

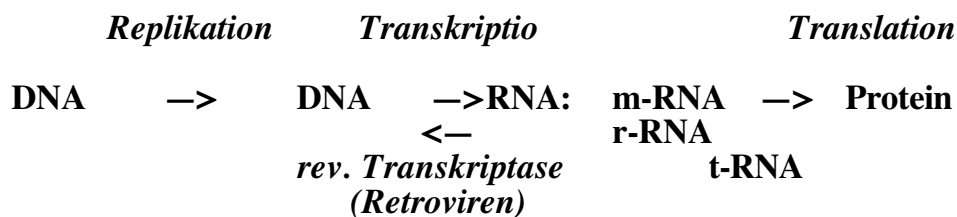
TRANSCRIPTION (Umschreiben von DNA in RNA)

Die **DNA-Reduplikation** dient dem Erhalt der genetischen Einheit. Die DNA wird einfach abgeschrieben oder kopiert mit dem Ziel eine möglichst genaue Abschrift auf die Tochterzellen weiterzugeben; es ist daher ein hohes Maß an Genauigkeit erforderlich.

Transkription: (lat. transcriptio = Umschrift)

Bei der Transkription wird ein Teil der in der DNA enthaltenen Information in RNA umgeschrieben. Jene DNA-Abschnitte die transkribiert werden, werden als **Gene** bezeichnet.

Abb.: 1 Kopieren, Umschreiben und Übersetzen der genet. Information



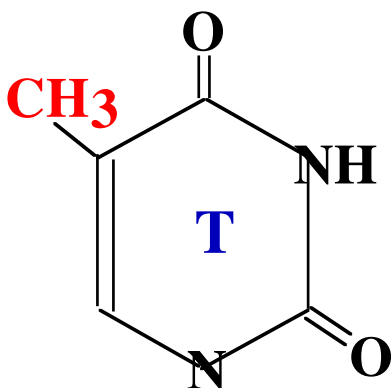
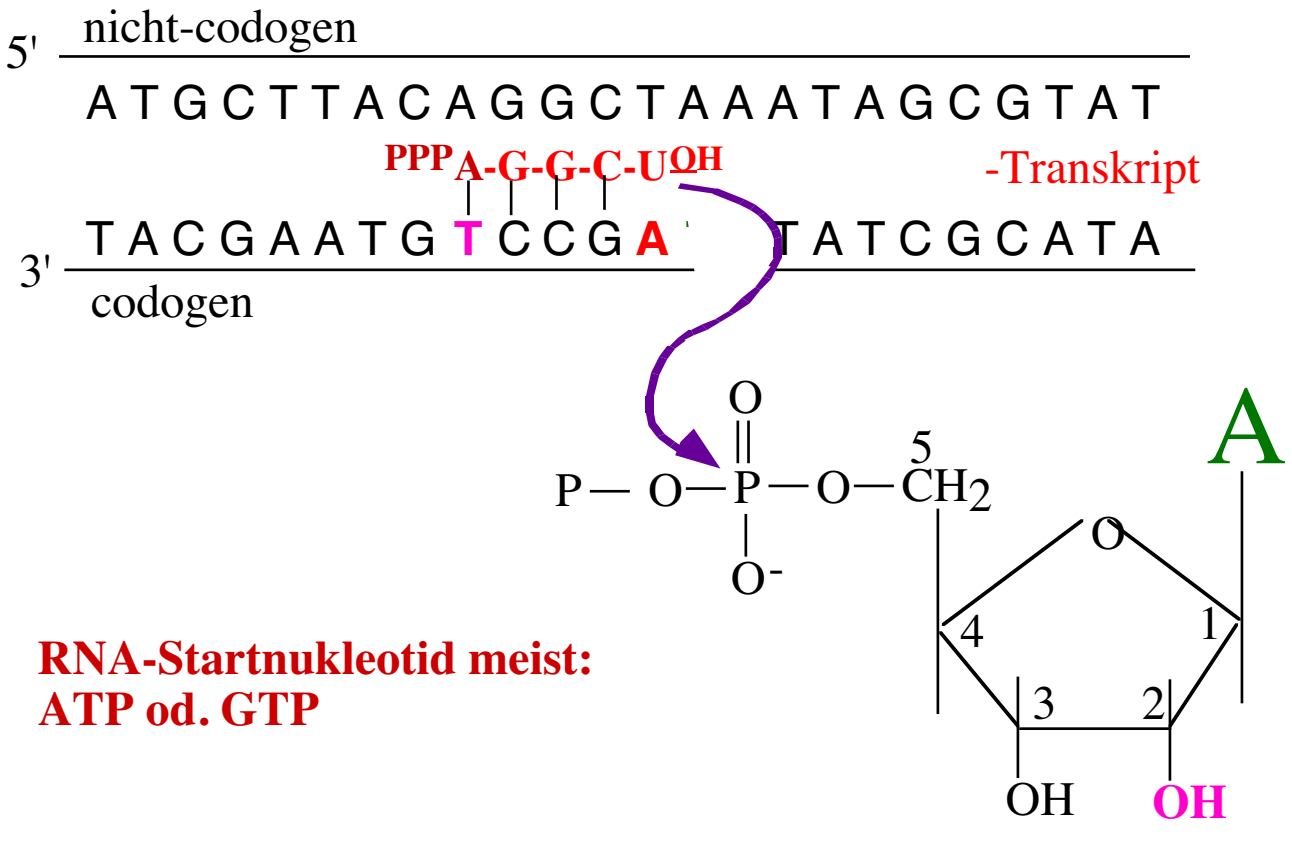
Ablauf der RNA-Synthese

