC1 und 10 µl PCB; das Testsystem für TFIIIB bestand aus jeweils 1,4 µl ESF-Polymerase III, 10 µl MQ-TFIIIC1 sowie 5 µl MQ-TFIIIC2.

- Bahn 1:** Positivkontrolle des TFIIIC1-defizienten Transkriptionssystems (+ 10 µl MQ-TFIIIC1)  
**Bahn 2:** Negativkontrolle des TFIIIC1-defizienten Transkriptionssystems  
**Bahn 3-6:** + je 10 µl der biotinylierten und umgepufferten TFIIIC1-Fractionen 3 bis 6  
**Bahn 7:** Positivkontrolle des TFIIIC2-defizienten Transkriptionssystems  
**Bahn 8:** Negativkontrolle des TFIIIC2-defizienten Transkriptionssystems  
**Bahn 9-12:** + je 5 µl der biotinylierten und umgepufferten TFIIIC2-Fractionen 3 bis 6  
**Bahn 13:** Positivkontrolle des TFIIIB -defizienten Transkriptionssystems  
**Bahn 14:** Negativkontrolle des TFIIIB -defizienten Transkriptionssystems  
**Bahn 15-18:** + je 2 µl der biotinylierten und umgepufferten TFIIIB -Fractionen 3 bis 6

Bahn 1 und 2, 7 und 8 sowie 13 und 14 zeigen die jeweiligen Positiv- bzw. Negativkontrollen der verwendeten Transkriptionssysteme. Es wurden jeweils die Fraktionen 3 bis 6 der PD10-Säulen (über die die biotinylierten Fraktionen umgepuffert worden waren) auf ihre Transkriptionsaktivität untersucht und es zeigt sich in allen drei Systemen eine Transkriptionsaktivität der Faktoren mit dem Maximum in den Fraktionen 4 und 5 (TFIIIC1: Bahn 4 und 5; TFIIIC2:

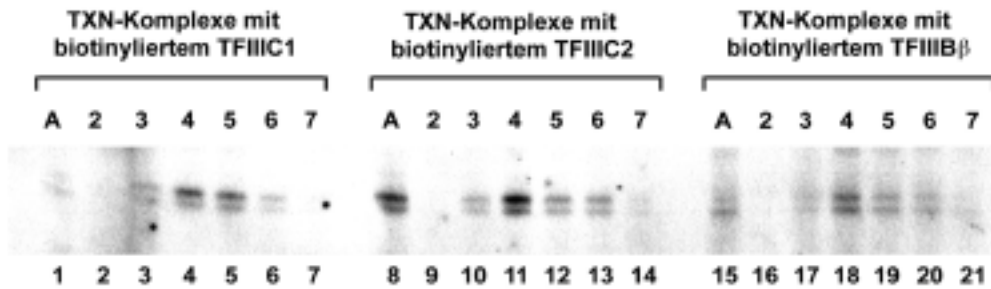
Bahn 10 und 11; TFIIIB : Bahn 16 und 17). Dies bedeutet, dass TFIIIC1, TFIIIC2 und TFIIIB auf dieser Reinigungsstufe auch nach der Biotinylierung noch funktionell aktiv sind. Allerdings verlor die TFIIIC1-Fraktion durch die Biotinylierungsprozedur erheblich an Aktivität, was zum einen auf die geringe Stabilität des Faktors hindeutet, zum anderen auf die Verdünnung der Fraktionen durch die Umpufferungsschritte zurückzuführen ist (vgl. Bahn 1 mit Bahn 4 und 5).

Die weiterhin aktiven, biotinylierten TFIIIC1-Moleküle wurden für die Assemblierung von Transkriptionskomplexen eingesetzt, um nach Isolierung der Komplexe mögliche TFIIIC1-Untereinheiten detektieren zu können.

#### **4.2.9.1 S400-Gelfiltration zur Isolierung von Transkriptionskomplexen, die mit teilweise biotinylierten Fraktionen am VA I-Fragment assembliert wurden**

In einem ersten Versuch waren die biotinylierten Fraktionen für die Assemblierung von Transkriptionskomplexen am VA I-Plasmid eingesetzt und über einen Glyzeringradienten von den freien Proteinen abgetrennt worden (Daten nicht gezeigt). Diese Methode wurde dann jedoch durch die Etablierung der S400-Gelfiltration zur Isolierung von Transkriptionskomplexen abgelöst, da diese eine bessere Trennung der freien Proteine von den Transkriptionskomplexen gewährleistet (s. 3.5.2.3).

Zur Assemblierung der Transkriptionskomplexe wurde jeweils eine der biotinylierten Fraktionen (TFIIIC1, TFIIIC2 oder TFIIIB ) eingesetzt; als Template wurde allerdings nicht das VA I-Plasmid, sondern VA I-Fragment verwendet, um das unspezifische Binden von Proteinen an die DNA zu reduzieren. Diese drei verschiedenen Ansätze wurden nach Standardbedingungen (s. 3.7.1.b) behandelt und anschließend auf eine S400-Gelfiltrationssäule aufgetragen. Aufgrund der Größe der an die DNA-gebundenen Transkriptionskomplexe erscheinen diese im Ausschlussvolumen, während die ungebundenen Proteine im Trennbereich der Säule eluieren. Die resultierenden Gelfiltrationsfraktionen wurden anschließend in der *in vitro*-Transkription analysiert (Abb. 20).



**Abb. 20:** Überprüfung der Transkriptionsaktivität der über eine S400-Gelfiltration gereinigten Transkriptionskomplexe, bei deren Assemblierung je eine biotinylierte Fraktion anwesend war.

Die Gelfiltrationsfraktionen wurden 7 ml nach Start des Auftrags in 1 ml-Fractionen gesammelt. Für die *in vitro*-Transkription enthielten alle Ansätze Nukleosidtriphosphate.

- Bahn 1:* Auftrag der Transkriptionskomplexe mit biotinyliertem TFIIIC1  
*Bahn 2-7:* + je 40  $\mu$ l der Gelfiltrations-Fractionen 2 bis 7 (mit biot. TFIIIC1)  
*Bahn 8:* Auftrag der Transkriptionskomplexe mit biotinyliertem TFIIIC2  
*Bahn 9-14:* + je 40  $\mu$ l der Gelfiltrations-Fractionen 2 bis 7 (mit biot. TFIIIC2)  
*Bahn 15:* Auftrag der Transkriptionskomplexe mit biotinyliertem TFIIIB  
*Bahn 16-21:* + je 40  $\mu$ l der Gelfiltrations-Fractionen 2 bis 7 (mit biot. TFIIIB )

Die Bahnen 1, 8 und 15 in Abb. 20 zeigen die Aktivität des jeweiligen Auftrags auf die S400-Gelfiltrationssäule, d.h. die assemblierten Transkriptionskomplexe zusammen mit den ungebundenen Proteinen der eingesetzten Fraktionen. Der erste Block der *in vitro*-Transkription zeigt diejenigen Transkriptionskomplexe, für deren Assemblierung die biotinylierte TFIIIC1-Fraktion eingesetzt worden war, der zweite Block diejenigen mit der biotinylierten TFIIIC2-Fraktion, der dritte Block diejenigen mit der biotinylierten TFIIIB -Fraktion. In Bahn 2 bis 7, 9 bis 14 und 16 bis 21 wurden die Fraktionen 2 bis 7 (entsprechend 9 bis 14 ml nach Start des Probenauftrags) der jeweiligen Gelfiltrationsläufe in die *in vitro*-Transkription eingesetzt. Fraktion 3 weist in allen drei Fällen eine geringe Transkriptionsaktivität auf (Bahn 3, 10 und 17), während die Fraktionen 4 und 5 eine deutliche Transkriptionsaktivität zeigen (Bahnen 4 und 5, 11 und 12, 18 und 19). Fraktion 6 ist jeweils nur geringfügig transkriptionsaktiv (Bahn 6, 13 und 20).

Interessanterweise sind die Komplexe, in denen der biotinylierte TFIIIC1 enthalten ist, erstaunlich aktiv (Bahn 1 bis 7), obwohl die eingesetzte TFIIIC1-Fraktion und damit auch der Auftrag (Bahn 1) nur eine relativ schwache Transkriptionsaktivität zeigte (vgl. Abb. 19, Bahn 4 und 5). Eine Erklärung hierfür

wäre die positive Selektion funktionell aktiver (und damit inkorporierter) TFIIIC1-Moleküle durch die Gelfiltration.

Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass auch nach der Biotinylierung von TFIIIC1, TFIIIC2 und TFIIIB die Assemblierung von voll transkriptionsaktiven Komplexen erfolgt.

#### **4.2.9.2 SDS-PAGE mit den gereinigten Transkriptionskomplexen und Nachweis der darin enthaltenen biotinylierten Proteine mit Hilfe des ABC-Kits**

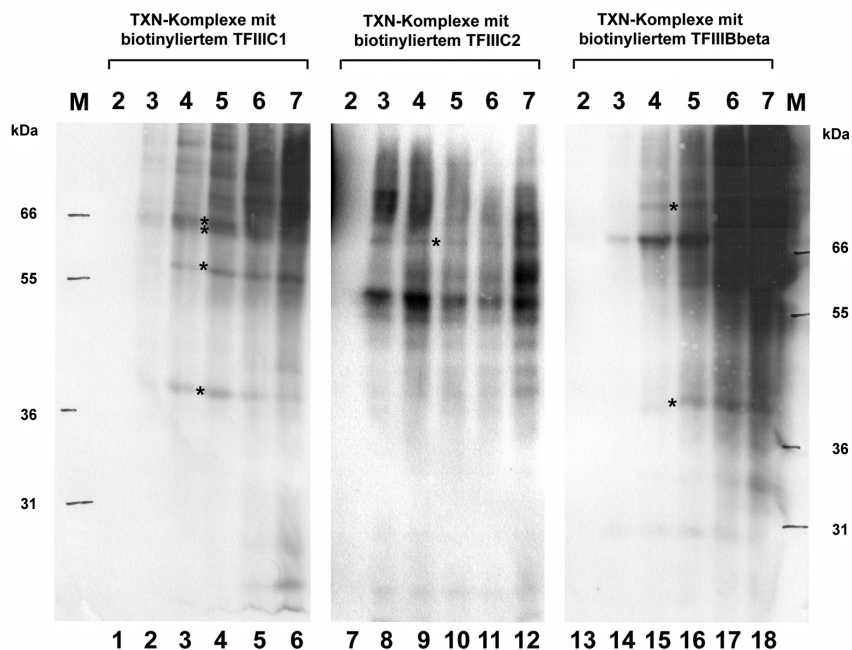
Die Transkriptionskomplex-haltigen Fraktionen wurden auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen, unter Standardbedingungen aufgetrennt und geblottet (s. 3.5.7). Der Nachweis biotinylierter Proteine auf der PVDF-Membran erfolgte mit Hilfe des ABC-Kits von Pierce (s. 3.5.9 und 3.5.7.2); die Membran wurde anschließend mittels Autoradiographie ausgewertet (s. 3.9.1) (Abb. 21).

Es wurden drei verschiedene Blöcke aufgetragen: Bahn 1 bis 6 zeigt die Fraktionen 2 bis 7 (entsprechend 9 bis 14 ml nach Start des Probenauftrags) der Transkriptionskomplexe, bei deren Assemblierung die biotinylierte TFIIIC1-Fraktion anwesend war, Bahn 7 bis 12 diejenigen, bei deren Assemblierung die biotinylierte TFIIIC2-Fraktion anwesend war, und Bahn 13 bis 18 diejenigen, bei deren Assemblierung die biotinylierte TFIIIB -Fraktion anwesend war (ebenfalls jeweils Fraktion 2 bis 7).

Im ersten Block sind Polypeptide mit ca. 38, 57, 63 und 65 kDa Größe erkennbar. Im Bereich oberhalb der 66 kDa-Markerbanden sind weitere Banden zu sehen, die aber aufgrund fehlender Markerbanden sehr schwer in ihrer Größe zuzuordnen sind.

Zum Zeitpunkt, als dieses Experiment durchgeführt wurde, gab es in unserem Labor noch keine konkreten Hinweise auf die Größe möglicher Untereinheiten von TFIIIC1. Und da rund 10 verschiedene Banden im Bereich der transkriptionsaktiven Fraktionen im ersten Block auftraten, die zusätzlich einen gewissen, unspezifischen Hintergrund zeigten, wäre eine Zuordnung von Banden, die von TFIIIC1-Untereinheiten stammen, zu gewagt gewesen. In der Zwischenzeit sind jedoch weitere Experimente durchgeführt worden, die unter Vorbehalt eine erste Zuordnung zum jetzigen Zeitpunkt rechtfertigen (vgl. 4.2.11 sowie Abb. 25).





**Abb. 21:** *Nachweis der in den Transkriptionskomplexen enthaltenen, biotinylierten Proteine mit Hilfe des ABC-Kits.*

Die Transkriptionskomplex-haltigen Gelfiltrations-Fractionen wurden auf ein SDS/10%PAA-Gel aufgetragen; jeweils außen wurden je 40  $\mu$ l Mark12-Marker aufgetragen (M). Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel für 1,5 Stunden bei 250 mA auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis der biotinylierten Proteine erfolgte mit Hilfe des ABC-Kits von Pierce (s. 3.5.9).

*Bahn 1-6:* je 160  $\mu$ l der Transkriptionskomplexe mit biotinyliertem TFIIC1

*Bahn 7-12:* je 160  $\mu$ l der Transkriptionskomplexe mit biotinyliertem TFIIC2

*Bahn 13-18:* je 160  $\mu$ l der Transkriptionskomplexe mit biotinyliertem TFIIB

Vergleicht man Abb. 21 mit Abb. 25, so finden sich Polypeptide vergleichbarer Größen auch auf dem silbergefärbten SDS-Gel in Abb. 25.

Dass die Banden in Bahn 6, 12 und 18 stärker hervortreten, obwohl die jeweilige Fraktion 7 kaum noch Transkriptionsaktivität aufweist (Abb. 20, Bahn 7, 14 und 21), liegt vermutlich daran, dass die Fraktionen 6 und 7 des Gelfiltrationslaufs bereits einen Teil der freien, aus der biotinylierten Fraktion stammenden Proteine enthalten, die alle aufgrund ihrer Biotinylierung mit dem ABC-Kit nachgewiesen werden.

Im zweiten Block (Bahn 7 bis 12) ist eine Bande bei ca. 65 kDa erkennbar (Bahn 8 bis 10, fototechnisch schlecht darstellbar), bei der es sich vermutlich

um die 63 kDa-Untereinheit von TFIIC2 handelt. Hier entspricht der Verlauf der Bandenintensität dem der Transkriptionsaktivität (vgl. Abb. 20: Maximum in Fraktion 4, Bahn 11). Im oberen Bereich lässt die Qualität der Membran keine Zuordnung der vier weiteren Untereinheiten von TFIIC2 zu (220 kDa, 110 kDa, 102 kDa und 90 kDa). Möglicherweise sind die 220 kDa- und die 110 kDa-Untereinheit aufgrund ihrer Größe nicht ins Trenngel eingelaufen oder die Blot-Effizienz dieser großen Polypeptide aus dem 10 %igen PAA-Gel war sehr gering, so dass sie auf der Membran nicht nachweisbar sind.

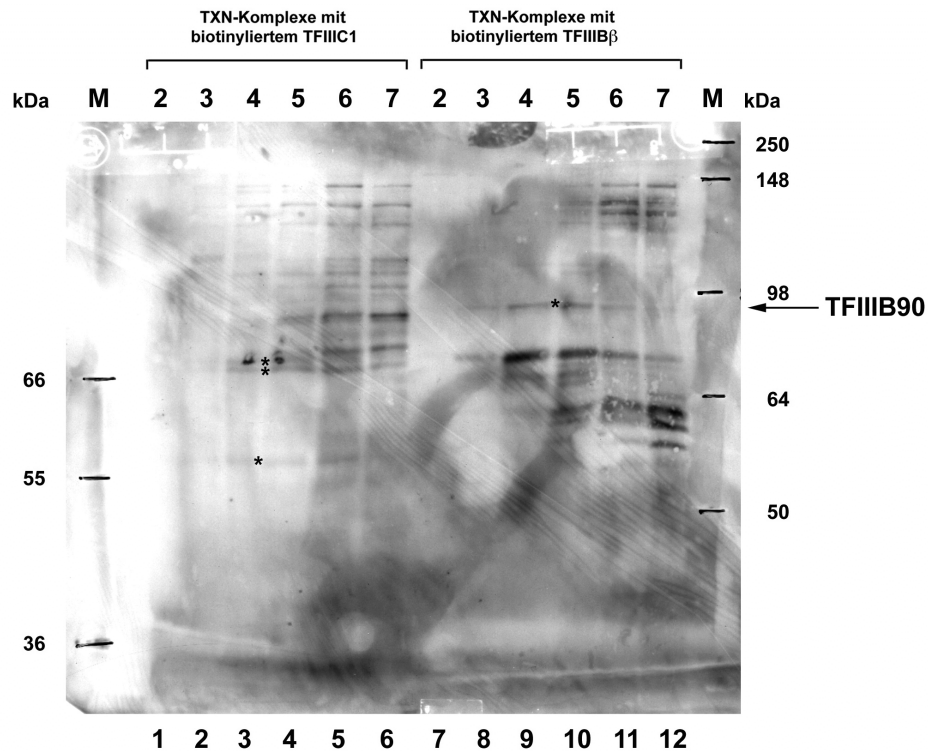
Der dritte Block (Bahn 13 bis 18) zeigt die Transkriptionskomplexe, bei deren Assemblierung die biotinylierte TFIIB -Fraktion anwesend war. Oberhalb der 66 kDa-Markerbande ist eine Bande zu erkennen, bei der es sich vermutlich um TFIIB90 handelt (vgl. Abb. 22, Bahn 9 und 10). Im unteren Bereich der Membran ist eine Bande bei ca. 42 kDa zu sehen, bei der es sich vermutlich um TBP handelt.

In diesem Experiment konnten zwar im ersten Block einige interessante Polypeptide detektiert werden, da aber in den Kontrollläufen mit biotinyliertem TFIIC2 bzw. TFIIB mehr Banden auftraten, als aufgrund der bekannten Zusammensetzung ihrer Untereinheiten auftauchen durften, war eine eindeutige Zuordnung der beobachteten Polypeptide zu TFIIC1 sehr unsicher.

#### **4.2.9.3 Weitere SDS-PAGE mit den gereinigten Transkriptionskomplexen und Nachweis der darin enthaltenen biotinylierten Proteine mit Hilfe des ABC-Kits**

Im Anschluss an das vorangegangene Experiment wurden die Transkriptionskomplexe mit dem biotinylierten TFIIC1 bzw. TFIIB erneut auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen. Die Elektrophoresedauer wurde dieses Mal jedoch verlängert, um besonders die Banden im oberen Bereich besser aufzulösen (Abb. 22).

Aufgetragen wurden in Bahn 1 bis 6 die Transkriptionskomplexe mit biotinyliertem TFIIC1 (Fraktion 2 bis 7), in Bahn 7 bis 12 diejenigen mit biotinyliertem TFIIB (ebenfalls Fraktion 2 bis 7).



**Abb. 22:** Nachweis der in den Transkriptionskomplexen (mit biotinyliertem TFIIIC1 und TFIIIB $\beta$ ) enthaltenen, biotinylierten Proteine mit Hilfe des ABC-Kits.