Die aufgefaltete RNA besteht wie die DNA aus einer unverzweigten Kette die aus 4 unterschiedlichen Nukleotiden zusammengesetzt ist.

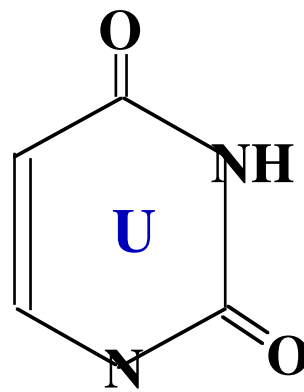
Das Enzym das die RNA-Synthese katalysiert wird als **DNA-abhängige RNA-Polymerase** bezeichnet.

1. sie kommt in allen Zellen vor;
 2. Kopiezahl in *E. coli* ist ca 3000/Zelle;
 3. Verbindet Ribonucleotide durch Ausbildung von 3' —> 5'- P-Diesterbrücken; (RNA- Rückgrat).
- Die fundamentalen Mechanismen der RNA-Synthese sind der der **DNA-Synthese sehr ähnlich**; in beiden Fällen sind die **Vorstufen NTP**.
 - Bei der Synthese wird die bei der Abspaltung von Pyro-Phosphat (PP) freigesetzte Energie für die Synthese verwendet.
 - Das Endprodukt, PP, wird durch die **Pyrophosphatase** dem Reaktionsgleichgewicht entzogen und somit die Reaktion in Synthese-Richtung getrieben.
4. Diese Reaktion wird nur in Anwesenheit von DNA durchgeführt (DNA ist für die Aufreihung der korrekten RNA-Vorstufen notwendig)
 5. Normalerweise wird nur Ds-DNA für die RNA-Synthese benützt.
 6. Die eigentliche Matrize ist jedoch ein DNA-Einzelstrang, den die RNA-Pol. durch Aufwinden der DNA-Doppelhelix freilegt.

DNA-abhängige RNA-Polymerasereaktion



DNA



RNA

-(+) Es-DNA kann *in vitro* durch RNA-Pol in ein Hybrid RNA-DNA-Doppelhelix umgesetzt werden.
 -In diesem besonderen Fall bleibt die RNA jedoch an die DNA-Matrize gebunden!!