Die Transkriptionskomplex-haltigen Gelfiltrations-Fractionen mit biotinyliertem TFIIIC1 und biotinyliertem TFIIIB wurden auf ein SDS/10%PAA-Gel aufgetragen; jeweils außen wurden je 40  $\mu$ l Mark12-Marker aufgetragen (M). Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel für 1,5 Stunden bei 250 mA auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis der biotinylierten Proteine erfolgte mit Hilfe des ABC-Kit von Pierce.

Bahn 1-6: je 200  $\mu$ l der Transkriptionskomplexe mit biotinyliertem TFIIIC1

Bahn 7-12: je 200  $\mu$ l der Transkriptionskomplexe mit biotinyliertem TFIIIB

Prinzipiell zeigt sich das bereits bekannte Bild für die Komplexe mit biotinyliertem TFIIIC1: In Bahn 3 und 4 treten Polypeptide mit einer Größe von etwa 57, 68 und 71 kDa auf. Die 38 kDa-Bande, die in Abb. 20 im ersten Block (TFIIIC1) zu erkennen war (Bahn 3 und 4), ist auf dieser Membran nicht zu sehen. Ursache hierfür ist die extreme Unschärfe, die im unteren Bereich des Gels auftritt. Zusätzlich ist hier der Film aufgrund technischer Probleme sehr ungleichmäßig geschwärzt und es sind keine distinkten Banden erkennbar, auch im zweiten Block nicht. Leider sind im oberen Bereich des Gels die Markerbanden des ungefärbten Markers nicht zu sehen, so dass in diesem Bereich keine eindeutige Größenzuordnung möglich ist.

Die auffällig starken Proteinbanden in Bahn 5 und 6 (Fraktion 6 und 7, vgl. mit Fraktion 4 und 5) treten aufgrund der relativ dicht hinter den Transkriptionskomplexen eluierenden freien Proteine auf.

Der rechte Block (Bahn 7 bis 12) zeigt die Transkriptionskomplexe, die biotinylierten TFIIB enthalten. In Fraktion 4 und 5 (Bahn 9 und 10) ist eine deutliche Bande mit einer Größe von ca. 90 kDa erkennbar, bei der es sich vermutlich um die 90 kDa-Untereinheit von TFIIB handelt. Auch hier ist der Film ungleichmäßig geschwärzt und unscharf, so dass TBP (ca. 40 kDa) nicht nachweisbar ist. Bei ca. 70 kDa und darunter treten weitere Banden auf, die aber nicht von TFIIB stammen.

Wie bereits im ersten Experiment erscheinen auch hier interessante Polypeptide; eine eindeutige Zuordnung zu TFIIC1 war aber zu unsicher, da, wie oben beschrieben, auch im Kontrolllauf mit TFIIB mehr Polypeptide detektiert werden, als bekanntermaßen zu TFIIB gehören.

#### **4.2.10 Reinigung von Transkriptionskomplexen am VA I-Plasmid über Gelfiltration (S500)**

Bei der Isolierung der am VA I-Fragment assemblierten Transkriptionskomplexe über eine S400-Gelfiltrationssäule (s. 3.5.2.3) konnten zwar die Transkriptionskomplexe weitgehend von den freien Proteinen abgetrennt werden, diese folgten aber unmittelbar in den nächsten Fraktionen. Um einen größeren Abstand zwischen den Transkriptionskomplexen und den freien Proteinen zu erreichen, wurde S500-Gelfiltrationsmaterial verwendet und anstelle des VA I-Fragments VA I-Plasmid eingesetzt, so dass die an die DNA gebundenen Transkriptionskomplexe im Ausschlussvolumen erscheinen, während die freien, nicht in den Komplex integrierten Proteine weiter hinten im Trennbereich der Säule kommen und damit sehr gut abgetrennt werden können (s. 3.5.2.3).



dieser beiden während der Assemblierungsphase enthaltenen Fraktionen sowohl spezifisch als auch unspezifisch im Ausschlussvolumen enthalten sind. Der Gelfiltrationslauf mit dem Ansatz GF 2 (wie GF 1 + TFIIC1-Fraktion) sollte auf dem silbergefärbten SDS-Gel zusätzliche Banden aufzeigen, die in einem Zusammenhang mit TFIIC1 stehen könnten. Da hierbei allerdings auch Polypeptide aus der TFIIC1-Fraktion im Ausschlussvolumen erscheinen, die unspezifisch mit der DNA interagieren, wurde ein weiterer Versuchsansatz notwendig: Ansatz GF 3 enthielt nur die TFIIC1-Fraktion mit dem VAI-Plasmid. Da TFIIC1 alleine nicht an DNA bindet, stehen die im Ausschlussvolumen erscheinenden Proteine nicht mit TFIIC1 in Zusammenhang. Der Ansatz GF 4 (TFIIC1-, TFIIC2- und TFIIB -Fraktion ohne Template) sollte zur Identifizierung derjenigen Proteine führen, die z.B. durch Aggregatbildung im Ausschlussvolumen zu finden sind.

Es wurden für jeden der fünf Ansätze jeweils vier Gelfiltrationsläufe durchgeführt, um eine ausreichende Menge an Proteinen für das anschließende SDS-Gel zu erhalten.

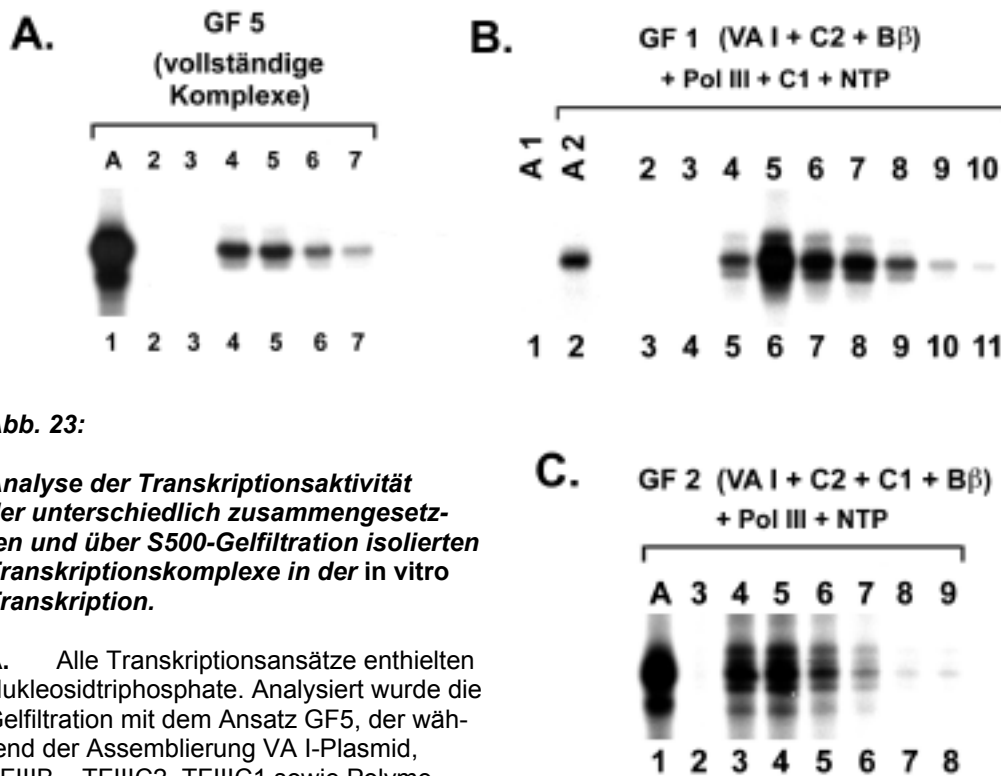
Wie sich in der mehrmonatigen Anwendung dieser Methode gezeigt hatte, sind die Gelfiltrationsläufe technisch absolut reproduzierbar, so dass gleiche Fraktionen der einzelnen Gelfiltrationsläufe problemlos untereinander vereinigt werden können.

#### **4.2.10.1 Analyse der über S500-Gelfiltration gereinigten, unterschiedlich zusammengesetzten Transkriptionskomplexe in der *in vitro*-Transkription**

Je Versuchsansatz wurde immer ein Gelfiltrationslauf in der *in vitro*-Transkription auf Aktivität getestet.

Um die Aktivität der vollständigen Transkriptionskomplexe (GF 5) zu überprüfen, wurde zu den Gelfiltrationsfraktionen lediglich ein Nukleotidmix zugegeben (s. Abb. 23 A). In Bahn 1 ist die Aktivität des Auftrags dargestellt, die Fraktionen 2 und 3 zeigen keinerlei Transkriptionsaktivität (Bahn 2 und 3). In den Fraktionen 4 und 5 (Bahn 4 und 5) treten deutliche Transkriptionssignale auf, die die Anwesenheit der Transkriptionskomplexe in diesen Fraktionen wi-

derspiegeln. In den Fraktionen 6 und 7 nimmt die Transkriptionsaktivität wieder deutlich ab (Bahn 6 und 7).



**Abb. 23:**

**Analyse der Transkriptionsaktivität der unterschiedlich zusammengesetzten und über S500-Gelfiltration isolierten Transkriptionskomplexe in der in vitro Transkription.**

**A.** Alle Transkriptionsansätze enthielten Nukleosidtriphosphate. Analysiert wurde die Gelfiltration mit dem Ansatz GF5, der während der Assemblierung VA I-Plasmid, TFIIB, TFIIC2, TFIIC1 sowie Polymerase III enthielt.

*Bahn 1:* 40 µl Auftragsfraktion

*Bahn 2-7:* 50 µl Fraktion 2 bis 7 der Gelfiltration mit GF5

**B.** Alle Transkriptionsansätze enthielten Nukleosidtriphosphate. Analysiert wurde die Gelfiltration mit dem Ansatz GF1, der während der Assemblierung VA I-Plasmid, TFIIB und TFIIC2 enthielt. Zu den Transkriptionsproben 2 bis 11 wurde ein Proteinmix bestehend aus je 1 µl ss-Polymerase III und 10 µl MQ-TFIIC1 zugegeben.

*Bahn 1:* 40 µl Auftragsfraktion

*Bahn 2:* 40 µl Auftragsfraktion

*Bahn 3-11:* 50 µl Fraktion 2 bis 10 der Gelfiltration mit GF1

**C.** Alle Transkriptionsansätze enthielten Nukleosidtriphosphate. Analysiert wurde die Gelfiltration mit dem Ansatz GF2, der während der Assemblierung VA I-Plasmid, TFIIB, TFIIC2 und TFIIC1 enthielt. Zu den Transkriptionsproben wurde ein Proteinmix zugegeben, der je 1 µl ss-Polymerase III enthielt.

*Bahn 1:* 40 µl Auftragsfraktion

*Bahn 2-8:* 50 µl Fraktion 3 bis 9 der Gelfiltration mit GF2

Dieses Experiment zeigt, dass transkriptionsaktive Komplexe am VA I-Plasmid mit dieser Methode erfolgreich isoliert werden können.

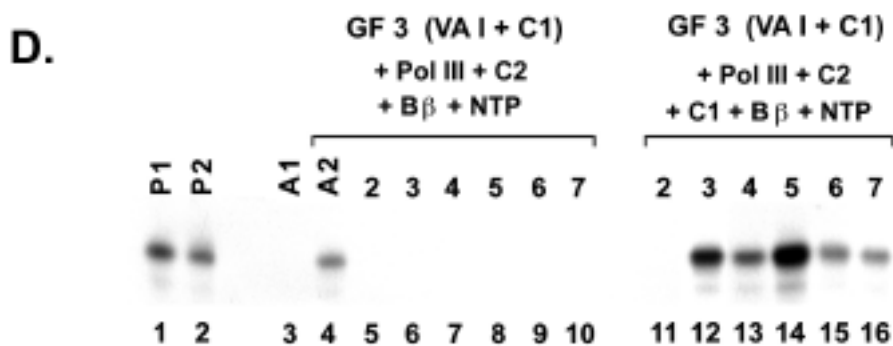
Abb. 23 B zeigt die Transkriptionsaktivität der Gelfiltration mit Ansatz GF 1, der TFIIC2, TFIIB und das VA I-Plasmid enthielt. In Bahn 1 ist die Aktivität des Auftrags in Anwesenheit von Nukleotiden ohne Zugabe weiterer Proteinfractionen oder DNA dargestellt. In Bahn 2 wurde zum Auftrag neben dem Nukleotidmix auch ein Proteinmix, bestehend aus TFIIC1 und Polymerase III, zugegeben, um die Funktionalität der eingesetzten Fraktionen zu demonstrieren. Der gleiche Proteinmix wurde zu den Gelfiltrationsfraktionen 2 bis 10 (Bahn 3 bis 11) zugegeben, um die isolierten TFIIB -TFIIC2-VA I-Komplexe zu detektieren. Die Fraktionen 2 und 3 (Bahn 3 und 4) weisen keinerlei Transkriptionsaktivität auf, während in den Fraktionen 4 bis 8 (Bahn 5 bis 9) eine deutliche Aktivität zu erkennen ist. Das Maximum befindet sich in Fraktion 5 (Bahn 6). Die Fraktionen 9 und 10 (Bahn 10 und 11) weisen nur noch eine geringfügige Transkriptionsaktivität auf. Abb. 23 B macht deutlich, dass TFIIB -TFIIC2-VA I-Komplexe auch über die S500-Gelfiltration stabil sind und auf diese Weise von freien Proteinen abgetrennt werden können.

Abb. 23 C zeigt die Gelfiltration mit dem Ansatz GF 2 in der *in vitro*-Transkription. Der Ansatz enthielt zusätzlich zu TFIIC2, TFIIB und dem VA I-Plasmid eine TFIIC1-Fraktion. In Bahn 1 ist die Transkriptionsaktivität des Auftrags bei Zugabe von Nukleotiden und der Polymerase III dargestellt. Die Bahnen 2 bis 8 zeigen die Transkriptionsaktivität der Gelfiltrationsfraktionen 3 bis 9, ebenfalls bei Zugabe von Nukleotiden und Polymerase III. Auch hier sind in der Fraktion 3 (Bahn 2) keine aktiven Transkriptionskomplexe nachweisbar. Die Fraktionen 4 bis 7 (Bahn 3 bis 6) weisen hingegen eine deutliche Transkriptionsaktivität auf, das Maximum befindet sich, wie auch bei Ansatz GF 1, in Fraktion 5 (Bahn 4). Damit konnte gezeigt werden, dass bis zu diesem Stadium des Komplexaufbaus auch TFIIC1 integraler Bestandteil des Transkriptionskomplexes ist und über die Gelfiltration gereinigt werden kann.

Die *in vitro*-Transkription der Gelfiltration mit dem Ansatz GF 3 (pUVA I + TFIIC1) ist in Abb. 23 D dargestellt. In den Bahnen 1 und 2 sind zwei Positivkontrollen aufgetragen: P1 (Bahn 1) zeigt die Transkriptionsaktivität (am VA I-Plasmid) des Proteinmixes, der zu den Proben in Bahn 11 bis 16 zugegeben



wurde und aus einem vollständigen, rekonstituierten System bestand (MQ-TFIIC1, MQ-TFIIC2, ESF-TFIIB und über Single-strand-DNA-Zellulose gereinigte Polymerase III (ss-Pol III)). Die Positivkontrolle P2 in Bahn 2 stellt die Transkriptionsaktivität (ebenfalls am VA I-Plasmid) der Fraktionen dar, die für die fünf verschiedenen Gelfiltrationsansätze eingesetzt wurden (MQ-TFIIC1, ESF-TFIIB, ss-Pol III sowie eine TFIIC2-Fraktion, die über Double-strand-DNA-Zellulose gereinigt wurde und daher im Folgenden als DC-TFIIC2 bezeichnet wird). In Bahn 3 (A1) wurden lediglich Nukleotide zum Auftrag der GF 3 (TFIIC1 + VA I-Plasmid) gegeben und es ist, wie erwartet, keinerlei Transkriptionsaktivität festzustellen. In Bahn 4 (A2) ist die Aktivität des Auftrags bei Zugabe eines Proteinmixes bestehend aus MQ-TFIIC2, ESF-TFIIB und ss-Pol III sowie Nukleotiden gezeigt.



**Abb. 23:** Analyse der Transkriptionsaktivität der unterschiedlich zusammengesetzten und über S500-Gelfiltration isolierten Transkriptionskomplexe in der *in vitro*-Transkription.

**D.** Alle Transkriptionsansätze enthielten Nucleosidtriphosphate. Analysiert wurde die Gelfiltration mit dem Ansatz GF3, der während der Assemblierung VA I-Plasmid und TFIIC1 enthielt. Zu den Transkriptionsproben 4 bis 10 wurde ein Proteinmix bestehend aus je 1  $\mu$ l ss-Polymerase III, 5  $\mu$ l MQ-TFIIC2 und 3  $\mu$ l ESF-TFIIB zugegeben, zu den Transkriptionsproben 11 bis 16 wurde ein Proteinmix bestehend aus je 1  $\mu$ l ss-Polymerase III, 5  $\mu$ l MQ-TFIIC2, 3  $\mu$ l ESF-TFIIB sowie 10  $\mu$ l MQ-TFIIC1 zugegeben.

*Bahn 1:* Proteinmix (Probe 11 bis 16) + 0,5  $\mu$ g VA I-Plasmid (P1)

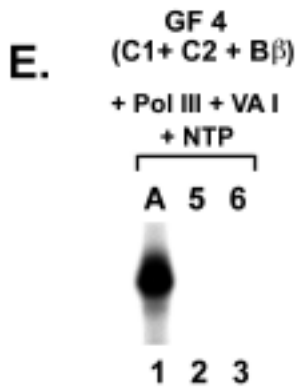
*Bahn 2:* 10  $\mu$ l MQ-TFIIC1 + 7,5  $\mu$ l DC-TFIIC2 + 1  $\mu$ l ss-Polymerase III + 3  $\mu$ l ESF-TFIIB + 0,5  $\mu$ g VA I-Plasmid (P2)

*Bahn 3:* 40  $\mu$ l Auftragsfraktion der Gelfiltration mit GF3 (A1)

*Bahn 4:* 40  $\mu$ l Auftragsfraktion der Gelfiltration mit GF3 + PM (Probe 3 bis 10; A2)

*Bahn 5-10:* je 50  $\mu$ l der Fraktion 2 bis 7 der Gelfiltration mit GF3 + PM (Probe 3 bis 10)

*Bahn 11-16:* je 50  $\mu$ l der Fraktion 2 bis 7 der Gelfiltration mit GF3 + PM (Probe 11 bis 16)



**E.** Alle Transkriptionsansätze enthielten Nukleosidtriphosphate und je 0,5  $\mu$ g VA I-Plasmid als Matrizen-DNA. Analysiert wurde die Gelfiltration mit dem Ansatz GF4, der während der Assemblierung TFIIB, TFIIC2 und TFIIC1 enthielt. Zu den Transkriptionsproben wurde ein Proteinmix zugegeben, der je 1  $\mu$ l ss-Polymerase III enthielt.

*Bahn 1:* 40  $\mu$ l Auftragsfraktion

*Bahn 2:* 50  $\mu$ l der Fraktion 5 der Gelfiltration mit GF4

*Bahn 3:* 50  $\mu$ l der Fraktion 6 der Gelfiltration mit GF4

In Bahn 5 bis 10 wurden die Gelfiltrationsfraktionen 2 bis 7 bei Zugabe dieses Proteinmixes auf Transkriptionsaktivität getestet. Es ist keinerlei Aktivität nachzuweisen, was darauf hinweist, dass TFIIC1 alleine nicht mit dem Template interagiert.