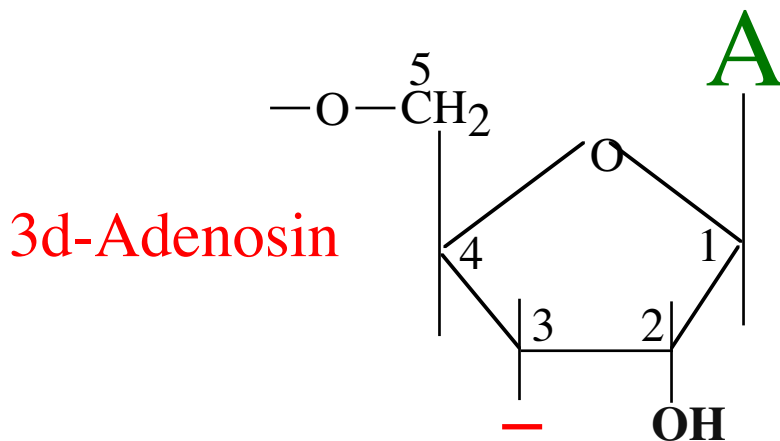
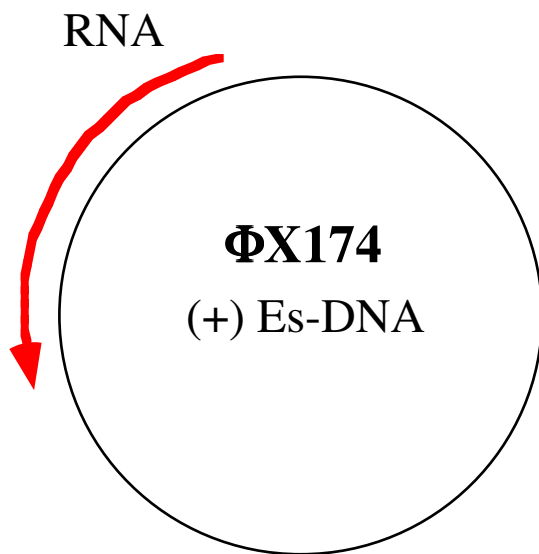


Abb.: 3-d-Adenosin: Wirkung und Struktur

8. Ist die Matrize jedoch Ds-helikale DNA, löst sich die RNA ab und die beiden komplementären DNA-Stränge verbinden sich wieder.

9. Die RNA-Sequenz ist **co-linear** zur DNA-Sequenz;

- ein **Korrekturlesen** wie bei den DNA-Polymerasen erfolgt jedoch **nicht!!**
- aus diesem Grund ist die Präzision der Transkription geringer als die der DNA-Replikation.
- da im Normalfall die RNA nicht selbst repliziert wird (Ausnahme sind RNA-Viren und –Bakteriophagen), werden die **Fehler bei der Transkription nicht unmittelbar vererbt.**

Bei der Transkription eines Gens wird nur 1 DNA-Strang als Matrize verwendet !!

c: codogen (gr.: gennan = erzeugend) Eigenschaft des DNA-Ds der in RNA transkribiert wird; er ist komplementär zu seinem Transkript.

nc: nicht codogen, der nicht transkribierte DNA-Strang; er entspricht in seiner Basensequenz dem RNA-Transkript.

Die Synthese der RNA-Kette erfolgt von **5' → 3' Richtung**. Dies wird durch folgende Befunde belegt:

- Das 1. Nucleotide der RNA-Kette ist ein Triphosphat (meist ATP oder GTP);
- Versuche mit 3-deoxy-Adenosin (ein Zellgift):

-3-d-ATP wird über das 5'-P mit dem wachsenden 3' -Ende der RNA verknüpft;
-das nächste rNTP kann nicht angehängt werden, da die 3'-OH Gruppe fehlt; es kommt zum Stop der RNA-Synthese!
-Die RNA-Synthese muß in 5' → 3' Richtung erfolgen, da im anderen Fall der Inhibitor gar nicht eingebaut werden kann.

Die bakteriellen RNA-Polymerasen sind aus Untereinheiten zusammengesetzt

(Ausnahmen stellen Bakteriophagen-codierte RNA-Polymerasen dar, z.B. T7-Bakteriophage)

-Wie die DNA-Polymerase III so besitzt auch die RNA-Pol. eine komplizierte Untereinheitenstruktur:

-Sie setzt sich aus 5 unterschiedlichen Polypeptidketten zu sammen:

-Das Holoenzym

1. es setzt zusammen aus: $\alpha_2\beta\beta'\sigma$
2. Masse ist etwa 450 kDa;
3. es belegt auf der DNA ca 60 Nukleotide (längliche Tertiärstruktur);
4. die Bindung von σ an die anderen UE ist nicht fest;

-Das "Core-Enzyme"

1. es setzt sich zusammen aus: $\alpha_2\beta\beta'$
2. rel. leicht ohne σ zu isolieren;
3. es führt die RNA-Synthese durch - ob mit oder ohne σ
4. Das katalyt. Zentrum ist die β -UE;
5. Die β -UE ist auch die Bindungsstelle für die Antibiotika: **Rifampicin und Streptolydigin**;
 - **Rifampicin** hemmt die Iniation der RNA-Synthese; hemmt jedoch nicht die Elongation; Rif-resistente Mutanten kodieren im *rpoB* Gen;
 - **Streptolydigin** hemmt die Elongation der RNA-Kette. Mutanten kodieren ebenfalls im *rpoB* Gen.

TABELLE: Untereinheiten der RNA-Polymerase $\alpha_2\beta\beta'\sigma$

	Gen	kDa	Anzahl im Holoenzym	Funktion
α	<i>rpoA</i>	36	2	Zusammensetzung/ bindet Regulatoren
β	<i>rpoB</i>	151	1	RNA-Polymerisation/ bindet rNTPs
β'	<i>rpoC</i>	155	1	DNA-Bindung
σ^{70}	<i>rpoD</i>	70	1	Promoter Erkennung, Initiation
andere σ -Faktoren z.B.				
σ^{32}	<i>rpoH</i>	32	1	Heat-shock Induktion
σ^s	<i>rpoS</i>	59	1	Stationärphase-Indukt.

- Man nimmt an, dass die Komplexität der RNA-Pol. durch die vielen Einzelschritte, die ausgeführt werden müssen, wie Initiation, Elongation und Termination, bedingt ist.

Die RNA-Pol erkennt spezifische Startsequenzen in der DNA (Promotoren)

- Der σ Faktor hat keine katalytische Funktion;
- Seine Funktion ist die Erkennung des Startsignals (Promotor) entlang des DNA-Moleküls;
- in vitro* Experimente haben ergeben, dass in **Abwesenheit von σ** das Core-E die RNA-Synthese gelegentlich und völlig unspezifisch initiiert;
- ist jedoch **σ anwesend**, dann wird die korrekte Stelle selektiert;
- Nur das Holoenzym (mit dem σ -Faktor) hat die Fähigkeit spezifisch an die Startsequenz (dem Promotor) zu binden.

Der Promoter

Was ist die Erkennungssequenz für die RNA-Pol. und wo liegt sie??

- Ein Vergleich von mehr als 100 bakterieller Promotoren zeigte, dass 2 hexamere Sequenzen auftreten.
- Sie sind etwa 10 bzw. 35 Nukleotide vor der Stelle, an der die RNA-Synthese startet (+1).
- **S1-Nuklease-Kartierung** zur Bestimmung der Startstelle des Transkriptes;
- Die sehr guten Promotoren stimmen mit der Consensus-Sequenz überein.
- Die Mehrzahl der Promotoren weisen Abweichungen auf.

- Die -10 und -35 Region liegen ca **17 bp** auseinander; d.s. **2 Windungen** in der Doppelhelix;
- Beide Regionen sind daher etwa auf **gleicher Ganghöhe**.