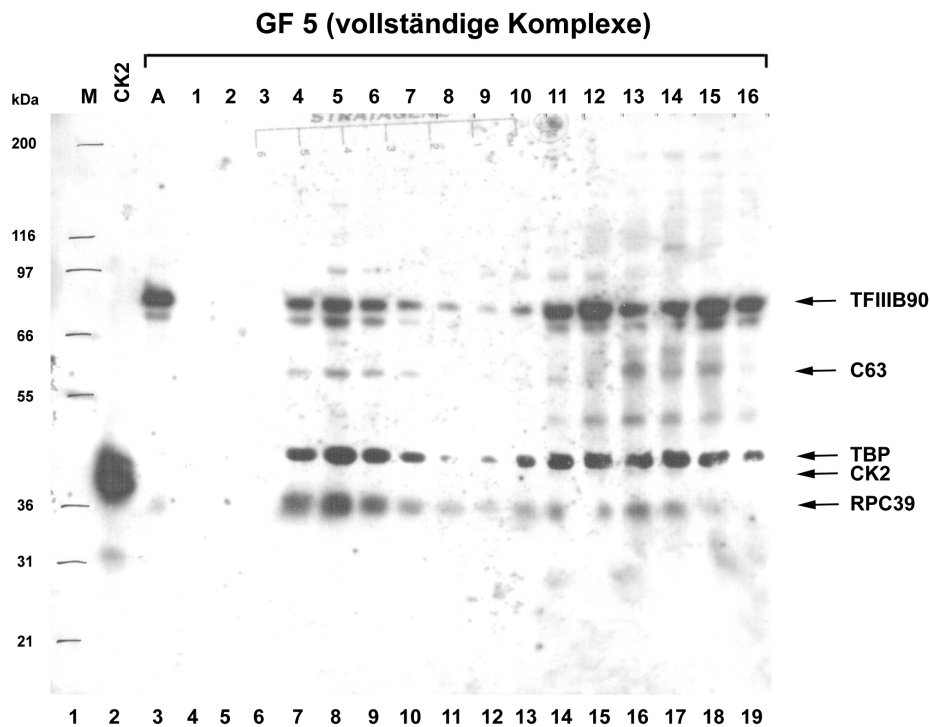
Bahn 11 bis 16 zeigen dieselben Gelfiltrationsfraktionen bei Zugabe des Proteinmixes, der zusätzlich zu MQ-TFIIC2, ESF-TFIIB und ss-Pol III eine MQ-TFIIC1-Fraktion enthielt. Es ist eine deutliche Transkriptionsaktivität in den Fraktionen 3 bis 7 erkennbar, was die Anwesenheit des VA I-Plasmids in diesen Fraktionen widerspiegelt.

In Abb. 23 E wurden schließlich die Fraktionen der Gelfiltration mit dem Ansatz GF 4 in der *in vitro*-Transkription getestet. Dieser Ansatz bestand aus den eingesetzten Proteinfractionen (DC-TFIIC2, ESF-TFIIB, MQ-TFIIC1) ohne Template. In Bahn 1 wurde diese Auftragsfraktion bei Zugabe von ss-Pol III, VA I-Plasmid und Nukleotiden auf Transkriptionsaktivität untersucht. Die Bahnen 2 und 3 zeigen die Aktivität der Gelfiltrationsfraktionen 5 und 6, zu denen ebenfalls ss-Pol III, VA I-Plasmid und Nukleotide zugegeben wurden. Es ist kein Signal zu erkennen, d.h. die drei eingesetzten Transkriptionsfaktoren gelangen nicht gemeinsam in das Ausschlussvolumen der Gelfiltrationssäule, solange sie nicht als Transkriptionskomplex an die DNA gebunden sind.

Abb. 23 zeigt also eindeutig, dass mit dieser Methode sowohl TFIIB - TFIIC2-VA I-Teilkomplexe als auch TFIIC1-TFIIB -TFIIC2-VA I-Teilkomple-

xe isoliert und durch nachträgliche Zugabe von fehlenden Faktoren, Polymerase III und Nukleotiden zu transkriptionsaktiven Komplexen vervollständigt werden können.

#### 4.2.10.2 Western-Blot-Analyse der vollständigen Transkriptionskomplexe auf die enthaltenen Transkriptionsfaktoren und die Polymerase III



**Abb. 24:** Überprüfung der Gelfiltrationsfraktionen mit vollständigen Transkriptionskomplexen auf bekannte Polymerase-III-Transkriptionsfaktoren sowie die Polymerase III im Western Blot.

**Western Blot.** Bevor die Gelfiltrations-Fractionen auf ein SDS/8%PAA-Gel aufgetragen wurden, wurden sie mit Hilfe von StrataClean Resin auf ein Volumen von 100  $\mu$ l gebracht. Der Laufpuffer enthielt Tris/Tricine. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 2 Stunden bei 260 mA auf eine PVDF-Membran geblottet. Weiteres Vorgehen siehe unter 3.5.7.2. Eingesetzt wurden ein monoklonaler Antikörper gegen TBP sowie polyklonale Antikörper gegen TFIIB90, gegen die 63 kDa-Untereinheit von TFIIC2 und gegen die 39 kDa Untereinheit der Polymerase III (RPC39).

*Bahn 1:* 40  $\mu$ l Mark 12

*Bahn 2:* 200 ng CK2

*Bahn 3:* 100  $\mu$ l Auftrag (GF5) auf die Gelfiltration

*Bahn 4-19:* Fraktion 1 bis 16 der Gelfiltration mit dem Ansatz GF5

In Abb. 24 wurde der Auftrag mit den vollständigen Transkriptionskomplexen auf die S500-Gelfiltrationssäule (GF 5, Bahn 3), alle Fraktionen aus dieser

Chromatographie (Bahn 4 bis 19) sowie rekombinante CK2 als Positivkontrolle (Bahn 2) aufgetragen (vgl. auch Abb. 7).

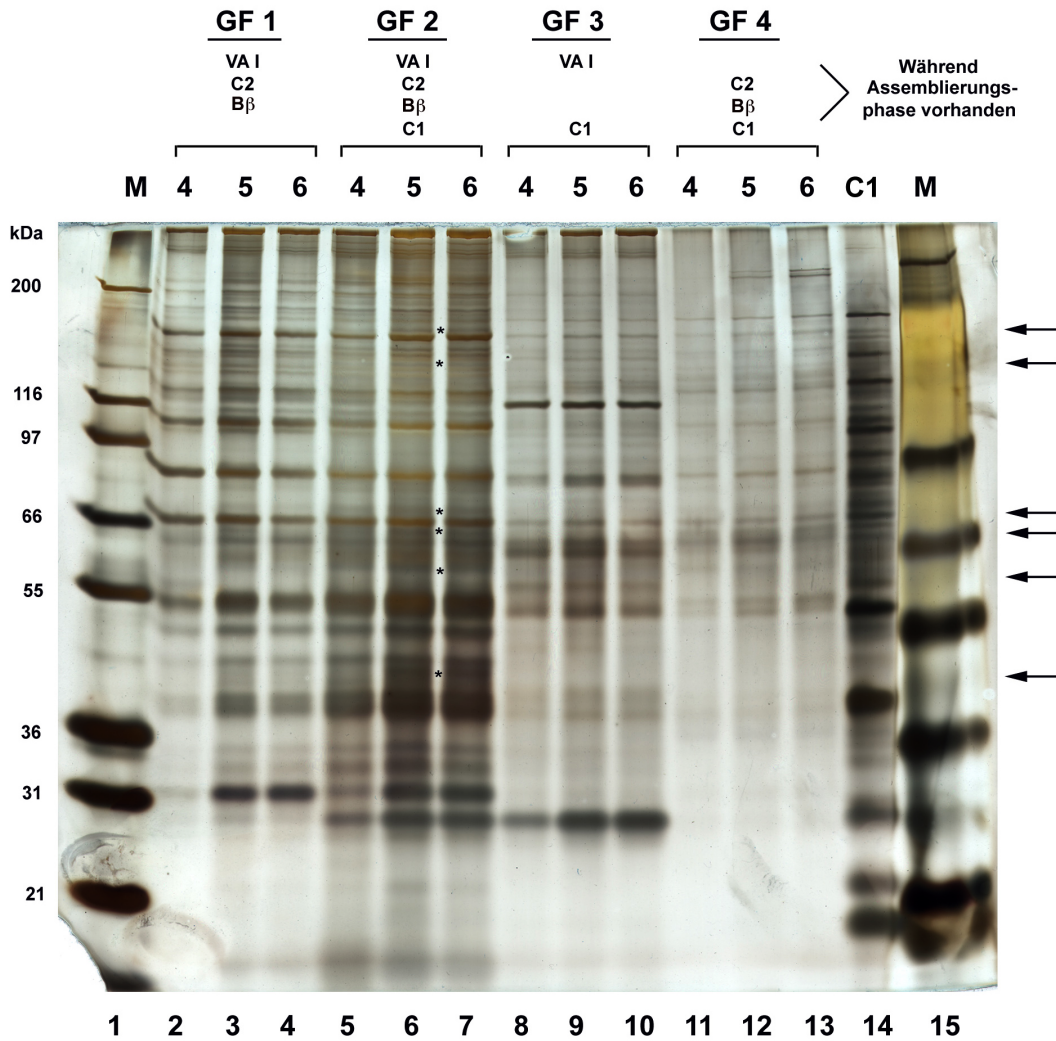
Es wurden Antikörper gegen TFIIIB90, TBP, die 63 kDa-Untereinheit von TFIIIC2, gegen CK2 und die 39 kDa-Untereinheit der Polymerase III eingesetzt. Das Bild, das sich hierdurch ergibt, ist sehr eindeutig und spiegelt die gute Trennung der Transkriptionskomplexe von den freien Proteinen über die S500-Gelfiltration wider:

Alle Antikörper detektierten ihr jeweiliges Zielprotein in den Komplex-haltigen Fraktionen 4 bis 7 (Bahn 7 bis 10) und dann wieder bei den freien Proteinen von Fraktion 10 bis 16 (Bahn 13 bis 19). In Bahn 8 und 9 sind nur Spuren der jeweiligen Proteine erkennbar. Dass nicht alle Zielproteine im Auftrag (Bahn 3) nachweisbar sind, liegt daran, dass die eingesetzte Menge des Auftrags für einen Nachweis nicht in jedem Fall ausreichend war.

Es konnte bereits früher gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren sowie die Polymerase III in Kontrollläufen ohne Template nur in den hinteren Fraktionen zusammen mit den freien Proteinen eluieren (persönliche Mitteilung Sabine Wagner), so dass ein von den Transkriptionskomplexen unabhängiges Vorkommen der Transkriptionsfaktoren und der Polymerase ausgeschlossen werden kann.

#### **4.2.11 SDS-Page mit den Komplex-haltigen Fraktionen der verschiedenen Gelfiltrationsläufe**

Nach Reduktion des Probenvolumens mittels StrataClean Resin wurden jeweils die Transkriptionskomplex-haltigen Fraktionen 4, 5 und 6 der vier verschiedenen Ansätze aufgetragen (Abb. 25; GF 1: Bahn 2 bis 4 / GF 2: Bahn 5 bis 7 / GF 3: Bahn 8 bis 10 / GF 4: Bahn 11 bis 13 ). Bahn 14 zeigt eine TFIIIC0-Fraktion.



**Abb. 25: Analyse der Transkriptionskomplex-haltigen Gelfiltrationsfraktionen mit den Ansätzen GF1 bis GF4 im silbergefärbten SDS-Gel.**

Die Fraktionen 4, 5 und 6 der jeweils vier Gelfiltrationsläufe wurden mit Hilfe von StrataClean Resin auf ein Volumen von 100  $\mu$ l gebracht und auf ein SDS/8%PAA-Gel aufgetragen. Nachdem die Proben in das Sammelgel eingelaufen waren, wurden die StrataClean Resin-Beads aus den Taschen herausgespült, damit sie den Gellauf nicht beeinträchtigen. Der Laufpuffer enthielt Tris/Tricine. Nach der elektrophoretischen Trennung wurde das Gel silbergefärbt.

- Bahn 1:* 30  $\mu$ l Mark12
- Bahn 2-4:* Fraktion 4 bis 6 der Gelfiltration mit Ansatz GF1
- Bahn 5-7:* Fraktion 4 bis 6 der Gelfiltration mit Ansatz GF2
- Bahn 8-10:* Fraktion 4 bis 6 der Gelfiltration mit Ansatz GF3
- Bahn 11-13:* Fraktion 4 bis 6 der Gelfiltration mit Ansatz GF4
- Bahn 14:* 10  $\mu$ l einer MQ-TFIIC1-Fraktion
- Bahn 15:* 30  $\mu$ l SeeBlue plus 2

Betrachtet man GF 3 und GF 4 (Bahn 8 bis 13), wird deutlich, wieviele Proteine unspezifisch in diesen drei Fraktionen enthalten sind. Es handelt sich hierbei um Proteine, die z.B. aufgrund von Aggregatbildungen oder unspezifischen Interaktionen mit dem VA I-Plasmid ins Ausschlussvolumen gelangen. Nachdem alle Bahnen miteinander verglichen wurden, konnten sechs verschiedene Proteinbanden detektiert werden, die nur in den GF 2-Ansätzen erkennbar sind (zwischen Bahn 5 und 6, mit Sternen markiert). Wie in der nachfolgenden Tabelle unter Abb. 25 angegeben, sind dies Polypeptide mit einer Größe von ca. 43, 57, 65, 69, 140 und 164 kDa.

Die nachfolgende Tabelle zeigt eine Auswahl an Kandidatenpeptiden, die sowohl als Bestandteil von TFIIC1 in den Transkriptionskomplex eingebaut sind (s. Abb. 25), als auch durch klassische chromatographische Reinigung als möglicher Bestandteil von TFIIC1 gefunden wurden. Nur diejenigen Polypeptide (PP) aus der klassischen, chromatographischen Reinigung, die in ihrer Größe in etwa mit denjenigen aus Abb. 25 übereinstimmten, wurden als potentielle TFIIC1-Untereinheiten näher in Betracht gezogen.

Vergleicht man nun die gefundenen Kandidatenpeptide, so finden sich Polypeptide, die sowohl zu TFIIC1 als auch zu TFIIC1-like gehören könnten. Besonders die größeren Polypeptide mit einer Größe von ca. 140 kDa und 160 kDa sind sehr interessant. Mengenmäßig betrachtet gibt es recht viele Proteine mit einer Größe zwischen 40 und 80 kDa, so dass es in diesem Bereich schwierig ist, eine einzelne Proteinbande zu identifizieren, während im Bereich um 140 oder 160 kDa erheblich weniger Polypeptide existieren. Es wäre also möglich, eine SDS-PAGE durchzuführen, bei der durch eine entsprechend lange Elektrophoresedauer die Polypeptide im Bereich zwischen 140 und 160 kDa sehr gut auflöst werden. Die Präparation mehrerer solcher Gele könnte schließlich zur Isolierung dieser Polypeptide und ihrer Sequenzierung führen.

<i>Detektiertes PP in Abb. 25</i>	<i>Detektiertes PP</i>	<i>Zugehörige Abbildung</i>	<i>Transkriptions- Faktor</i>
<b>164 kDa</b>	165 kDa	Abb. 18	TFIIIC1-like
	162 kDa	Abb. 9	TFIIIC1
<b>140 kDa</b>	141 kDa	Abb. 9	TFIIIC1
	141 kDa	Abb. 16	TFIIIC1-like
	141 kDa	Abb. 18	TFIIIC1-like
<b>69 kDa</b>	68 kDa	Abb. 9	TFIIIC1
	68 kDa	Abb. 22	TFIIIC1
	68 kDa	Abb. 16	TFIIIC1-like
<b>65 kDa</b>	66 kDa	Abb. 9	TFIIIC1
	66 kDa	Abb. 18	TFIIIC1-like
	65 kDa	Abb. 16	TFIIIC1-like
	65 kDa	Abb. 21	TFIIIC1
	65 kDa	Abb. 18	TFIIIC1-like
<b>57 kDa</b>	58 kDa	Abb. 9	TFIIIC1
	58 kDa	Abb. 18	TFIIIC1-like
	57 kDa	Abb. 21	TFIIIC1
	57 kDa	Abb. 22	TFIIIC1
<b>43 kDa</b>	---	---	---

## 5 Diskussion

Für eine effiziente und spezifische Transkription am VA I-Gen müssen neben der Polymerase III die Transkriptionsfaktoren IIIC2, IIIB sowie IIIC1 verfügbar sein, damit ein vollständiger und aktiver Transkriptionskomplex am internen liegenden Promotor des VA I-Gens assembliert werden kann. Nachdem TFIIC2 die B-Box des VA I-Promotors erkannt und gebunden hat, sorgt er für die Einbindung von TFIIB in den entstehenden Transkriptionskomplex. Als dritter Faktor muss TFIIC1 in den Komplex eingebunden werden, der gemeinsam mit TFIIB für die funktionelle Rekrutierung der Polymerase III benötigt wird (RIEMANN, 2002; WAGNER, 2002).

Während die Kontrolle der Genexpression im Polymerase-II-System recht gut untersucht ist, ist über die Regulation der Polymerase-III-Transkription in menschlichen Zellen nur sehr wenig bekannt. Da neben der spezifischen Generkennung und der korrekten Transkriptionsinitiation auch die Initiationsrate eine Rolle bei der Kontrolle der Genexpression spielt, scheint gerade die Regulation der Initiationsrate im Polymerase-III-System von großer Bedeutung zu sein, wenn man bedenkt, dass an einem einmal assemblierten Polymerase-III-Transkriptionskomplex mehrere hundert Reinitiationsvorgänge pro Stunde ablaufen (KOVELMANN & ROEDER, 1990; DIECI & SENTENAC, 1996). Denkbar ist, ähnlich wie im Polymerase-II-System, die Existenz von Aktivator- und Inhibitoren der Transkription sowie ganz allgemein die Verfügbarkeit aktiver Transkriptionsfaktoren. Wie die Übertragung von externen Signalen auf die basale Polymerase-III-Maschinerie allerdings stattfindet, ist unbekannt. Einen möglichen Angriffspunkt stellt der Transkriptionsfaktor IIIC1 dar, der, wie in der Einleitung beschrieben, während des Zellzyklus, der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung eine Rolle spielt (HAERTEL, 1999; THOMAE, 2000, MEISSNER et al., 2002). Bisher ist über seine Struktur und Funktion aber kaum etwas bekannt. Daher ist die Isolierung und nachfolgende Klonierung von TFIIC1 äußerst wichtig, um einen tieferen Einblick in die Regulationsmechanismen der Polymerase-III-Transkription zu gewinnen.



## **5.1 Untersuchungen zur Funktion von TFIIC1**

### **5.1.1 TFIIC1 ist ein essentiell notwendiger Transkriptionsfaktor für die Polymerase-III-Transkription**

In Abb. 1 sind alle essentiell notwendigen Transkriptionsfaktoren der Polymerase III gezeigt, die für die Transkription des VA I-Gens benötigt werden. Hierbei handelt es sich um TFIIC2, TFIIB und TFIIC1 sowie die Polymerase III selbst. Fehlt TFIIC2, TFIIB oder die Polymerase III (Abb. 1), so ist keine Transkription des VA I-Gens mehr möglich; Abb. 1 demonstriert also eindeutig, dass es sich auch bei TFIIC1 um einen essentiellen Transkriptionsfaktor der Polymerase III handelt, in dessen Abwesenheit keinerlei Transkription stattfinden kann. Auch für die Transkription des 5S-rRNA-Gens sowie des U6-snRNA-Gens ist die Anwesenheit von TFIIC1 zwingend notwendig (Daten nicht gezeigt; OETTEL et al., 1997).

### **5.1.2 Bei der TFIIC2-Bindungsverstärkung an den AB-Box-Genen in Anwesenheit von TFIIC1 handelt es sich um einen unspezifischen Effekt**

Der erste Schritt bei der Assemblierung eines Polymerase-III-Transkriptionskomplexes besteht aus der Erkennung und Bindung der B-Box durch TFIIC2. Wie Experimente am 5S-rRNA-Gen gezeigt haben, wird als dritter Faktor TFIIB in den entstehenden Komplex integriert (RIEMANN, 2002). Auch am VA I-Gen konnten partielle Transkriptionskomplexe isoliert werden, die TFIIC2 und TFIIB enthielten (WAGNER, 2002), d.h. auch an den AB-Box-Genen wird TFIIB direkt nach TFIIC2 in den Komplex eingebunden. Als dritter Faktor bindet TFIIC1 stabil an einen bestehenden TFIIC2-TFIIB - VA I-Teilkomplex und kann über eine S400-Gelfiltration im Komplex mit TFIIC2 und TFIIB isoliert werden (WAGNER, 2002).

Da aber in Anwesenheit von TFIIC1 in Footprint-Experimenten eine Erweiterung des TFIIC2-Schutzes sowie im EMSA eine Bindungsverstärkung von TFIIC2 an die DNA beobachtet wurde (YOSHINAGA et al., 1987; WANG &

ROEDER, 1996; OETTEL et al., 1997), ging man davon aus, dass grundsätzlich auch eine Interaktion zwischen TFIIC1 und TFIIC2 stattfinden muss. Nachdem festgestellt wurde, dass TFIIC1 eine sehr ausgeprägte Temperatursensitivität besitzt (s. 4.1.2.1 und Abb. 2), wurde eine TFIIC1-Fraktion Hitzeinaktiviert und anschließend für die nähere Untersuchung einer potentiellen TFIIC2-TFIIC1-Interaktion im EMSA eingesetzt (Abb. 3 und 4).

Nach Vergleich der Daten aus der *in vitro*-Transkription und den EMSAs wurde deutlich, dass sowohl die Bindungsaktivität als auch die Transkriptionsaktivität von TFIIC2 übereinstimmend ab einer Temperatur von 42°C inhibiert wird (Abb. 2). Die Zugabe von TFIIC1 führte zu der bereits bekannten Bindungsverstärkung von TFIIC2 an die DNA (Abb. 3 und 4). Da aber die Bindungsverstärkung auch in einem Bereich auftrat, in dem die Transkriptionsaktivität von TFIIC1 längst inaktiviert war, ist eine spezifische Interaktion von TFIIC1 und TFIIC2 sehr fraglich. Eine Erklärung wäre natürlich die Existenz von zwei verschiedenen Domänen im TFIIC1-Molekül, von denen die eine für die Transkriptionsaktivität verantwortlich ist und bei der es sich um die temperatursensitive Domäne handelt, während die andere Domäne für die Interaktion mit TFIIC2 zuständig ist. Blicke diese Domäne von der Temperaturbehandlung unbeeinflusst, wäre das Phänomen der Bindungsverstärkung als spezifischer Effekt möglich.

Eine weitere Erklärung wäre die Existenz einer anderen in der TFIIC1-Fraktion enthaltenen Komponente, die äußerst Hitze-unempfindlich ist. Dass es sich hierbei allerdings um ein Polypeptid handelt, ist sehr unwahrscheinlich, da fast alle Proteine bei derartig hohen Temperaturen längst denaturiert und damit inaktiviert vorliegen.

Weiterhin scheint eine direkte Interaktion zwischen TFIIC1 und TFIIC2 für den Aufbau des Transkriptionskomplexes nicht zwingend notwendig zu sein, da nach der Bindung von TFIIC2 zuerst TFIIB und erst danach TFIIC1 in den entstehenden Komplex integriert wird (RIEMANN, 2002; WAGNER, 2002).

### 5.1.3 Die Beziehung von TFIIIC1 zu anderen, die Polymerase-III-Transkription beeinflussenden Proteinen

Bei dem Transkriptionsfaktor IIC1 handelt es sich nicht nur um ein zentrales Protein, das für die Transkription aller Polymerase-III-abhängigen Gene benötigt wird, sondern es ist bei Zugabe einer größeren Menge TFIIIC1 auch immer eine Stimulation der Transkription zu beobachten. Da jedoch kaum etwas über die genaue Funktion dieses Faktors bekannt ist, müssen eventuelle Zusammenhänge mit anderen, die Polymerase-III-Transkription beeinflussende Proteine überprüft werden. Da unter anderem die DNA-Topoisomerase I und die Proteinkinase CK2 als stimulierende Proteine der Polymerase-III-Transkription beschrieben sind (WANG & ROEDER, 1998; JOHNSTON et al., 2002), musste ein möglicher Zusammenhang zwischen diesen Proteinen und TFIIIC1 näher untersucht werden.

#### 5.1.3.1 **Die DNA-Topoisomerase I kann ein vollständig rekonstituiertes Transkriptionssystem nicht stimulieren und im TFIIIC1-defizienten System TFIIIC1 funktionell nicht ersetzen**

Obwohl der von WANG & ROEDER 1998 beschriebene Holo-TFIIIC-Komplex PC4 und DNA-Topoisomerase I nur in Spuren enthielt, wiesen ihre Daten darauf hin, dass für eine effiziente VA I-*in vitro*-Transkription wenigstens eines der beiden letztgenannten Proteine anwesend sein muss (s. 1.7).

Um zu überprüfen, ob diese Beobachtungen auch in unserem System Gültigkeit haben und inwiefern TFIIIC1 dabei eine Rolle spielt, wurde der Effekt der Zugabe einer rekombinanten Topoisomerase I zu unserem rekonstituierten Transkriptionssystem untersucht. Das Enzym wurde vor seinem Einsatz in der *in vitro*-Transkription auf seine Aktivität getestet (Daten nicht gezeigt).

Abb. 5 zeigt, dass keinerlei Stimulation der Transkription auftritt: Weder ein vollständiges Transkriptionssystem, bestehend aus TFIIIC2, TFIIIB, TFIIIC1 und der Polymerase III, noch ein TFIIIC1-defizientes Transkriptionssystem wird durch die Zugabe von rekombinanter Topoisomerase I in seiner Transkriptionsaktivität stimuliert. In unserem hochrekonstituierten System ist der transkriptionsfördernde Effekt durch die Topoisomerase I also nicht nachzu-

weisen. Weiterhin bleibt festzuhalten, dass die Topoisomerase I TFIIIC1 in seiner Funktion offensichtlich nicht ersetzen kann.

#### **5.1.3.2 Die Proteinkinase CK2 ist weder mit TFIIIC1 identisch noch in der TFIIIB $\beta$ -Fraktion nachweisbar**

Neuere Daten von JOHNSTON et al. (2002) deuten darauf hin, dass die Proteinkinase CK2 in einem stabilen Komplex mit TFIIIB( ) vorliegt und diesen durch Phosphorylierung aktiviert, so dass er über Protein-Protein-Interaktion zwischen TFIIIB90 und TFIIIC2 in den Transkriptionskomplex eingebunden werden kann. Dieser Vorgang wird von JOHNSTON et al. (2002) als ein möglicher positiver Regulationsmechanismus der Polymerase-III-Transkription angesehen, der bereits auf der Stufe des Aufbaus des Transkriptionskomplexes stattfindet.

Diese Proteinkinase steht in der Hefe (*S. cerevisiae*) in Verbindung mit Wachstumsförderung, Onkogenese und genereller Stimulation der Polymerase-III-Transkription (Reviews: LITCHFIELD & LUSCHER, 1993; ALLENDE & ALLENDE, 1995), was JOHNSTON et al. unterstützend für ihre Daten sehen. Eine direkte Übertragung von Hefe- auf menschliche Zellen ist allerdings sehr schwierig und auch zu sehr vereinfacht, da es zwischen menschlichen und Hefe-Zellen neben vielen Gemeinsamkeiten doch auch gravierende Unterschiede gibt: Zuallererst sei hier die Existenz von TFIIIC1 in Säugern genannt, bei dem es sich um eine evolutionär neue Komponente der TFIIIC-Aktivität handelt, die in der Hefe überhaupt nicht existiert (s. 1.4.3). Unabhängig davon ist natürlich trotzdem eine Interaktion zwischen CK2 und TFIIIB möglich, und da in unserem Labor der Transkriptionskomplex-Aufbau Gegenstand zahlreicher Untersuchungen ist, besteht großes Interesse an möglichen positiven Regulationsmechanismen. Weiterhin handelt es sich bei einer potentiellen regulatorischen Wechselwirkung zwischen CK2 und TFIIIB um einen Mechanismus, der noch vor dem TFIIIC1-Eintritt in den Transkriptionskomplex eine Rolle spielt und damit auch TFIIIB als einen Angriffspunkt für die Regulation der Polymerase-III-Transkription darstellt.

Weiterhin sollte überprüft werden, ob unabhängig davon ein Zusammenhang zwischen CK2 und TFIIIC1 bestehen könnte. Hintergrund ist hierbei die all-

gemeine Beobachtung in unserem Labor, dass die Zugabe von TFIIIC1-Frak-tionen zu transkriptionsaktiven Systemen stets zu einer Stimulation der Tran-skription führt.

Die Western Blot-Analyse (Abb. 6) zeigte allerdings, dass in den von uns ver-wendeten Fraktionen die CK2 weder in der ESF-TFIIIB -Fraktion noch in der MQ-TFIIIC1-Fraktion enthalten ist. Erstaunlicherweise enthielt die über DNA-Cellulose gereinigte TFIIIC2-Fraktion eine sehr deutliche Menge an CK2, so dass CK2 auf diesem Wege in das rekonstituierte System gelangt.

Es ist also festzustellen, dass die Hauptmenge an CK2 bereits nach der Phosphocellulose-Chromatographie von TFIIIB abgetrennt ist, was der Theorie, dass beide in einem stabilen Komplex vorliegen, widerspricht. Außerdem kann bei Zugabe dieser ESF-TFIIIB -Fraktion durchaus auch ohne die Anwesenheit von CK2 ein aktiver und stabiler Polymerase-III-Transkrip-tionskomplex assembliert und über S500-Gelfiltration gereinigt werden (s. 4.2.10 und Abb. 7 B).

Da auch in der TFIIIC1-Fraktion keine CK2 nachzuweisen war, handelt es sich offensichtlich um verschiedene Proteinkomplexe.

JOHNSTON et al. (2002) postulieren weiterhin eine mögliche Bedeutung der CK2 bei der Phosphorylierung von TFIIIC2-Untereinheiten und anderen Tran-skriptionskomplex-Komponenten, da die CK2 ideal positioniert sei, wenn sie an TFIIIB( ) gebunden in den Transkriptionskomplex gelange. Dem wider-spricht wiederum Abb. 7 A, die einen Western Blot mit sämtlichen Fraktionen der S500-Gelfiltration zeigt (s. auch 4.2.10), über die die vollständigen Tran-skriptionskomplexe gereinigt wurden. Es ist keinerlei CK2 in den Komplex-haltigen Fraktionen detektierbar, während im Bereich der hinteren Fraktionen, in denen sich die freien Proteine befinden, CK2 nachzuweisen ist. D.h. CK2 ist kein integraler Bestandteil des Transkriptionskomplexes. Es kann auch nicht davon ausgegangen werden, dass die CK2 ursprünglich in den Komplex mit eingebunden war, weitere Transkriptionsfaktoren phosphoryliert hat und beim Transkriptionsstart aus dem Komplex freigesetzt wurde, da keine Nu-kleotide zugeben wurden und es sich folglich um einen Initiationskomplex handelt. Andererseits befand sich eine beträchtliche Menge an CK2 in der für die Komplexassemblierung eingesetzten TFIIIC2-Fraktion, so dass eine

Phosphorylierung von TFIIIC2-Untereinheiten zu einem früheren Zeitpunkt natürlich nicht ausgeschlossen ist.

JOHNSTON et al. (2002) sehen ihre Hypothese grundsätzlich durch die aus Hefe gewonnenen Daten bestätigt, bei der die CK2-Aktivität zu einer Stimulation der Polymerase-III-Transkription führt. Dieser Theorie, dass es sich bei CK2 um einen generellen Aktivator der Polymerase-III-Transkription handelt, widerspricht allerdings ebenfalls die Tatsache, dass die Phosphorylierung von PC4 durch CK2 (s. 1.8) dessen Bindung an doppelsträngige DNA und seine stimulierende Aktivität inhibiert (GE & ROEDER, 1994; KRETZSCHMAR et al., 1994; KAISER et al., 1995). Wie die CK2 also genau auf die Polymerase-III-Transkription einwirkt, ist nicht geklärt.

Die oben beschriebenen Daten (vgl. 4.1.4 sowie Abb. 6 und 7) lassen sich jedenfalls nicht mit den Daten von JOHNSTON et al. (2002) vereinbaren, dass TFIIIB in einem stabilen Komplex mit CK2 vorliege und nur in diesem Zustand aktiv sei und in den Transkriptionskomplex eingebunden werden könne.

## **5.2 Reinigung von TFIIIC1**

Um Proteine zu isolieren und zu reinigen, bieten sich verschiedene chromatographische Methoden an:

- Ionenaustausch-Chromatographie
- Hydrophobe Interaktions-Chromatographie
- Gelfiltration / Size exclusion chromatography
- Affinitäts-Chromatographie

Die Standard-Reinigungsstrategie für die Transkriptionsfaktoren und die Polymerase III beinhaltete verschiedene Ionenaustausch-Chromatographien (s. 3.5.1 und 3.5.2), wobei der Kationenaustausch-Chromatographie (PC) eine Anionenaustausch-Chromatographie (MQ, EDF) folgte und anschließend wieder eine Kationen-Austausch-Chromatographie (ESF, Resource S) durchgeführt wurde. Um eine effizientere Reinigung von TFIIIC1 zu erzielen, sollte daher versucht werden, einerseits die Ionenaustauscher-Chromatographie zu optimieren und diese andererseits mit anderen Trennprinzipien (s.o.) zu

kombinieren, um die unterschiedlichen Interaktionseigenschaften der Proteine mit dem jeweiligen Säulenmaterial für ihre Reinigung zu nutzen.

### **5.2.1 Die optimierte Phosphocellulose-Chromatographie führt zur Aufspaltung der TFIIC1-Aktivität ( $PC_{0,35-0,45}$ und $PC_{0,45-0,6}$ )**

Da bei der klassischen Phosphocellulose-Chromatographie die PCC-Fraktion mit einem relativ großen Schritt (350 bis 600 mM KCl) eluiert wird, enthält diese Fraktion sehr viele Proteine, die im nächsten Schritt auf die MonoQ-Säule aufgetragen werden. Möglicherweise ist jedoch die Trennleistung der MonoQ aufgrund des hohen Proteingehalts der PCC-Fraktion geringer. Daher wurde versucht, die Reinigungsstrategie für TFIIC1 bereits auf Stufe der Phosphocellulose-Chromatographie zu optimieren, indem zwischen die PCB- und die PCC-Fraktion ein weiterer Elutionsschritt mit 450 mM KCl eingeschoben wurde. Dies führte allerdings zur Aufspaltung der TFIIC1- und TFIIC1-like-Aktivität (Daten nicht gezeigt): Sowohl in der  $PC_{0,35-0,45}$  als auch in der  $PC_{0,45-0,6}$  war TFIIC1- und TFIIC1-like-Aktivität nachweisbar; beide Aktivitäten eluierten über die MonoQ bei den jeweils bekannten Salzkonzentrationen. In früheren Experimenten hatten  $PC_{0,35-0,45}$ -Fraktionen ohne eine weitere Reinigung über MonoQ keinerlei TFIIC1-Transkriptionsaktivität gezeigt, weshalb angenommen wurde, dass TFIIC1 vollständig in der  $PC_{0,45-0,6}$  eluiert. Wie sich jedoch in den anschließenden MonoQ-Chromatographien herausstellte, muss die TFIIC1-Aktivität aus der  $PC_{0,35-0,45}$ -Fraktion durch einen ebenfalls in dieser Fraktion enthaltenen Inhibitor überdeckt worden sein, denn jetzt war TFIIC1-Aktivität auch aus dieser Fraktion nachweisbar.

Die Aufspaltung der TFIIC1-Aktivität ist in Hinsicht auf eine präparative Reinigung von TFIIC1 im größeren Maßstab und den Erhalt einer sehr aktiven TFIIC1-Fraktion zwar eher ungünstig, da sie mit viel Aufwand und sehr großen Mengen an benötigtem Zellextrakt verbunden ist; sie eignet sich aber eventuell für eine analytische Reinigung, um die einzelnen Untereinheiten von TFIIC1 darstellen zu können. Hierbei würde nur die  $PC_{0,45-0,6}$  verwendet, da sie eine höhere spezifische Aktivität besitzt.

## 5.2.2 Die hydrophobe Interaktions-Chromatographie

Die HIC wurde eingesetzt, um ein komplett anderes Trennprinzip für die Reinigung von TFIIIC1 zwischen die verschiedenen Ionenaustauscher-Chromatographien zu schalten. Leider stellte sich heraus, dass unter den jeweils gewählten Bedingungen keine lohnenswerte Reinigung erreicht werden konnte, so dass diese Methode wieder verworfen wurde.

## 5.2.3 Die TFIIIC1-Reinigung über MonoS

Nachdem die Resultate der ESF-Chromatographie (im Anschluss an eine MonoQ) reproduzierbar zwar zu einer Konzentrierung der TFIIIC1-Aktivität, aber zu keiner nennenswerten Reinigung führte, wie die Bestimmung der Proteinkonzentration (s. 3.5.5) und die Analyse von silbergefärbten SDS-Gelen zeigten (Daten nicht gezeigt), wurde die ESF- durch eine MonoS-Chromatographie ersetzt, da dieses Säulenmaterial aufgrund einer geringeren und gleichmäßigeren Partikelgröße bessere Trenneigenschaften aufweist.

### 5.2.3.1 *Über die MonoS-Chromatographie werden zwei verschiedene Formen von TFIIIC1 voneinander getrennt*

Wie sich in der anschließenden *in vitro*-Transkription herausstellte (Abb. 10), eluiert TFIIIC1 über die MonoS mit zwei sehr deutlichen Aktivitätsmaxima bei unterschiedlichen Salzstärken, wobei das erste Maximum reproduzierbar bei ca. 330 mM KCl liegt, das zweite bei ca. 425 mM. Dieses Ergebnis ist recht überraschend, da die TFIIIC1-Fraktion bei der MonoQ-Chromatographie mit einem sehr deutlichen, relativ schmalen Maximum eluiert, was nicht unbedingt erwarten ließ, dass in ihr zwei verschiedene Aktivitäten enthalten sind. Es musste daher überprüft werden, ob tatsächlich zwei unterschiedliche Formen von TFIIIC1 existieren, die sich z.B. im Ausmaß ihrer Modifikationen wie Methylierung, Acetylierung oder Phosphorylierung unterscheiden könnten und sich daher über die MonoS-Chromatographie voneinander trennen lassen. Zunächst war jedoch auch die Möglichkeit nicht auszuschließen, dass in den Fraktionen zwischen den beiden „vermeintlichen“ Peaks ein Transkriptionsinhibitor eluiert. Um dies näher zu untersuchen, wurden die beiden Aktivitäts-



peaks jeweils einzeln noch einmal auf die MonoS-Säule aufgetragen und unter den gleichen Bedingungen wie beim ersten Mal eluiert (s. 4.2.5.3).