Der Promoter (σ^{70} Consensus-Sequenz)

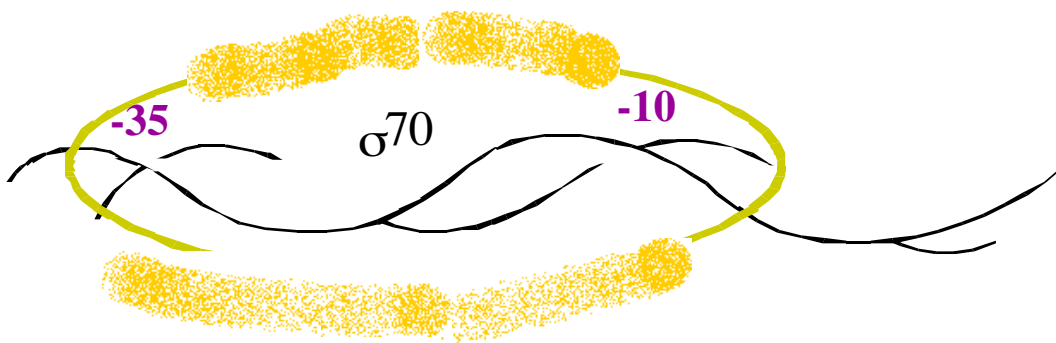
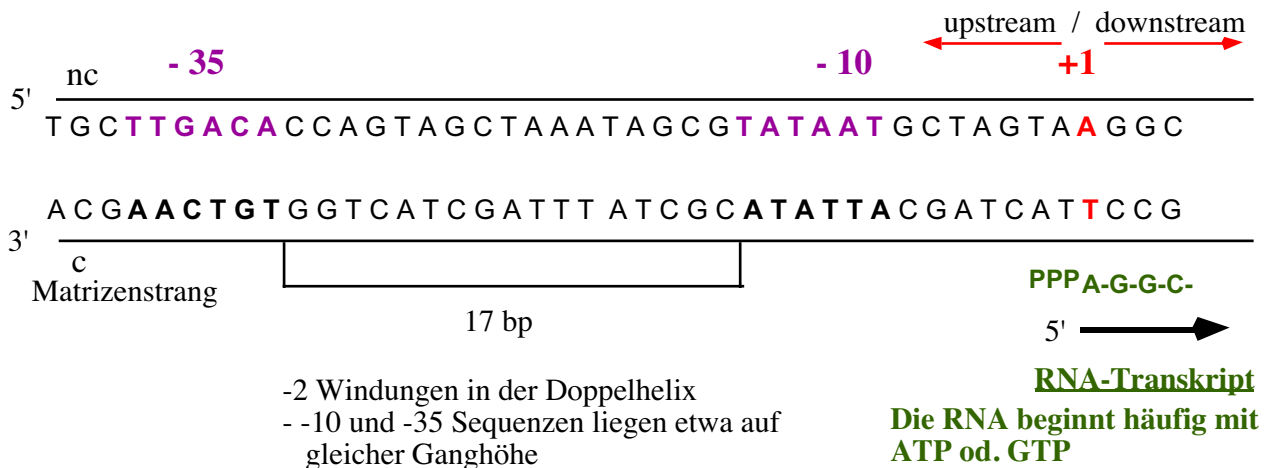


Abb.: σ^{70} Consensus-Promotersequenz und Bindungsregion der RNA-Pol.

RNA-Pol und DNA-Bindung

1. Man stellt sich vor, dass die RNA-Pol die DNA nach Promotoren absucht. Die E. coli DNA besitzt unter den 4 Mio bp etwa 2000 Promoterstellen für **σ^{70}** .

2. Kommt die RNA-Pol an einen Promoter erkennt und bindet sie an diese Region unter Ausbildung des sog. **geschlossenen Promoter-Komplexes**;
Für die Erkennung ist v.a. die -35 Region wichtig.

3. Sie bedeckt ca. **60 Nukleotide** wie in **DNA-Protektionsversuche** gezeigt:
in vitro Versuche: RNA-Pol + DNA mit Promoter aber keine NTP dann erfolgt nur Bindung aber keine Transkription;
durch DNase-Verdau und Sequenzierung der DNA kann man die genaue Binderegion ermitteln.

4. Im Bereich des Initiationsnukleotides (-10 bis +7) wird die DNA-Doppelhelix, ca 17 bp lang aufgewunden, so dass der zu transkribierende codogene DNA-Strang als Es vorliegt; es bildet sich der **offene Promoterkomplex** aus.