Wie sich zeigte, eluierten beide Peaks wieder bei der gleichen Salzkonzentration wie beim ersten Mal (Abb. 13 A und B). Während jedoch bei der Rechromatographie des ersten Peaks die Aktivität komplett bei der gleichen Salzkonzentration erschien wie beim ersten Mal, war bei der Rechromatographie des zweiten Peaks auch im vorderen Bereich um 330 mM KCl eine geringe TFIIC1-Aktivität erkennbar. Ursache hierfür könnte entweder sein, dass ein Teil der Aktivität des ersten Peaks durch Überlagerung in die Fraktionen des zweiten Peaks geraten ist, oder dass eine mögliche Modifizierung von TFIIC1 durch die Anwesenheit eines modifizierenden Enzyms innerhalb der Fraktion stattfindet, so dass die eine Form in die andere überführt wird und dadurch ihr chromatographisches Verhalten ändert.

Da die beiden Peaks jedoch generell bei der gleichen Salzkonzentration eluierten wie beim ersten Mal und sich der Peak auch nicht verbreiterte, konnte ausgeschlossen werden, dass das Auftreten der beiden Aktivitätspeaks durch die Elution eines Inhibitors verursacht wurde. Es scheint sich also tatsächlich um zwei verschiedene Formen von TFIIC1 zu handeln, die sich z.B. aufgrund eines unterschiedlichen Modifikationsgrades voneinander unterscheiden.

#### **5.2.3.2 Die MonoS-Chromatographie zeigt eine sehr hohe Reinigungseffizienz und einen guten Aktivitätserhalt**

Wie das zugehörige Chromatogramm der ursprünglichen MonoS-Chromatographie verdeutlicht (Abb. 10), wird mit dieser Methode eine sehr gute Reinigung von TFIIC1 erreicht, da der Hauptteil der Proteine schon vor dem ersten TFIIC1-Aktivitätsmaximum eluiert.

Ebenfalls sehr interessant ist die außerordentlich starke Aktivität der TFIIC1-haltigen MonoS-Fraktionen, da in der Vergangenheit die Reinigung über drei Chromatographie-Säulen einen Aktivitätsverlust zur Folge hatte. Setzt man die Transkriptionsaktivität der gesamten, TFIIC1-haltigen MonoS-Fraktionen hinsichtlich Signalstärke und Gesamtvolumen zu Signalstärke und Gesamtvolumen des Auftrages ins Verhältnis, so ergibt sich ein ca. 1,75fach höherer Wert für die Aktivität der MonoS-Fraktionen gegenüber der Aktivität des Auf-

trags. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Abtrennung eines Inhibitors über die MonoS-Chromatographie.

### **5.2.3.3 Rb wird über die MonoS von TFIIC1 abgetrennt**

Bei einem solchen Inhibitor könnte es sich um das Retinoblastoma-Protein (Rb) handeln, das als „Master switch“ im Polymerase-III-Transkriptionssystem diskutiert wird und über TFIIB wirken soll (Übersicht: WHITE, 1997). Da jedoch frühere Daten aus unserem Labor zeigten, dass Rb über alle bisherigen Chromatographie-Schritte der Standard-Reinigung mit TFIIC1 koeluierte (HAERTEL, 1999), wurde diese Annahme in Frage gestellt. Die Daten führten vielmehr zu der Vermutung, dass Rb mit TFIIC1 in einem Komplex vorliegen könnten, weshalb die MonoS-Chromatographie auch in dieser Hinsicht analysiert wurde (s. 4.2.5.1). Wie sich jedoch im Western Blot deutlich zeigte, wurde Rb über die MonoS erstmalig weitestgehend von TFIIC1 abgetrennt, da es bei einer wesentlich niedrigeren Salzkonzentration eluiert als TFIIC1 (Abb. 11). Allerdings kommt es aufgrund der Elutionsbreite von Rb zu einer Kontamination des ersten Transkriptionspeaks von TFIIC1, der zweite Peak ist dagegen annähernd Rb-frei. Auf keinen Fall ist eine Koelution von Rb und TFIIC1 zu beobachten. Mit einer optimierten Stufen-Elution ließe sich sicherlich eine noch deutlichere Trennung der beiden Proteine erreichen. Diese Daten sprechen somit eindeutig gegen eine stabile Komplexierung von Rb und TFIIC1. Weiterhin kann festgehalten werden, dass Rb in den untersuchten Transkriptionssystemen keinerlei inhibierenden Einfluss ausübt, so dass man nicht von einer Funktion als genereller Repressor der Polymerase-III-Transkription sprechen kann.

### **5.2.3.4 Rb hat keinen negativen Einfluss auf die in vitro-Transkription**

Neben der Abtrennung von Rb aus den TFIIC1-haltigen Fraktionen war, wie unter 5.2.3.2 beschrieben, eine sehr gute Aktivität der TFIIC1-Fraktionen zu beobachten. Da Rb als Repressor der Polymerase-III-Transkription diskutiert wird (Übersicht: PAULE & WHITE, 2000), hätte seine Abtrennung die Ursache für die hohe Transkriptionsaktivität der TFIIC1-haltigen Fraktionen sein können. Die Zugabe einer Rb-haltigen, aber TFIIC1-freien MonoS-Fraktion zu

verschiedenen, aktiven Transkriptionssystemen zeigte allerdings sehr deutlich, dass keinerlei Reprimierung stattfindet, im Gegenteil, die Zugabe der Rb-haltigen MonoS-Fraktion zu verschiedenen rekonstituierten Transkriptionssystemen führt zu einer, wenn auch nicht extrem ausgeprägten, Stimulation der Transkription (Abb. 12). Lediglich der S100-Zellextrakt ist durch diese Fraktion nicht zu stimulieren. Was allerdings der mechanistische Hintergrund für diese Aktivitätszunahme sein könnte und ob die leichte Stimulation überhaupt auf Rb zurückzuführen ist, bleibt unklar. In jedem Fall übt Rb in diesen Transkriptionssystemen keinerlei inhibierenden Einfluss aus. Da jedoch der Phosphorylierungsstatus des in diesen MonoS-Fractionen enthaltenen Rb nicht bekannt ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass nur die hyperphosphorylierte und damit inaktive Form von Rb darin enthalten ist.

## **5.2.4 Die Reinigung des Transkriptionsfaktors IIIC1-like**

### **5.2.4.1 Die MonoS-Chromatographie**

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, kann der Transkriptionsfaktor IIIC1-like TFIIIC1 funktionell ersetzen, wobei jedoch nicht klar ist, in welcher Beziehung er zu TFIIIC1 steht. Falls TFIIIC1 und TFIIIC1-like strukturell miteinander verwandt sein sollten, kann die Aufklärung der Untereinheitenstruktur von TFIIIC1-like Einblicke in den Aufbau von TFIIIC1 bieten.

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass die MonoS-Chromatographie für die TFIIIC1-Reinigung sehr gut geeignet ist, sollte auch die TFIIIC1-like-haltige MQ-TFIIIC0-Fraktion über dieses Säulenmaterial gereinigt werden. Weiterhin bietet die MQ-TFIIIC1-like-Fraktion gegenüber der MQ-TFIIIC1-Fraktion den Vorteil, dass sie deutlich weniger Gesamtprotein enthält, was wiederum für die Reinigung von TFIIIC1-like hilfreich ist.

Wie Abb. 15 zeigt, verhält sich TFIIIC1-like während der MonoS-Chromatographie sehr ähnlich wie TFIIIC1, es treten auch hier zwei deutliche Aktivitätsmaxima auf: Das erste liegt bei rund 330 mM KCl, was dem ersten Peak bei TFIIIC1 exakt entspricht, das zweite Aktivitätsmaximum liegt bei etwa 480 mM KCl und eluiert damit geringfügig später als der zweite Aktivitätspeak von TFIIIC1. Nichtsdestotrotz sprechen diese Ergebnisse dafür, dass es sich

auch bei TFIIC1-like um eine Subpopulation von TFIIC1 handelt, die sich wiederum über die MonoS in zwei verschiedene Aktivitäten auftrennen lässt. Der Sachverhalt stellt sich zu diesem Zeitpunkt also so dar, als gebe es mindestens vier verschiedene Formen der TFIIC1-Aktivität.

Weiterhin bestätigt dieses, der TFIIC1-Elution sehr ähnliche Verhalten von TFIIC1-like, dass die beiden Aktivitätsmaxima von TFIIC1 über die MonoS nicht durch die Elution eines Inhibitors in den mittleren Fraktionen verursacht sein kann, da in diesem Fall der Inhibitor sowohl in der MQ-TFIIC0- als auch in der MQ-TFIIC1-Fraktion enthalten sein müsste.

Wie das Chromatogramm der MonoS-Chromatographie mit TFIIC1-like veranschaulicht (Abb. 15), eluiert auch hier bereits ein großer Teil der Proteine noch vor dem ersten Aktivitätsmaximum von TFIIC1-like. Hinsichtlich der Aktivität der MonoS-TFIIC1-like-Fractionen zeigt sich kein großer Unterschied zwischen der Aktivität des Auftrags und der Fraktionen (1,05facher Wert der Fraktionen gegenüber dem Auftrag). Dass sich hier kein so eindrucksvoll höherer Wert ergibt wie bei der Reinigung von TFIIC1, kann z.B. daran liegen, dass in der Auftragsfraktion von vornherein keine transkriptionshemmenden Komponenten enthalten waren, die über die MonoS-Chromatographie abgetrennt werden mussten.

#### **5.2.4.2 *Liegt die TFIIC1-Aktivität in verschiedenen Zustandsformen vor?***

In der Vergangenheit wurden verschiedenste Ergebnisse veröffentlicht, die Fraktionen und Proteine mit TFIIC1-Aktivität zeigten. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, wurde z.B. eine funktionell mit TFIIC1 austauschbare Aktivität gefunden, die bei ca. 280 mM KCl von der Phosphocellulose-Säule eluierte und als TFIIC1' bezeichnet wurde (WANG & ROEDER, 1996). Auch in unserem Labor konnte in einigen PCB-Präparationen eine TFIIC1-Aktivität nachgewiesen werden (THOMAE, 2000). Betrachtet man weiterhin die MonoQ-Chromatographie einer Standard-PCC-Fraktion, so erscheinen auch hier zwei verschiedene TFIIC1-Aktivitätspeaks, von denen der erste TFIIC1-like und der zweite TFIIC1 enthält. Die weitere Aufspaltung von TFIIC1 bzw. TFIIC1-like während der MonoS-Chromatographie sprechen dafür, dass beide

TFIIIC1-Aktivitäten (TFIIIC1 selbst und TFIIIC1-like) in jeweils zwei verschiedenen Formen eluieren. Bei der TFIIIC1-Aktivität handelt es sich also offensichtlich um einen Transkriptionsfaktor, der verschiedene Populationen und damit ein unterschiedliches chromatographisches Verhalten aufweist. Ursache hierfür können zum einen unterschiedliche Modifikationsstufen sein oder auch die Kombination verschiedener Untereinheiten in einem größeren TFIIIC1-Komplex. Oder es handelt sich um funktionell analoge Proteinkomplexe, was allerdings eher unwahrscheinlich ist, da TFIIIC1 und TFIIIC1-like über die MonoS-Chromatographie ein extrem ähnliches Verhalten zeigen. Die Existenz verschiedener TFIIIC1-Populationen wäre ebenfalls eine Erklärung für das Auftauchen der TFIIIC1-Aktivität in derart vielen und sehr unterschiedlich gereinigten Fraktionen.

Doch was kann der Sinn des Auftretens verschiedener Zustandsformen von TFIIIC1 sein? Es liegt nahe, dass ein Transkriptionsfaktor, der für die Transkription aller Polymerase-III-Gene benötigt wird, in die Regulation der der Polymerase-III-Expression involviert ist, und wie in der Einleitung beschrieben (s. 1.4.3), konnte bereits gezeigt werden, dass TFIIIC1 vermutlich einen zentralen Angriffspunkt für die Transkriptionsregulation während des Zellzyklus und der Zelldifferenzierung darstellt (HAERTEL, 1999; THOMAE, 2000; MEISSNER et al., 2002). Da jedoch auf Stufe der MonoQ sowohl TFIIIC1 als auch TFIIIC1-like transkriptionsaktiv sind (das gleiche gilt für die beiden Maxima der MonoS), kann die Modifikation selbst nicht direkt die Aktivität oder Inaktivität des Faktors steuern. Möglicherweise determiniert der Modifikationsgrad jedoch die Interaktionsfähigkeit von TFIIIC1 bzw. TFIIIC1-like mit anderen, regulatorisch wirkenden Proteinen.

### **5.2.5 Die Gelfiltration**

In früheren Untersuchungen wurde die Gelfiltration für den Versuch einer direkten Größenbestimmung von TFIIIC1 eingesetzt (HAERTEL, 1999; TIEFENBACH, 1998); es traten jedoch einige Probleme auf: Durch den Verdünnungseffekt, der mit jeder Gelfiltration verbunden ist, war TFIIIC1 in manchen Fällen nach der Chromatographie nicht mehr zu detektieren. Oder aber

TFIIIC1 war nachweisbar, eluierte jedoch über einen so breiten Bereich, dass sich keine sinnvolle Größenangabe daraus ableiten ließ (TIEFENBACH, 1998). Wie sich aber in einer Vielzahl von Experimenten reproduzierbar gezeigt hat (RIEMANN, 2002; WAGNER, 2002), eignet sich die Gelfiltration ausgesprochen gut für die Abtrennung freier, nicht inkorporierter Proteine von partiellen und vollständigen Transkriptionskomplexen, die aus gereinigten Transkriptionsfaktoren an der DNA assembliert wurden (s. 4.2.9.1, 4.2.10). Hintergrund der Gelfiltrationsexperimente war es also, Einblicke in die TFIIIC1-Untereinheitenstruktur, zu bekommen, indem TFIIIC1 über seine funktionelle Interaktion mit dem Transkriptionskomplex isoliert wird.

### **5.2.6 Isolierung vollständiger Transkriptionskomplexe über eine S400-Gelfiltration unter Verwendung von biotinyliertem TFIIIC1**

Wie unter 4.2.9 beschrieben, konnte eine MQ-TFIIIC1-Fraktion erfolgreich *in vitro* biotinyliert (Abb. 19) werden, die für die Assemblierung von Transkriptionskomplexen eingesetzt wurde. Mit Hilfe einer S400-Gelfiltration sollten alle in der TFIIIC1-Fraktion enthaltenen, biotinylierten Proteine von den vollständigen Transkriptionskomplexen abgetrennt werden. Nur der biotinylierte TFIIIC1 erscheint als Bestandteil des Transkriptionskomplexes im Ausschlussvolumen. Ziel des Experimentes war daher der Nachweis der biotinylierten TFIIIC1-Untereinheiten in diesen Transkriptionskomplex-haltigen Fraktionen. Viele der früher durchgeführten Experimente hatten gezeigt, dass die Verwendung von Plasmiden für die Assemblierung von Transkriptionskomplexen einen Nachteil hat, da Proteine auch unspezifisch mit der freien DNA des Plasmids interagieren und auf diese Weise in den Komplex-haltigen Fraktionen erscheinen, ohne in den Transkriptionskomplex integriert zu sein. Es wurden deshalb für die Versuche mit S400-Gelfiltrationsmaterial die Transkriptionskomplexe am VA I-Fragment assembliert, da auf diese Weise weniger freie DNA für unspezifische Interaktionen zur Verfügung steht. Über die S400-Gelfiltration wurden schließlich die freien, nicht integrierten Proteine von den Komplexen abgetrennt. Wie sich in der *in vitro*-Transkription zeigte (Abb. 20), war TFIIIC1 nach der Biotinylierung zwar aufgrund der ge-

samten Prozedur weniger aktiv, es bildeten sich aber trotzdem ausreichend transkriptionsaktive Komplexe aus (Abb. 19 und 20).

#### **5.2.6.1 Die in vitro-Biotinylierung eignet sich nur bedingt für den Nachweis von Polypeptiden**

Wie sich jedoch bei der Analyse der auf PVDF-Membran transferierten Komplexe herausstellte (s. 3.5.9 und 3.5.7.2), besitzt diese Methode mehrere Nachteile: Zum einen sind dies technische Probleme in Form eines relativ hohen Hintergrundes sowie einer unterschiedlichen Bloteffizienz im oberen und unteren Molekulargewichtsbereich des Gels, so dass nicht alle Polypeptide nachgewiesen werden können (s. Abb. 21 und 22). Zum anderen musste festgestellt werden, dass in den Kontrollläufen mehr biotinylierte Polypeptide nachgewiesen wurden, als nach der bekannten Untereinheiten-Zusammensetzung von TFIIIC2 und TFIIIB hätten detektiert werden dürfen (Abb. 21 und Abb. 22). Das bedeutet, dass diese Methode keine 100%ig zuverlässige Spezifität besitzt und damit die Zuordnung einzelner Polypeptide zu TFIIIC1 ohne weitere Anhaltspunkte nicht möglich ist.

Wie sich bei der Analyse dieser Experimente weiterhin herausstellte, eluierten die freien, nicht in den Transkriptionskomplex integrierten Proteine direkt nach den Komplex-haltigen Fraktionen. Um diese besser von den Transkriptionskomplexen zu trennen und sicherzugehen, dass keine Kontamination stattfinden kann, wurde dazu übergegangen, Transkriptionskomplexe am VA I-Plasmid zu assemblieren und diese über eine S500-Gelfiltration zu isolieren. Hierbei eluieren die freien Proteine im Trennbereich der Säule, während die Transkriptionskomplexe im Ausschlussvolumen erscheinen.

#### **5.2.7 Über eine S500-Gelfiltration lassen sich sowohl vollständige als auch partielle VA I-Transkriptionskomplexe isolieren**

Partielle und vollständige Transkriptionskomplexe am 5S-rRNA-Gen wurden in unserem Labor bereits über S500-Gelfiltration isoliert (RIEMANN, 2002). Daher sollte jetzt versucht werden, VA I-Transkriptionskomplexe unterschiedlicher Zusammensetzung über die S500-Gelfiltration zu isolieren und zu analy-

sieren, um auf diese Weise eventuell Einblicke in die TFIIC1-Untereinheitenstruktur zu erhalten.

#### **5.2.7.1 Analyse der gereinigten VA I-Transkriptionskomplexe**

Abb. 23 B und C demonstriert, dass es möglich ist, sowohl TFIIC2-TFIIB - VA I-Teilkomplexe als auch TFIIC2-TFIIB -TFIIC1-VA I-Teilkomplexe über S500-Gelfiltration zu isolieren und durch die nachträgliche Zugabe von Polymerase III und Nukleotiden sowie, wenn notwendig, TFIIC1 zu transkriptionsaktiven Komplexen zu vervollständigen. D.h. TFIIC1 wird nach der Einbindung von TFIIB in den entstehenden Transkriptionskomplex integriert und bleibt während der S500-Gelfiltration stabil am Komplex gebunden. Ob TFIIC1 allerdings nach Einbindung der Polymerase III und Transkriptionsstart noch integraler Bestandteil des Komplexes ist, ist unklar. Denkbar wäre auch eine Art Hit & Run-Mechanismus, bei dem TFIIC1 die Einbindung der Polymerase III vermittelt, selbst aber aus dem Komplex wieder austritt.

Das Ergebnis, dass TFIIC1 nach der TFIIC2- und TFIIB -Einbindung in den Komplex integriert wird, stimmt sowohl mit den Daten des sequenziellen Aufbaus des 5S-rRNA-Transkriptionskomplexes (RIEMANN, 2002) als auch mit den Daten der über S400-Gelfiltration gereinigten VA I-Transkriptionskomplexe überein (WAGNER, 2002).

Der Gelfiltrationslauf mit vollständigen Transkriptionskomplexen (s. 4.2.10, Abb. 23 A und Abb. 24) zeigt deutlich, dass eine gute Abtrennung der freien Proteine von den im Ausschlussvolumen erscheinenden Komplexen stattfindet und diese Methode somit sehr gut geeignet ist für die Reinigung der vollständigen und partiellen Transkriptionskomplexe.

#### **5.2.8 Identifizierung potentieller TFIIC1-Untereinheiten**

Beim Vergleich des Proteinbandenmusters der Kontrollläufe, bestehend aus TFIIC2-TFIIB -VA I-Teilkomplexen, VA I-Plasmid mit TFIIC1 sowie TFIIC1, TFIIC2 und TFIIB ohne VA I-Plasmid (Abb. 25), mit dem Bandenmuster der TFIIC2-TFIIB -TFIIC1-VA I-Teilkomplexe konnten sechs Polypeptide identifiziert werden, die nur in den TFIIC1-haltigen Teilkomplexen zu finden waren und daher mit TFIIC1 in einen Zusammenhang gebracht werden können.



Diese Polypeptide besitzen eine Größe von etwa 43, 57, 65, 69, 140 und 164 kDa. TFIIIC1 konnte also hiermit zum ersten Mal über seine Funktion identifiziert werden.

Nachdem auf diese Weise die ersten konkreten Hinweise auf die Größe von TFIIIC1-Untereinheiten gegeben waren, wurden alle silbergefärbten SDS-Gele sowie die PVDF-Membranen mit den S400-Transkriptionskomplexen noch einmal in Hinsicht auf Polypeptide vergleichbarer Größe analysiert.

### **5.2.9 Vergleich der im Verlauf der TFIIIC1-Reinigung erhaltenen Ergebnisse zur Polypeptidzusammensetzung von TFIIIC1**

Es konnte für fast jedes der sechs Polypeptide aus Abb. 25 in den nachträglich analysierten SDS-Gelelen und PVDF-Membranen mindestens ein korrespondierendes Polypeptid detektiert werden (siehe Tabelle, 4.2.11). Lediglich für das kleinste Polypeptid (43 kDa) ließ sich kein gleich großes Polypeptid finden. In Abb. 16, in der der Vergleich des zweiten MonoS-Peaks von TFIIIC1 und TFIIIC1-like dargestellt ist, finden sich zwei Polypeptide mit einer Größe von 46 und 47 kDa, möglicherweise entspricht eines von ihnen dem kleinsten Polypeptid aus Abb. 25.

Da es sich bei den analysierten Abbildungen um Experimente handelte, bei denen sowohl TFIIIC1 als auch TFIIIC1-like eingesetzt worden waren und in beiden Fällen Polypeptide vergleichbarer Größe gefunden wurden, scheint es sich bei TFIIIC1-like möglicherweise tatsächlich um eine Subpopulation von TFIIIC1 zu handeln.

Auf den meisten nachträglich analysierten Abbildungen sind erheblich mehr distinkte Banden erkennbar, als letztendlich mit den potentiellen TFIIIC1-Untereinheiten in Abb. 25 in Verbindung gebracht werden können. Im Gegensatz zur Darstellung von TFIIIC1-Untereinheiten als integrale Bestandteile des Initiationskomplexes (Abb. 25) handelt es sich hierbei in den meisten Fällen um klassisch gereinigte Proteinfractionen. Es liegt daher nahe, dass es sich bei dieser Vielzahl an Proteinbanden um zufällig mit der TFIIIC1-Aktivität koeluierende Proteine handelt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass eine der unmarkierten Banden ebenfalls mit TFIIIC1 in einem Zusammenhang steht.

Die genaue Untereinheitenzusammensetzung wird aber erst aufzuklären sein, nachdem wenigstens eine der Untereinheiten isoliert und kloniert wurde.

In dem unter 1.4.3 beschriebenen Holo-TFIIC-Komplex, den WANG & ROEDER 1998 reinigten und der ebenfalls TFIIC1-Aktivität aufwies, identifizierten sie vier Polypeptide mit einer Größe von 40, 45, 50 und 70 kDa, die sie TFIIC1 zuordneten. Da jedoch sowohl die Reinigungsstrategie als auch der experimentelle Ansatz komplett unterschiedlich sind, lassen sich die jeweils gewonnenen Ergebnisse nur äußerst schwer miteinander vergleichen. Bisher konnte jedoch in unserem Labor nie eine Assoziation von TFIIC1 und TFIIC2 beobachtet werden. Weiterhin fragt sich, welchen Sinn eine solche Assoziation haben könnte, da TFIIC2 z.B. für die Expression der 5'-regulierten Gene gar nicht benötigt wird, TFIIC1 aber durchaus.

Da außerdem in der Zwischenzeit keine weiteren Veröffentlichungen von WANG & ROEDER folgten, kann davon ausgegangen werden, dass keine der postulierten TFIIC1-Untereinheiten kloniert werden konnte.

### **5.2.10 Ausblick**

Bei TFIIC1 handelt es sich um einen zentralen Transkriptionsfaktor der Polymerase III, der für die Expression aller Polymerase-III-Gene benötigt wird. Über die in dieser Arbeit dargestellten Experimente zur Isolierung von vollständigen und partiellen Transkriptionskomplexen mit Hilfe von S500-Gelfiltrationsexperimenten ist es in unserem Labor erstmalig gelungen, potentielle Untereinheiten des TFIIC1-Multiproteinkomplexes zu identifizieren.

Für eine Erhärtung dieser Ergebnisse sollten jedoch im nächsten Schritt noch sauberere Ausgangsfractionen für die Assemblierung der Transkriptionskomplexe eingesetzt werden, um zweifelsfreie Erkenntnisse über die Größe möglicher Untereinheiten zu gewinnen. Die konventionelle Reinigung von TFIIC1 und TFIIC1-like über die Ionenaustauscher-Chromatographie bleibt daher sowohl für die Präparation sauberer Ausgangsfractionen für die Assemblierung von Transkriptionskomplexen als auch für die spätere Reinigung der identifizierten Polypeptide in ausreichender Menge im Hinblick auf ihre anschließende Sequenzierung und Klonierung von großer Bedeutung.

## 6 Zusammenfassung

Die humane RNA-Polymerase III synthetisiert kleine, nicht proteinkodierende RNAs, die unterschiedlichen Gengruppen angehören und für deren Herstellung verschiedene Transkriptionsfaktoren benötigt werden. Ein zentraler Transkriptionsfaktor im Polymerase-III-System ist TFIIC1, der für die Expression aller Polymerase-III-abhängigen Gene essentiell benötigt wird. Seine Struktur und Wirkungsweise konnte jedoch bisher nicht aufgeklärt werden.

In dieser Arbeit wurde zunächst die Beziehung von TFIIC1 zu anderen, die Polymerase-III-Transkription stimulierenden Proteinen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass TFIIC1 in keinerlei Zusammenhang mit der Proteinkinase CK2 oder der DNA-Topoisomerase I steht, die beide in anderen experimentellen Systemen einen positiven Einfluss auf die Effizienz der Polymerase-III-Transkription aufgewiesen hatten.

Voraussetzung für ein besseres Verständnis der Wirkungsweise von TFIIC1 ist seine weitere Reinigung bis hin zur Sequenzierung und Klonierung seiner Untereinheiten. Hierfür wurde zunächst nach dem Standard-Protokoll eine Phosphocellulose-Chromatographie durchgeführt, der eine MonoQ-Chromatographie folgte. Als neuer Kationenaustauscher wurde anschließend das MonoS-Säulenmaterial eingesetzt, das zum einen eine sehr gute Reinigungseffizienz zeigte und über das zum anderen zwei verschiedene Formen von TFIIC1 voneinander getrennt werden konnten. Das unterschiedliche chromatographische Verhalten dieser Formen ist vermutlich auf einen unterschiedlichen Modifikationsgrad zurückzuführen. Da auch bei der MonoS-Chromatographie mit TFIIC1-like zwei Aktivitätspeaks gefunden wurden, ist es möglich, dass es sich bei TFIIC1-like um eine Subpopulation von TFIIC1 handelt. Diese besteht wiederum selbst aus zwei unterschiedlichen Formen, so dass man von mindestens vier verschiedenen Formen von TFIIC1 sprechen kann. Ein ergänzender Weg zur Darstellung der Untereinheiten von TFIIC1 bestand in der Assemblierung und Isolierung von vollständigen und partiellen VA I-Transkriptionskomplexen. Hierfür wurden neben Kontroll-Gelfiltrationsläufen TFIIC2-TFIIB -VAI- sowie TFIIC2-TFIIB -TFIIC1-VAI-Teilkomplexe assembliert, die anschließend über eine S500-Gelfiltration von den freien, nicht

in den Komplex integrierten Proteinen abgetrennt wurden. Die isolierten Teilkomplexe konnten durch Zugabe fehlender Faktoren und der Polymerase III vervollständigt werden und zeigten in Anwesenheit von Nukleotiden eine sehr gute Transkriptionsaktivität. Nach Abgleich mit den entsprechenden Kontroll-Gelfiltrationsläufen konnten schließlich sechs potentiell zu TFIIC1 gehörende Untereinheiten in einem silbergefärbten SDS-Gel identifiziert werden; die gefundenen Polypeptide besaßen eine Größe von etwa 43, 57, 65, 69, 140 und 164 kDa. Diese Größen konnten auch durch klassische Chromatographie-Experimente bestätigt werden. In dieser Arbeit ist es also erstmalig gelungen, einzelne, vermutlich zu TFIIC1 gehörende Polypeptide über die Funktion dieses Multiproteinkomplexes zu detektieren.

Wie sich weiterhin bei der Analyse von Gelfiltrationsexperimenten gezeigt hat, besteht die Wirkungsweise von TFIIC1 nicht wie bisher angenommen in der Bindungsverstärkung von TFIIC2 an die DNA, sondern wahrscheinlich in seiner Beteiligung an der Rekrutierung der RNA-Polymerase III.

## 7 Abkürzungen

<b>A</b>	Adenin
<b>AA</b>	Acrylamid
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>A.bid.</b>	Aqua bidest
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BA</b>	N,N-Methylenbisacrylamid
<b>Bp</b>	Basenpaar
<b>BSA</b>	"Bovine Serum Albumin" (Rinderserumalbumin)
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>C</b>	Cytosin
<b>ca.</b>	circa
<b>cDNA</b>	„copy“ DNA
<b>Ci</b>	Curie
<b>cm</b>	Zentimeter
<b>CIP</b>	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm ("calf intestine alkaline phosphatase")
<b>cpm</b>	"counts per minute" (Impulse pro Minute)
<b>CTP</b>	Cytidintriphosphat
<b>Da</b>	Dalton
<b>DC</b>	DNA-Cellulose (single strand)
<b>DEAE</b>	Diethylaminoethan
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure ("acid")
<b>DNase</b>	Desoxyribonuklease
<b>dNTP</b>	Desoxynukleosidtriphosphat
<b>DSE</b>	Distales Sequenzelement
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EBER-RNA</b>	Epstein-Barr-Virus assoziierte RNA
<b>ECL</b>	"Enhance Chemolumineszenz"
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Eschericia coli</i>
<b>EDF</b>	EMD-DEAE Fractogel 650S
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EGTA</b>	1,2-Bis-(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-tetraacetat
<b>EMSA</b>	"Electrophoretic mobility shift assay"
<b>et al.</b>	„et aliter“ (und andere)
<b>Fc</b>	"Fragment crystallizable" (Immunglobulin-Fragment)
<b>FKS</b>	Fötales Kälberserum
<b>FPLC</b>	"Fast Performance Liquid Chromatography"
<b>g</b>	Erdbeschleunigung
<b>g</b>	Gramm
<b>G</b>	Guanin
<b>GF</b>	Gelfiltration
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>h</b>	human
<b>HEK</b>	"human embryonic kidney"
<b>HeLa</b>	Zelllinie eines humanen Cervix-Karzinoms

<b>Hepes</b>	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
<b>HIC</b>	hydrophobe Interaktions-Chromatographie
<b>hnRNA</b>	heterogen nukleäre RNA
<b>ICR</b>	"internal control region"
<b>IE</b>	"intermediate element"
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IPTG</b>	Isopropyl-thio- $\beta$ -galactosid
<b>kB</b>	Kilobasen
<b>kDa</b>	Kilo-Dalton (Masseneinheit)
<b>KE</b>	Kernextrakt
<b>LB-Medium</b>	Luria-Bertoni-Medium
<b>Lsg.</b>	Lösung
<b>M</b>	molar
<b>mA</b>	Milliampère
<b>mg</b>	Milligramm
<b><math>\mu</math>g</b>	Mikrogramm
<b>ml</b>	Milliliter
<b><math>\mu</math>l</b>	Mikroliter
<b>mM</b>	Millimolar
<b><math>\mu</math>M</b>	Mikromolar
<b>MQ / MS</b>	Mono Q / Mono S
<b>mRNA</b>	Boten-RNA ("messenger" RNA)
<b>ng</b>	Nannogramm
<b>NTP</b>	Nukleosidtriphosphat
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>PBP</b>	PSE-bindendes Protein
<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte Salzlösung („phosphate-buffered-saline“)
<b>PC</b>	Phosphocellulose
<b>PC4</b>	„Positive Cofactor 4“
<b>PCI</b>	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch
<b>PCR</b>	Polymerase Kettenreaktion ("polymerase chain reaction")
<b>PCV</b>	"packed cell volume"
<b>PEG</b>	Polyethylenglykol
<b>pH</b>	Wasserstoffexponent (neg. dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonylfluorid
<b>Pol I, II und III</b>	RNA Polymerase I, II, und III
<b>Poly-(dIdC)</b>	Poly-( desoxyinosin-desoxycytidin)
<b>PP</b>	Polypeptid
<b>PSE</b>	Proximales Sequenzelement
<b>QS</b>	Q Sepharose
<b>r</b>	rekombinant
<b>RA</b>	Retardation Assay (EMSA)
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RNase</b>	Ribonuklease
<b>rRNA</b>	ribosomale RNA
<b>RNP</b>	„Ribonucleoprotein Particle“
<b>RPC</b>	RNA Polymerase C (III) (Untereinheit der Pol III)

<b>rRNA</b>	ribosomale RNA
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>S</b>	Svedberg-Einheit (Sedimentationskoeffizient)
<b>s.</b>	siehe
<b><i>S. cerevisiae</i></b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Bäckerhefe)
<b>SEC</b>	Size Exclusion Chromatography
<b>s.o.</b>	siehe oben
<b>s.u.</b>	siehe unten
<b>S100</b>	zytoplasmatischer Zellextrakt
<b>SDS</b>	Natrium- ("sodium-") Dodecylsulfat
<b>sek.</b>	Sekunde
<b>SL1</b>	Selektivitätsfaktor 1
<b>SNAPc</b>	„snRNA-activating protein complex“
<b>snRNA</b>	„small nuclear RNA“
<b>snRNP</b>	„small nuclear ribonucleotide particles“
<b>Sp</b>	"stimulating protein" (stimulierendes Protein)
<b>SV</b>	Säulenvolumen / Säulenvolumina
<b>T</b>	Thymin
<b>TAF</b>	TBP assoziierter Faktor
<b>TBA</b>	Terminationsregion bindende Aktivität
<b>TBE</b>	Tris-Borat-EDTA-Puffer
<b>TBP</b>	TATA-Box-bindendes Protein
<b>TCA</b>	Trichloressigsäure
<b>TE</b>	Tris-EDTA-Puffer
<b>TEMED</b>	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
<b>TFI, II, und III</b>	Transkriptionsfaktor der RNA-Polymerase I, II und III
<b>™</b>	„Trademark“
<b>Tris</b>	Tris-hydroxy-ethyl-aminomethan
<b>tRNA</b>	„transfer“ RNA
<b>TTFI</b>	„transcription termination factor“ 1
<b>Tween</b>	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
<b>U</b>	Unit (Einheit der jeweiligen Enzymaktivität)
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>UpM</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>UTP</b>	Uridintriphosphat
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>v/v</b>	Volumen/Volumen ("volume per volume")
<b>V</b>	Volt (Maß für elektrische Spannung)
<b>Vol.</b>	Volumen
<b>VA RNA</b>	virus-assoziierte RNA (hier: nur VA I RNA des Adenovirus)
<b>VT</b>	Volumenteile
<b>W</b>	Watt
<b>w/v</b>	Gewicht/Volumen ("weight per volume")
<b>X-Gal</b>	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-_-D-Galaktosid
<b><i>X.l.</i></b>	<i>Xenopus laevis</i>
<b>y</b>	"yeast" (Hefe)
<b>z. B.</b>	zum Beispiel
<b>°C</b>	Grad Celsius

## 8 Literaturverzeichnis

- Allende, J. E. & Allende, C. C. (1995).** Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation. *FASEB J.*, **9**, 313-323
- Andrau, J.-C., Sentenac, A. und Werner, M. (1999).** Mutagenesis of yeast TFIIIB70 reveals C-terminal residues critical for interaction with TBP and C34. *J. Mol. Biol.* **288**, 511-520
- Baer, M., Nielsen, T. W., Costigan, C. & Altmann, S. (1989).** Structure of a human gene for H1 RNA, the RNA component of human RNase P. *Nucl. Acids Res.*, **18**, 97-103.
- Ballard, D. W., Philbrick, W. M. & Bothwell, A. L. M. (1988).** Identification of a novel 9-kDa polypeptide from nuclear extracts. *J. Biol. Chem.*, **263**, 8450-8457.
- Bardeleben, C., Kassavetis, G. A. & Geiduschek, E. P. (1994).** Encounters of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III with its transcription factors during RNA chain elongation. *J Mol Biol* **235**, 1193-1205.
- Bartholomew, B., Kassavetis, G. A., Braun, B. R. & Geiduschek, E. P. (1990).** The subunit structure of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor IIIC probed with a novel photo-crosslinking reagent. *Embo J* **9**, 2197-2205.
- Bartholomew, B., Kassavetis, G. A. & Geiduschek, E. P. (1991).** Two components of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor IIIB (TFIIIB) are stereospecifically located upstream of a tRNA gene and interact with the second-largest subunit of TFIIIC. *Mol Cell Biol* **11**, 5181-5189.
- Bernards, R., Schackelford, G. M., Gerber, M. R., Horowitz, J. M., Friend, S. H., Scharl, M., Bogenmann, E., Rapaport, J. M., McGee, T. & Dryja, T. P. (1989).** Structure and expression of the murine retinoblastoma gene and characterization of its encoded protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6474-6478.
- Bieker, J. J., Martin, P. L. & Roeder, R. G. (1985).** Formation of a rate-limiting intermediate in 5S RNA gene transcription. *Cell* **40**, 119-127.
- Blum, H., Beier, H. & Gross, H. (1987).** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- Bobkova, E. V. & Hall, B. D. (1997).** Substrate specificity of the RNase activity of yeast RNA polymerase III. *J Biol Chem* **272**, 22832-22839.
- Bogenhagen, D. F., Sakonju, S. & Brown, D. D. (1980).** A control region in the center of the 5S RNA gene directs specific initiation of transcription: II. The 3' border of the region. *Cell* **19**, 27-35.
- Bogenhagen, D. F. & Brown, D. D. (1981).** Nucleotide sequences in *Xenopus* 5S DNA required for transcription termination. *Cell* **24**, 261-270.
- Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramm quantities of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Braun, B. R., Riggs, D. L., Kassavetis, G. A. & Geiduschek, E. P. (1989).** Multiple states of protein-DNA interaction in the assembly of transcription complexes on *Saccharomyces cerevisiae* 5S ribosomal RNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2530-2534.
- Brethnach R. & Chambon, P. (1981).** Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *Ann. Rev. Biochem.*, **50**, 349-383.