5. Bei der Aufwindung der DNA wird das Core-Enzym fester an die DNA gebunden (arretiert) und der σ -Faktor löst sich nach den ersten polymerisierten Nukleotiden ab und kann auf ein anderes Core-Enzym aufspringen.
6. Die AT-reiche -10 Region erleichtert vermutlich das Aufschmelzen der DNA.

Abb.: Mutationen in der Promoter-consensus-Sequenz

Abb.: RNA-pol. Kontaktstelle: geschlossener und offener Promoter/RNA-Pol-Komplex

Elongation

Wenn die Elongation der RNA-Kette beginnt, hat der σ -Faktor seine Rolle erfüllt und verläßt den Holoenzym/DNA/RNA-Komplex.

Der σ -Faktor ist frei und kann an ein weiteres Core-Enzym binden.

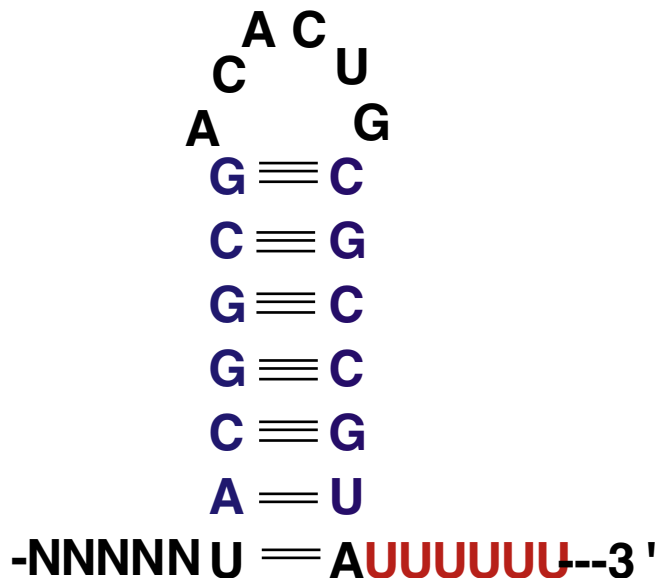
Die RNA-Polymerase windet in Elongationsrichtung den DNA-Ds kontinuierlich auf. Während der Elongation bildet sich ein DNA-RNA/Hybrid von ca 12 bp Länge aus.

Abb.: Elongation (Rotations-Translokations-Modell) s. Stryer

Termination

Die Termination der Transkription erfolgt an spezifischen DNA-Sequenzen die sich in der Regel am Ende eines Gens oder Operons befinden. Man unterscheidet die Rho-unabhängige und Rho-abhängige Termination.

Abb.: Rho (ρ)-unabhängige Terminationssequenz auf RNA (Transkript)-Ebene



Typische Rho-unabhängige Terminationstruktur

ist auf der codogenen DNA-Ebene charakterisiert durch:

- a) eine GC-reiche, gegenläufig komplementäre Nukleotidsequenz und
 - b) einer anschließenden Sequenz von (5-8) d-Adenosinnukleosid- Resten;
- das Transkript weist entsprechend eine Oligo-**Uridin-Nukleotidsequenz** am 3'-Ende auf.

Die gegenläufig-komplementäre Nukleotidsequenz (**inverted repeat - Palindrom**) kann eine Haarnadelstruktur (hair pin) am 3'-Ende des Transkriptes ausbilden.

Frage: wie können diese beiden strukturellen Eigenschaften Termination bewirken?

Man nimmt an, dass die RNA-Polymerase an der gegenläufigen Struktur **pausiert**; es zur Ausbildung der **Haarnadelstruktur** kommt.

Das Oligo U-RNA und Oligo-A-DNA - Hybrid **instabil** ist (nur 2 H-Brücken pro Paarung) dadurch wird die Ablösung der RNA-Polymerase und des Transkripts von der DNA erleichtert.

Abb.: 9 Rho-unabhängige Termination (s. Stryer "Biochemistry")

Das Signal zum Abfall liegt in der RNA.