- Brun, I., Sentenac, A. und Werner, M. (1997).** Dual role of the C34 subunit of RNA polymerase III in transcription initiation. *EMBO J.* **16**, 5730-5741
- Buratowski, S. & Zhou, H. (1992).** A suppressor of TBP mutations encodes an RNA polymerase III transcription factor with homology to TFIIB. *Cell* **71**, 221-230.
- Buratowski, S. (1994).** The basics of basal transcription by RNA polymerase II. *Cell* **77**, 1-3.
- Cabart, P., & Murphy, S. (2001).** BRFU, a TFIIB-like factor, is directly recruited to the TATA-box of polymerase III small nuclear RNA gene promoters through its interaction with TATA-binding protein. *J. Biol. Chem.*, **276**, 43056-43064.
- Cabart, P., & Murphy, S. (2002).** Assembly of human small nuclear RNA gene-specific transcription factor IIIB complex *de Novo* on and off promoter. *J. Biol. Chem.*, **277**, 26831-26838.
- Campbell, F. E., Jr. & Setzer, D. R. (1992).** Transcription termination by RNA polymerase III: uncoupling of polymerase release from termination signal recognition. *Mol Cell Biol* **12**, 2260-2272.
- Chambon, P. (1975).** Eukaryotic nuclear RNA polymerases. *Ann. Rev Biochem* **44**, 613-638.
- Chargaff, E. (1955)** Isolation and composition of the desoxyribose nucleic acid and the corresponding nuclear proteins. *Nucl. Acids Res.* **1**, 307-407.
- Chaussivert, N., Conesa, C., Shaaban, S. und Sentenac, A. (1995).** Complex interactions between yeast TFIIB and TFIIC. *J. Biol. Chem.* **270**, 15353-15358
- Chedin, S., Riva, M., Schultz, P., Sentenac, A. & Carles, C. (1998).** The RNA cleavage activity of RNA polymerase III is mediated by an essential TFIIS-like subunit and is important for transcription termination. *Genes Dev* **12**, 3857-3871.
- Chellappan, S. P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J. M. & Nevins, J. R. (1991).** The E2F transcription factor is a cellular target for the Rb protein. *Cell* **65**, 1053-1061.
- Ciliberto, G., Raugei, G., Costanzo, F., Dente, L. & Cortese, R. (1983).** Common and interchangeable elements in the promoters of genes transcribed by RNA polymerase III. *Cell* **32**, 725-733.
- Clemens, K. R., Wolf, V., McBryant, S. J., Zhang, P., Liao, X., Wright, P. E. & Gottesfeld, J. M. (1992).** Molecular basis for specific recognition of both RNA and DNA by a zinc finger protein. *Science*, **260**, 530-533.
- Colbert, T. & Hahn, S. (1992).** A yeast TFIIB-related factor involved in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev.*, **6**, 1940-1949.
- Comai, L., Tanese, N. & Tijan, R. (1992).** The TATA-binding and associated factors are integral components of RNA polymerase I transcription factor SL1. *Cell.*, **68**, 161-190.
- Conaway, R. C. & Conaway, J. W. (1993).** General initiation factors of RNA polymerase II. *Ann. Rev. Biochem.*, **65**, 161-190.
- Courey, A. J. & Tijan, R. (1988).** Analysis of Sp1 *in vivo* reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine rich activation motif. *Cell*, **55**, 887-898.
- Dagert M, Ehrlich SD (1979).** Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells. *Gene.* **6**, 23-8.

- Dahlberg, J. & Lund, E. (1988).** Genes and transcription of the major snRNAs. In *Structure and function of major and minor small nuclear ribonucleoprotein particles*, pp. 38-70. Edited by B. M.L. Heidelberg: Springer Verlag.
- Dean, N. & Berk, A. J. (1987).** Separation of TFIIC into two functional components by sequence specific DNA affinity chromatography. *Nucleic Acids Res* **15**, 9895-9907.
- Dean, N. & Berk, A. J. (1988).** Ordering promoter binding of class III transcription factors TFIIC1 and TFIIC2. *Mol Cell Biol* **8**, 3017-3025.
- DelRio, S., Menezes, S. R. & Setzer, D. R. (1993).** The function of individual zinc fingers in sequence-specific DNA recognition by transcription factor IIIA. *J. Mol. Biol.*, **233**, 567-579.
- Deprez, E., Arrebola, R., Conesa, C. & Sentenac, A. (1999).** A subunit of yeast TFIIC participates in the recruitment of TATA-binding protein. *Mol Cell Biol* **19**, 8042-8051.
- Dieci, G., Duimio, L., Coda-Zabetta, F., Sprague, K. U. & Ottonello, S. (1993).** A novel RNA polymerase III transcription factor fraction that is not required for template commitment. *J Biol Chem* **268**, 11199-11207.
- Dieci, G., Hermann-Le Denmat, S., Lukhtanov, E., Thuriaux, P., Werner, M. & Sentenac, A. (1995).** A universally conserved region of the largest subunit participates in the active site of RNA polymerase III. *EMBO J.* **14**, 3766-3776
- Dieci, G. & Sentenac, A. (1996).** Facilitated recycling pathway for RNA polymerase III. *Cell* **84**, 245-252.
- Engelke, D.R., Ng, S.-Y., Shastry, B.S. und Roedder, R.G. (1980).** Specific interaction of a purified transcription factor with an internal control region of 5S genes. *Cell* **19**, 717-728.
- Farnham, P. J., Slansky, J. E. & Kollmar, R. (1993).** The role of E2F in the mammalian cell cycle. *Biochem. Biophys. Acta*, **1155**, 125-131.
- Ferri, M.-L., Peyroche, G., Siaux, M., Lefebvre, O., Carles, C., Conesa, C. & Sentenac, A. (2000).** A novel subunit of yeast RNA polymerase III interacts with the TFIIB-related domain of TFIIB70. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 488-495
- Fowlkes, D.M. & Schenk, T. (1980).** Transcriptional control regions of the adenovirus VAI RNA gene. *Cell* **22**, 405-413
- Fradkin, L. G., Yoshinaga, S. K., Berk, A. J. & Dasgupta, A. (1989).** Human transcription factor TFIIC2 specifically interacts with a unique sequence in the *Xenopus laevis* 5S rRNA gene. *Mol Cell Biol* **9**, 4941-4950.
- Gabrielsen, O. S. & Sentenac, A. (1991).** RNA polymerase III (C) and its transcription factors. *Trends Biochem Sci* **16**, 412-416.
- Garg, L. C., DiAngelo, S. & Jacob, S. T. (1987).** Role of DNA topoisomerase I in the transcription of supercoiled rRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 3185-3188.
- Ge, H. & Roeder, R. G. (1994).** Purification, cloning and characterization of a human co-activator, PC4, that mediates transcriptional activation of class II genes. *Cell*, **78**, 513-523.
- Geiduschek, E. P. & Kassavetis, G. A. (2001).** The RNA polymerase III Transcription Apparatus. *J. Mol. Biol.*, **310**, 1-26.
- Geiduschek, E. P. & Tocchini-Valentini, G. P. (1988).** Transcription by RNA polymerase III. *Annu Rev Biochem* **57**, 873-914.

- Geiduschek, E. P. & Kassavetis, G. A. (1992).** RNA polymerase III transcription complexes. In *Transcriptional Regulation*, pp. 247-280. Edited by S. L. McKnight & M. Yamamoto. New York: Cold Spring Harbor Press.
- Ginsberg, A.M., King, B.O. & Roeder, R.G. (1984).** *Xenopus* 5S gene transcription factor, TFIIIA: Characterization of a cDNA clone and measurement of RNA levels throughout development. *Cell* **39**, 479-489
- Grummt, I. (1981).** Specific transcription of mouse ribosomal DNA in a cell-free system that mimics control in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, **78**, 727-731.
- Guilfoyle, R. & Weinmann, R. (1981).** Control region for adenovirus VA RNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3378-3382
- Haertel, F. (1999).** Untersuchungen zur Regulation RNA-Polymerase III transkribierter Gene während der G0-Phase des Zellzyklus. In *Fachbereich Humanmedizin*. Marburg: Philipps-Universität.
- Henry, R. W., Ma, B., Sadowski, C. L., Kobayashi, R. & Hernandez, N. (1996).** Cloning and characterization of SNAP50, a subunit of the snRNA-activating protein complex SNAPc. *Embo J* **15**, 7129-7136.
- Hernandez, N. (1992).** Transcription of vertebrate snRNA genes and related genes. In *Transcriptional Regulation*, pp. 281-314. Edited by S. L. McKnight & M. Yamamoto. New York: Cold Spring Harbor Press.
- Hernandez, N. (1993).** TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes Dev* **7**, 1291-1308.
- Hiebert, S. W., Chellappan, S. P., Horowitz, J. M. & Nevins, J. R. (1992).** The interaction of Rb with E2F coincides with inhibition of the transcriptional activity of E2F. *Genes Dev.*, **6**, 177-185.
- Hoeffler, W. K., Kovelman, R. & Roeder, R. G. (1988).** Activation of transcription factor III C by the adenovirus E1A protein. *Cell* **53**, 907-920.
- Hoffman, A., Sinn, E., Yamamoto, T., Wang, J., Roy, A., Horikoshi, M. & Roeder, R. G. (1990).** Highly conserved core domain and unique N terminus with presumptive regulatory motifs in a human TATA factor (TFIID). *Nature* **346**, 387-390.
- Hofstetter, H., Kressman, A. & Birnstiel, M.L. (1981).** A split promoter for a eucaryotic tRNA gene. *Cell*, **24**, 573-585
- Horikoshi, M., Bertuccioli, C., Takada, R., Wang, J., Yamamoto, T. & Roeder, R. G. (1992).** Transcription factor TFIID induces DNA bending upon binding to the TATA element. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**, 1060-1064.
- Hsieh, Y. J., Kundu, T. K., Wang, Z., Kovelman, R. & Roeder, R. G. (1999a).** The TFIIC90 subunit of TFIIC interacts with multiple components of the RNA polymerase III machinery and contains a histone-specific acetyltransferase activity. *Mol Cell Biol* **19**, 7697-7704.
- Hsieh, Y. J., Wang, Z., Kovelman, R. & Roeder, R. G. (1999b).** Cloning and characterization of two evolutionarily conserved subunits (TFIIC102 and TFIIC63) of human TFIIC and their involvement in functional interactions with TFIIB and RNA polymerase III. *Mol Cell Biol* **19**, 4944-4952.
- Huang, Y. & Maraia, R. J. (2001).** Comparison of the RNA polymerase III transcription machinery in *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* and human. *Nucleic Acids Res* **29**, 2675-2690.

- Huet, J. & Sentenac, A. (1992).** The TATA-binding protein participates in TFIIIB assembly on tRNA genes. *Nucleic Acids Res* **20**, 6451-6454.
- Johnston, I. M., Allison, S. J., Morton, J. P., Schramm, L., Scott, P. H. & White, R. J. (2002).** CK2 forms a stable complex with TFIIIB and activates RNA polymerase III transcription in human cells. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 3757-3768.
- Ittmann M, Ali J, Greco A, Basilico C. (1993)** The gene complementing a temperature-sensitive cell cycle mutant of BHK cells is the human homologue of the yeast RPC53 gene, which encodes a subunit of RNA polymerase C (III). *Cell Growth Differ.* **4**, 503-11.
- Kaiser, K., Stelzer, G. & Meisterernst, M. (1995).** The coactivator p15 (PC4) initiates transcriptional activation during TFIIA-TFIIID-promoter complex-formation. *EMBO J.*, **14**, 3520-3527.
- Kaiser, K. & Meisterernst, M. (1996).** The human general co-factors. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 342-345.
- Kao, C. C., Lieberman, P. M., Schmidt, M. C., Zhou, Q., Pei, R. & Berk, A. J. (1990).** Cloning of a transcriptionally active human TATA binding factor. *Science* **248**, 1646-1650.
- Kassavetis, G. A., Riggs, D. L., Negri, R., Nguyen, L. H. & Geiduschek, E. P. (1989).** Transcription factor IIIB generates extended DNA interactions in RNA polymerase III transcription complexes on tRNA genes. *Mol Cell Biol* **9**, 2551-2566.
- Kassavetis, G. A., Braun, B. R., Nguyen, L. H. & Geiduschek, E. P. (1990).** S. cerevisiae TFIIIB is the transcription initiation factor proper of RNA polymerase III, while TFIIIA and TFIIIC are assembly factors. *Cell* **60**, 235-245.
- Kassavetis, G. A., Bartholomew, B., Blanco, J. A., Johnson, T. E. & Geiduschek, E. P. (1991).** Two essential components of the Saccharomyces cerevisiae transcription factor TFIIIB: transcription and DNA-binding properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7308-7312.
- Kassavetis, G. A., Blanco, J. A., Johnson, T. E. & Geiduschek, E. P. (1992a).** Formation of open and elongating transcription complexes by RNA polymerase III. *J Mol Biol* **226**, 47-58.
- Kassavetis, G. A., Joazeiro, C. A., Pisano, M., Geiduschek, E. P., Colbert, T., Hahn, S. & Blanco, J. A. (1992b).** The role of the TATA-binding protein in the assembly and function of the multisubunit yeast RNA polymerase III transcription factor, TFIIIB. *Cell* **71**, 1055-1064.
- Kassavetis, G. A., Nguyen, S. T., Kobayashi, R., Kumar, A., Geiduschek, E. P. & Pisano, M. (1995).** Cloning, expression, and function of TFC5, the gene encoding the B" component of the Saccharomyces cerevisiae RNA polymerase III transcription factor TFIIIB. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9786-9790.
- Khoo, B., Brophy, B. und Jackson, S.P. (1994).** Conserved functional domains of the RNA polymerase III general transcription factor BRF. *Genes Dev* **8**, 2879-2890
- Kim, Y., Geiger, J. H., Hahn, S. & Sigler, P. B. (1993).** Crystal structure of a yeast TBP/ TATA-box complex. *Nature* **365**, 512-520.
- Kiss, T., Marshallsay, C. & Filipowicz, W. (1991).** Alteration of the RNA-polymerase specificity of U3 snRNA genes during evolution and *in vitro*. *Cell*, **65**, 517-526.
- Knippers, R. (1997).** Molekulare Genetik. Georg Thieme Verlag, S. 382.
- Kober, I., Teichmann, M. & Seifart, K. H. (1998).** hTFIIIB-beta stably binds to pol II promoters and recruits RNA polymerase III in a hTFIIIC1 dependent way. *J Mol Biol* **284**, 7-20.

- Kovelman, R. & Roeder, R. G. (1990).** Sarkosyl defines three intermediate steps in transcription initiation by RNA polymerase III: application to stimulation of transcription by E1A. *Genes Dev* **4**, 646-658.
- Kovelman, R. & Roeder, R. G. (1992).** Purification and characterization of two forms of human transcription factor III<sub>C</sub>. *J Biol Chem* **267**, 24446-24456.
- Kouzarides, T. (1993).** Transcriptional regulation by the retinoblastoma protein. *Trends Cell. Bio.*, **3**, 211-213.
- Kretzschmar, M., Meisterernst, M. & Roeder, R. G. (1993).** Identification of human DNA topoisomerase I as a cofactor for activator-dependent transcription by RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11508-11512.
- Kretzschmer, M., Kaiser, K., Lottspeich, F. & Meisterernst, M. (1994).** A novel mediator of class II gene transcription with homology to viral immediate-early transcriptional regulators. *Cell* **78**, 525-534.
- Kunkel, G. R. (1991).** RNA polymerase III transcription of genes that lack internal control regions. *Biochim Biophys Acta* **1088**, 1-9.
- Kyhse-Andersen J. (1984).** Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*. **10**, 203-9.
- Laemmli UK (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680-5.
- Lagna, G., Kovelman, R., Sukegawa, J. & Roeder, R. G. (1994).** Cloning and characterization of an evolutionarily divergent DNA-binding subunit of mammalian TFIIIC. *Mol Cell Biol* **14**, 3053-3064.
- La Thangue, N. B. (1994).** DRTF1/E2F: an expanding family of heterodimeric transcription factors implicated in cell-cycle control. *Trends. Biochem. Sci.*, **19**, 108-114.
- Lassar, A. B., Martin, P. L. & Roeder, R. G. (1983).** Transcription of class III genes: formation of preinitiation complexes. *Science* **222**, 740-748.
- Lee, W.-H., Shew, J.-Y., Hong, F. D., Sery, T. W., Donoso, L. A., Young, L. J., Bookstein, R. & Lee, E. Y.-H. (1987).** The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity. *Nature*, **329**, 642-645.
- Lee, E. Y.-H., Bookstein, R., Young, L. J., Lin, C. J., Rosenfeld, M. G. & Lee, W. H. (1988).** Molecular mechanism of retinoblastoma gene inactivation in retinoblastoma cell line Y79. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 6017-6021.
- Lee, D. K., Horikoshi, M. & Roeder, R. G. (1991).** Interaction of TFIID in the minor groove of the TATA element. *Cell* **67**, 1241-1250.
- Lees, J. A., Saito, M., Vidal, M., Valentine, M., Look, T., Harlow, E., Dyson, N. & Helin, K. (1993).** The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 7813-7825.
- L'Etoile, N.D., Fahnenstock, M.L., Shen, Y., Aebbershold, R. & Berk, A.J. (1994).** Human transcription factor III<sub>C</sub> box B binding subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1652-1656
- Lewin, B. (2000).** *Genes VII*. New York: Oxford University Press.

- Liao, X., Clemens, K. R., Tennant, L. & Wright, P. E. (1992).** Specific interaction of the first three zinc fingers of TFIIIA with the internal control region of the *Xenopus* 5S RNA gene. *J. Mol. Biol.*, **223**, 857-871.
- Litchfield, D. W. & Luscher, B. (1993).** Casein kinase II in signal transduction and cell cycle regulation. *Mol. Cell. Biol.*, **12**/128: 187-199.
- Lobo, S. M., Ifill, S. & Hernandez, N. (1990).** cis-acting elements required for RNA polymerase II and III transcription in the human U2 and U6 snRNA promoters. *Nucleic Acids Res* **18**, 2891-2899.
- López-De-León, A., Librizzi, M., Puglia, K. & Willis, I.M. (1992).** PCF4 encodes an RNA polymerase III transcription factor with homology to TFIIIB. *Cell* **71**, 211-220
- Ma, B. & Hernandez, N. (2002).** Redundant cooperative interactions for assembly of a human U6 transcription initiation complex. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 8067-8078.
- Marzouki, N., Camier, S., Ruet, A., Moenne, A. & Sentenac, A. (1986).** Selective proteolysis defines two DNA binding domains in yeast transcription factor tau. *Nature* **323**, 176-178.
- Matsui T, Segall J, Weil PA, Roeder RG (1980).** Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II. *J Biol Chem.* **255**, 11992-6.
- Matsuzaki, H., Kassavetis, G. A. & Geiduschek, E. P. (1994).** Analysis of RNA chain elongation and termination by *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III. *J Mol Biol* **235**, 1173-1192.
- Merino, A., Madden, K. R., Lane, W. S., Champoux, J. J. & Reinberg, D. (1993).** DNA topoisomerase I is involved in both repression and activation of transcription. *Nature*, **365**, 227-232.
- Meissner, W., Thomae, R. & Seifart, K. H. (2002).** The activity of transcription factor III C1 is impaired during differentiation of F9 cells. *J Biol Chem* **277**, 7148-7156.
- Miller, J., McLachlan, A. D. & Klug, A. (1985).** Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *Embo J* **4**, 1609-1614.
- Mittal, V. & Hernandez, N. (1997).** Role of the amino-terminal region of human TBP in U6 snRNA transcription. *Science.*, **275**, 1136-1140.
- Modrow, S. & Falke, D. (1997).** Molekulare Virologie. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Moorefield, B. & Roeder, R. G. (1994).** Purification and characterization of human transcription factor IIIA. *J Biol Chem* **269**, 20857-20865.
- Moss, T. & Stefanovsky, V. Y. (1995).** Promotion and regulation of ribosomal transcription in eukaryotes by RNA polymerase I. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **50**, 25-66.
- Murphy, S., Yoon, J. B., Gerster, T. & Roeder, R. G. (1992).** Oct-1 and Oct-2 potentiate functional interactions of a transcription factor with the proximal sequence element of small nuclear RNA genes. *Mol Cell Biol* **12**, 3247-3261.
- Nevins, J. R. (1992).** E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Cell* **67**, 1241-1250.
- Nielsen, J. N., Hallenberg, C., Frederiksen, S., Sorensen, P. D. & Lomholt, B. (1993).** Transcription of human 5S rRNA genes is influenced by an upstream DNA sequence. *Nucleic Acids Res* **21**, 3631-3636.