ρ - abhängige Termination:

Abb. ρ - abhängig Termination (Neidhardt S. 827)

Sie ist charakterisiert durch:

- eine schwache (GC-arme) gegenläufige Sequenz;
- keine Oligo-Uridinnukleotidsequenz vorhanden;
- daher ist für die Termination der **Rho ρ -Faktor** nötig;

46 Kd / Hexamer

bindet an Es-RNA Moleküle über einen Sequenzbereich von 72 Nukleotiden;

besitzt **ATPase-Aktivität** mit Es-RNA als Cofaktor

Wechselwirkung mit RNA-Polymerase

bewirkt Pausieren der RNA-Pol. an best. Sekundärstrukturen und den Abfall der RNA-Pol.

T7 RNA Polymerase

-Der T7 Bakteriophage kodiert eine RNA-Pol. die nur aus 1 Polypeptidkette besteht.

-MG ist 98 kD;

-Dieses Enzym kann alle Schritte der Transkription katalysieren, wie die *E. coli* RNA-Pol.

-Sie erkennt vor allem Promotoren der spät exprimierten T7-Gene, deren **Promoter-Consensus-Sequenz** anders ist als die von z.B. *E.c.*

-sie ist Rifampicin-resistent;

-Verwendung: als Expressionsvektor in *E.c.*

-T7-DNA ist linear/ 40 kb lang und kodiert für ca 50 Genprodukte;

-sie besitzt 17 Promotoren für die T7 spez. RNA-Polymerase;

-der $\Phi 10$ Promoter ist besonders stark und wurde für das Expressionsplasmid verwendet.

Es handelt sich um einen Klasse III Promoter, von dem ein Strukturprotein-Gen (Capsidprotein) transkribiert wird;

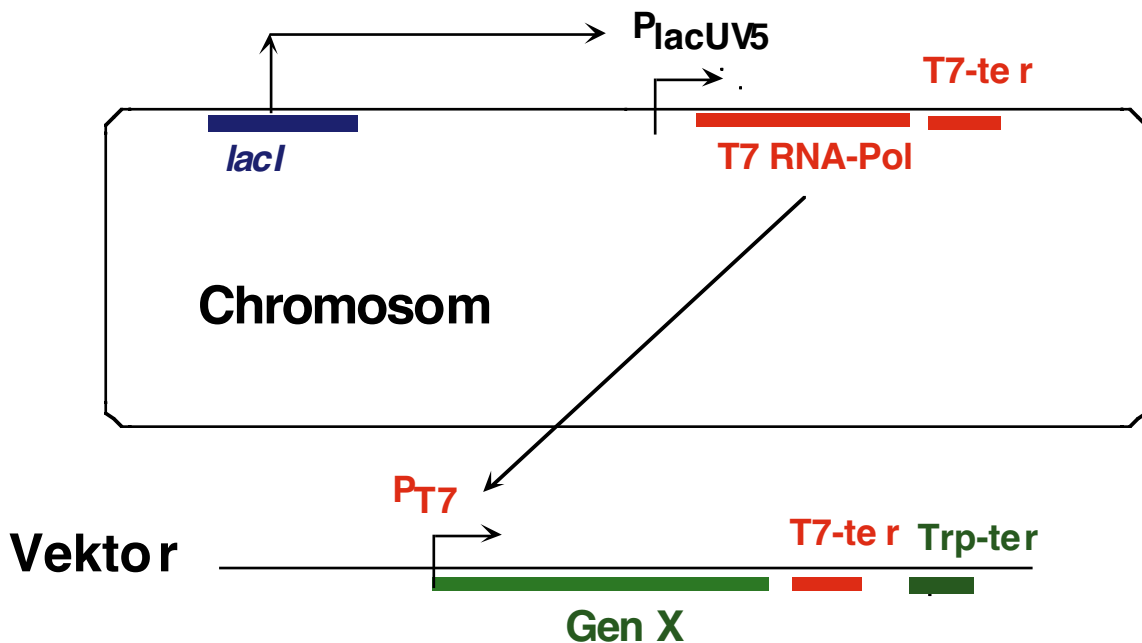
- Expression der T7 RNA-Pol. ist in *E. coli* letal;
- T7 RNA-Pol. erkennt keine Transkriptionsterminatoren;