- Oettel, S. (1994).** Isolierung und Charakterisierung von Komponenten der PC-Fraktion, die die Aktivität des Transkriptionsfaktors TFIIIC beeinflussen. In *Fachbereich Humanmedizin*. Marburg: Philipps-Universität.
- Oettel, S., Hartel, F., Kober, I., Iben, S. & Seifart, K. H. (1997).** Human transcription factors IIC2, IIC1 and a novel component IIC0 fulfil different aspects of DNA binding to various pol III genes. *Nucleic Acids Res* **25**, 2440-2447.
- Oettel, S., Kober, I. & Seifart, K. H. (1998).** The activity binding to the termination region of several pol III genes represents a separate entity and is distinct from a novel component enhancing U6 snRNA transcription. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 4324-4331.
- Palmer, J. M. & Folk, W. R. (1990).** Unraveling the complexities of transcription by RNA polymerase III. *Trends Biochem Sci* **15**, 300-304.
- Paule, M. R. & White, R. J. (2000).** Transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res.*, **28**, No. 6, 1283-1298.
- Persinger, J., Sengupta, S. M. & Bartholomew, B. (1999).** Spatial organization of the core region of yeast TFIIIB-DNA complexes. *Mol Cell Biol* **19**, 5218-5234.
- Pieler, T., Oei, S. L., Hamm, J., Engelke, U. & Erdmann, V. A. (1985a).** Functional domains of the *Xenopus laevis* 5S gene promoter. *Embo J* **4**, 3751-3756.
- Pieler, T., Appel, B., Oei, S. L., Mentzel, H. & Erdmann, V. A. (1985b).** Point mutational analysis of the *Xenopus laevis* 5S gene promoter. *Embo J* **4**, 1847-1853.
- Pieler, T., Hamm, J. & Roeder, R. G. (1987).** The 5S gene internal control region is composed of three distinct sequence elements, organized as two functional domains with variable spacing. *Cell* **48**, 91-100.
- Reeder, R.H. (1992).** Regulation of transcription by RNA-polymerase I. In: Transcriptional regulation (eds.: McKnight, S. L. & Yamamoto, K.R.). *Cold Spring Harbor Press, New York*, pp. 315-348.
- Riemann, J. (2002).** Untersuchungen der Transkription und des sequentiellen Aufbaus des Transkriptionskomplexes am humanen 5S-Gen. In *Fachbereich Medizin*. Marburg: Philipps-Universität.
- Roberts, S., Colbert, T. & Hahn, S. (1995).** TFIIIC determines RNA polymerase III specificity at the TATA-containing yeast U6 promoter. *Genes Dev* **9**, 832-842.
- Roberts, S., Miller, S. J., Lane, W. S., Lee, S. & Hahn, S. (1996).** Cloning and functional characterization of the gene encoding the TFIIIB90 subunit of RNA polymerase III transcription factor TFIIIB. *J Biol Chem* **271**, 14903-14909.
- Roeder, R. G. & Rutter, W. J. (1969).** Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms. *Nature* **224**, 234-237.
- Roeder, R. G. (1976).** Eukaryotic nuclear RNA polymerases. In: "RNA polymerase" (eds.: Losick, R. & Chamberlin, M.) *Cold Spring Harbor Press, New York*, pp. 285-329.
- Roeder, R. G. (1996).** The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* **21**, 327-335.
- Rosa, M.D., Gottlieb, E., Lerner, M.R. & Steitz, J.A. (1981).** Striking similarities are exhibited by small Epstein-Barr virus-encoded ribonucleic acids and the adenovirus-associated ribonucleic acids VAI and VAII. *Mol. Cell. Biol.* **1**, 785-796

- Rüth, J., Conesa, C., Dieci, G., Lefebvre, O., Dusterhoft, A., Ottonello, S. & Sentenac, A. (1996). A suppressor of mutations in the class III transcription system encodes a component of yeast TFIIIB. *Embo J* **15**, 1941-1949.
- Sadhale, P.P. & Woychik, N.A. (1994). C25, an essential RNA polymerase III subunit related to the RNA polymerase II subunit RPB7. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 6164-6170
- Sadowski, C. L., Henry, R. W., Lobo, S. M. & Hernandez, N. (1993). Targeting TBP to a non-TATA box cis-regulatory element: a TBP-containing complex activates transcription from snRNA promoters through the PSE. *Genes Dev* **7**, 1535-1548.
- Sakonju, S., Bogenhagen, D. F. & Brown, D. D. (1980). A control region in the center of the 5S RNA gene directs specific initiation of transcription: I. The 5' border of the region. *Cell* **19**, 13-25.
- Sawadago, M. & Sentenac, A. (1990). RNA polymerase B (II) and general transcription factors. *Ann. Rev. Biochem.*, **59**, 711-754.
- Schneider, H. R., Waldschmidt, R., Jahn, D. & Seifart, K. H. (1989). Purification of human transcription factor IIIC and its binding to the gene for ribosomal 5S RNA. *Nucleic Acids Res* **17**, 5003-5016.
- Schramm, L., Pendergrast, P. S., Sun, Y. & Hernandez, N. (2000). Different human TFIIIB activities direct RNA polymerase III transcription from TATA-containing and TATA-less promoters. *Genes Dev* **14**, 2650-2663.
- Schramm, L. & Hernandez, N. (2001). Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev* **16**, 2593-2620.
- Schwartz LB, Sklar VE, Jaehning JA, Weinmann R, Roeder RG (1974). Isolation and partial characterization of the multiple forms of deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase in the mouse myeloma, MOPC 315. *J Biol Chem.* **249**, 5889-97.
- Segall, J., Matsui, T. & Roeder, R. G. (1980). Multiple factors are required for the accurate transcription of purified genes by RNA polymerase III. *J Biol Chem* **255**, 11986-11991.
- Seifart, K. H. & Sekeris, C. E. (1969). Alpha-amanitin, a specific inhibitor of transcription by mammalian RNA-polymerase. *Z Naturforsch B* **24**, 1538-1544.
- Seifart, K. H., Benecke, B. J. & Juhasz, P. P. (1972). Multiple RNA-polymerase species from rat-liver tissue: possible existence of a cytoplasmatic enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, **151**, 519-532.
- Seifart, K. H., Wang, L., Waldschmidt, R., Jahn, D. & Wingender, E. (1989). Purification of human transcription factor IIIA and its interaction with a chemically synthesized gene encoding human 5 S rRNA. *J Biol Chem* **264**, 1702-1709.
- Sentenac, A., Riva, M., Thuriaux, P., Buhler, J.-M., Treich., I., Carles, C., Werner, M., Ruet, A., Huet, J., Mann, C., Chiannikulchai, N., Stettler, S. & Mariotte, S. (1992). Yeast RNA polymerase subunits and genes. In: Transcriptional Regulation (Hrsg. S.L. McKnight und K.R. Yamamoto) S. 27-54, *Cold Spring Harbor Press, New York*
- Shaaban, S. A., Bobkova, E. V., Chudzik, D. M. & Hall, B. D. (1996). In vitro analysis of elongation and termination by mutant RNA polymerases with altered termination behavior. *Mol Cell Biol* **16**, 6468-6476.
- Shapiro DJ, Sharp PA, Wahli WW, Keller MJ (1988). A high-efficiency HeLa cell nuclear transcription extract. *DNA.* **7**, 47-55.
- Sharp, P. A. (1992). TATA-binding protein is a classless factor. *Cell* **68**, 819-821.



- Shykind, B. M., Kim, J., Steward, L., Champoux, J. J. & Sharp, P. A. (1997).** Topoisomerase I enhances TFIIID-TFIIA complex assembly during activation of transcription. *Genes Dev.*, **11**, 397-407.
- Simmen, K. A., Bernués, J., Parry, H. D., Stunnenberg, H. G., Berkenstam, A., Cavallini, B., Egly, J.-M. & Mattaj, I. W. (1991).** TFIIID is required for *in vitro* transcription of the human U6 gene by RNA polymerase III. *EMBO J.*, **10**, 1853-1862.
- Sinn, E., Wang, Z., Kovelman, R. & Roeder, R. G. (1995).** Cloning and characterization of a TFIIIC2 subunit (TFIIIC beta) whose presence correlates with activation of RNA polymerase III-mediated transcription by adenovirus E1A expression and serum factors. *Genes Dev* **9**, 675-685.
- Steinberg, T.H. & Burgess, R.R. (1992).** Tagetitoxin inhibition of RNA polymerase III transcription results from enhanced pausing at discrete sites and is template-dependent. *J. Biol. Chem.* **267**, 20204-20211
- Strauss F, Varshavsky A. (1984).** A protein binds to a satellite DNA repeat at three specific sites that would be brought into mutual proximity by DNA folding in the nucleosome. *Cell.* **37**, 889-901.
- Sturm, R. A., Das, G. & Herr, W. (1988).** The ubiquitous octamer-binding protein Oct-1 contains a POU domain with a homeo box subdomain. *Genes Dev.*, **2**, 1582-1599.
- Sutcliffe, J. E., Cairns, C. A., McLees, A., Allison, S. J., Tosh, K. & White, R. J. (1999).** RNA polymerase III transcription factor IIIB is a target for repression by pocket proteins p107 and p130. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 4255-4261.
- Tanese, N., Pugh, B. F. & Tijan, R. (1991).** Coactivators for a proline rich activator purified from the multisubunit human TFIIID complex. *Genes Dev.*, **5**, 2212-2224.
- Taya, Y. (1997).** Rb kinases and Rb-binding proteins: new points of view. *TIBS*, **22**, 14-17.
- Teichmann, M. & Seifart, K. H. (1995).** Physical separation of two different forms of human TFIIIB active in the transcription of the U6 or the VAI gene *in vitro*. *Embo J* **14**, 5974-5983.
- Teichmann, M., Wang, Z. & Roeder, R. G. (2000).** A stable complex of a novel transcription factor IIB-related factor, human TFIIIB50, and associated proteins mediate selective transcription by RNA polymerase III of genes with upstream promoter elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14200-14205.
- Theunissen, O., Rudt, R., Guddat, U., Mentzel, H. & Pieler, T. (1992).** RNA and DNA binding zinc fingers in *Xenopus* TFIIIA. *Cell*, **71**, 679-690.
- Thuillier, V., Stettler, S., Sentenac, A., Thuriaux, P. & Werner, M. (1995).** A mutation in the C31 subunit of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III affects transcription initiation. *EMBO J.* **14**, 351-359
- Thomae, R. (2000).** Die Regulation der Genexpression durch die RNA-Polymerase III während der Differenzierung von murinen F9-Zellen. In *Fachbereich Humanmedizin*. Marburg: Philipps-Universität.
- Udvardy, A. & Seifart, K. H. (1976).** Transcription of specific genes in isolated nuclei from HeLa cells *in vitro*. *Eur J Biochem* **62**, 353-363.
- Vrana, K.E., Churchill, M.E., Tullius, T.D. & Brown, D.D. (1988).** Mapping functional regions of transcription factor TFIIIA. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 1684-1696

- Wagner, S. (2002).** Die Rolle des Polymerase III-Transkriptionsfaktors TFIIIC2 während der Bildung des Initiationskomplexes am VA I-Gen. In *Fachbereich Medizin*. Marburg: Philipps-Universität.
- Waldschmidt, R., Wanandi, I. & Seifart, K. H. (1991).** Identification of transcription factors required for the expression of mammalian U6 genes in vitro. *Embo J* **10**, 2595-2603.
- Wanandi, I., Waldschmidt, R. & Seifart, K. H. (1993).** Mammalian transcription factor PBP. Characterization of its binding properties to the proximal sequence element of U6 genes. *J Biol Chem* **268**, 6629-6640.
- Wang, Z. & Roeder, R. G. (1995).** Structure and function of a human transcription factor TFIIIB subunit that is evolutionarily conserved and contains both TFIIIB- and high-mobility-group protein 2-related domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7026-7030.
- Wang, Z. & Roeder, R. G. (1996).** TFIIIC1 acts through a downstream region to stabilize TFIIIC2 binding to RNA polymerase III promoters. *Mol Cell Biol* **16**, 6841-6850.
- Wang, Z. & Roeder, R. G. (1997).** Three human RNA polymerase III-specific subunits form a subcomplex with a selective function in specific transcription initiation. *Genes Dev* **11**, 1315-1326.
- Wang, Z. & Roeder, R. G. (1998).** DNA topoisomerase I and PC4 can interact with human TFIIIC to promote both accurate termination and transcription reinitiation by RNA polymerase III. *Mol Cell* **1**, 749-757.
- Wang, Z., Bai, L., Hsieh, Y. J. & Roeder, R. G. (2000).** Nuclear factor 1 (NF1) affects accurate termination and multiple-round transcription by human RNA polymerase III. *Embo J* **19**, 6823-6832.
- Weil PA, Segall J, Harris B, Ng SY, Roeder RG (1979).** Faithful transcription of eukaryotic genes by RNA polymerase III in systems reconstituted with purified DNA templates. *J Biol Chem.* **254**, 6163-73.
- Weinmann, R. & Roeder, R. G. (1974).** Role of DNA-dependent RNA polymerase 3 in the transcription of the tRNA and 5S RNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 1790-1794.
- Weintraub, S. J., Prater, C. A. & Dean, D. C. (1992).** Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element. *Nature*, 358, 259-261.
- Werner, M., Hermann-Le Denmat, S., Treich, I., Sentenac, A. & Thuriaux, P. (1992).** Effect of mutations in a zinc binding domain of yeast RNA polymerase C (III) on enzyme function and subunit association. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 1087-1095
- Werner, M., Chaussivert, N., Willis, I.M. & Sentenac, A. (1993).** Interaction between a complex of RNA polymerase III subunits and the 70-kDa component of transcription factor IIIB. *J. Biol. Chem.* **268**, 20721-20724.
- Werten, S., Langen, F. W. M., Van Schaik, R., Timmers, H. T. M., Meisterernst, M. & Van der Vliet, P. C. (1998).** High affinity DNA binding by the c-terminal domain of the transcriptional coactivator PC4 requires simultaneous interaction with two opposing unpaired strands and results in helix destabilization.
- Weser, S. (2000).** Analyse einzelner Phasen des RNA Polymerase III Transkriptionszyklus. In *Fachbereich Biologie*. Marburg: Philipps-Universität.
- White, R. J. & Jackson, S. P. (1992).** The TATA box binding protein: a central role in transcription of by RNA-polymerases I, II and III. *Trends Genet.*, **8**, 284-288.

- White, R. J. (1997).** Regulation of RNA-polymerases I and III by the retinoblastoma protein: a mechanism for growth control?. *Trends Genet.*, **8**, 284-288.
- Whitehall, S. K., Kassavetis, G. A. & Geiduschek, E. P. (1995).** The symmetry of the yeast U6 RNA gene's TATA box and the orientation of the TATA-binding protein in yeast TFIIB. *Genes Dev* **9**, 2974-2985.
- Willis, I. M. (1993).** RNA polymerase III. Genes, factors and transcriptional specificity. *Eur J Biochem* **212**, 1-11.
- Wong, M. W., Henry, W. R., Ma, B., Kobayashi, R., Klages, N., Matthias, P., Strubin, M. & Hernandez, N. (1998).** The large subunit of basal transcription factor SNAPc is a Myb domain protein that interacts with Oct-1. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 368-377.
- Wu, G. J., Bandea, C. I., Yang, N., Lien, S. L., Wu, M. W., Hsieh, G. C. & Lu, F. (1994).** Transcription function of each base pair in the control region of the adenovirus VARNA1 gene. *Virology* **200**, 105-113.
- Yamamoto, M., Jonas, D. & Seifart, K. (1977).** Transcription of ribosomal k-S RNA by RNA polymerase C in isolated chromatin from HeLa cells. *Eur J Biochem* **80**, 243-253.
- Yoon, J. B., Murphy, S., Bai, L., Wang, Z. & Roeder, R. G. (1995).** Proximal sequence element-binding transcription factor (PTF) is a multisubunit complex required for transcription of both RNA polymerase II- and RNA polymerase III-dependent small nuclear RNA genes. *Mol Cell Biol* **15**, 2019-2027.
- Yoshinaga, S. K., Boulanger, P. A. & Berk, A. J. (1987).** Resolution of human transcription factor TFIIC into two functional components. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 3585-3589.
- Yoshinaga, S. K., L'Etoile, N. D. & Berk, A. J. (1989).** Purification and characterization of transcription factor IIC2. *J Biol Chem* **264**, 10726-10731.
- Zhang, H., Wang, J. C. & Liu, L. F. (1988).** Involvement of DNA topoisomerase I in transcription of human ribosomal RNA genes. *Proc. Natl., Acad. Sci. USA*, **85**, 1060-1064.

## **9 Anhang**

### **9.1 Akademische Lehrer**

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Aurich, Beato, Dressler, Elsässer, Fuhs, Garten, Grzeschik, Habermehl, Hartmann, Hasilik, Jungclas, Kern, Kirchner, Kohlmeyer, Koolman, Löffler, von Löw, Lührmann, Melsheimer, Müller, Niessing, Röhm, Schachtschabel, Schulz, Schwee, Seifart, A. Seitz, J. Seitz.

## **9.2 Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin in Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Reinigung des Transkriptionsfaktors IIIC1 der RNA-Polymerase III und Identifizierung potentieller TFIIIC1-Untereinheiten“ am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. K. H. Seifart ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bislang an keinem anderen in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den

### **9.3 Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. K. H. Seifart für das mir entgegengebrachte Vertrauen, seine stete Diskussionsbereitschaft und insbesondere für die große Unterstützung am Ende meiner Doktorarbeit.

Bedanken möchte ich mich bei Wolfgang Meißner für die Betreuung meiner Arbeit und seine stets hilfreichen (und meistens durchführbaren) Hinweise. Herzlichen Dank auch an meine (z.T. ehemaligen) Kollegen Sarah Fehl, Christin Gruber, Helen(e, hihi) Hoffmeister, Ulla Kopiniak, Jana Riemann, Frauke Seifart, Sabine Wagner und Stephan Weser für die Kooperativität und gute Stimmung im Labor. Die Zeit in der „Coppenrath & Wiese-AG“ (oder wie man das auch immer schreibt, „Kaffee & Kuchen-AG“ ist auch schön!) wird mir garantiert in lebhafter Erinnerung bleiben!

Meinen Eltern und Ingo (last but not least!) möchte ich dafür danken, dass sie auch in den schwierigen Phasen immer Verständnis für mich und mein Benehmen hatten und mit Rat und Tat zur Seite standen.