Die Promotersequenz des Φ 10 Promoters ist:

-10 +1
TAATACGACTCACTATAGGGAGA

Abb.: pGP1-2/pT7-1 Expressionsplasmide: (nach Tabor und Richardson, 1985)

T7 Expressionssystem



Expression von Gen X wird selektiv angeschaltet:

- durch Zugabe von Lactose; führt zu Derepression von P_{lacuv5}
 - dadurch kann T7 RNA-Pol exprimiert werden
 - T7-Pol transkribiert selektiv Gen X
 - in Anwesenheit von Rifampicin wird die RNA-Pol von *E. coli* gehemmt
- nach: **Tabor, S., and Richardson, C. C. (1985)**
(pGP1-2/pT7-1 Expressionsplasmide)

pGP1-2:

- stammt vom Plasmid pACYC177 ab, ein Plasmid das kompatibel mit pBR322 ist;
- das T7 RNA-Pol-Gen und das Gen für den Ts Lambda-Repressor (cI857)
- die Transkription des T7-RNA-Pol. Gens ist 2-fach reguliert:
 - a) es bedarf einer T-Erhöhung auf 42oC damit der Repressor cI857 inaktiviert wird und
 - b) das Repressorgen wird vom lac-P transkribiert was bedeutet, dass noch zusätzlich der Induktor IPTG (Isopropylthiogalactosid) anwesend sein muß.

pT7-1:

- trägt den T7- Φ 10 Promoter und anschließend daran eine Sequenz mit verschiedenen Restriktionsschnittstellen (mcs);
- jede DNA, die integriert wird, wird in Transkriptionsrichtung ohne Halt transkribiert

Die RNA-Polymerase-Gene sind in verschiedenen Operons codiert

-Die RNA-Pol Gene sind in 3 verschiedenen Operons enthalten. Die Gene sind essentiell. Bemerkenswert ist, dass auch die anderen im Operon enthaltenen Gene essentiell sind (es handelt sich um Gene der Protein- und DNA-Synthese).

Abb. 7a) Das σ Operon:

7b) Das β "

7c) Das α "

Das σ - Operon:

Das σ - Operon aus *E. coli* enthält das Gen der DNA-Primase. Die Haupt-Promotoren sind P1 und P2 die in Tandem angeordnet sind; auch die rRNA-Promotoren sind in Tandem angeordnet, die vermutlich durch PP-G-PP (Guanosin-Tetraphosphat), in Abhängigkeit von der Wachstumsrate, reguliert werden. Am Ende des Primase-Gens ist ein "heat-shock" Promoter für das σ -Gen.

Attenuatoren

Sind Transkriptions-Terminations-Stellen, die so schwach sind, dass die RNA-Pol. sie gelegentlich überliest. Solche Attenuatoren befinden sich vor dem DNA-Primase- und dem β -Gen.

Bedeutung dieser Operons

- Die verschiedenen Gene in einem Operon werden nicht mit gleicher Effizienz transkribiert und exprimiert.
- Durch die starken Promotoren vor den Genen der 30- und 50-S r-Protein-Gene und der anschließenden Attenuatoren entsteht ein Ungleichgewicht in der Proteinexpression;

3.000	RNA-Pol-UE
20.000	rProteine

aber!

50	Primase-Prot.
3.000	Faktor-UE

Erklärung:

das mRNA-Segment der DNA-Primase ist viel weniger stabil als die restliche mRNA.

- Durch die Anordnung speziell dieser Gene in Operons kann die Menge der jeweiligen Proteine der Wachstumsrate der Zelle angepaßt werden. Der genaue Regulationsmechanismus ist jedoch noch unbekannt.

Die Struktur der RNA

-Die RNA ist fast immer einzelsträngig (Es) - Ausnahme: die Kartoffel-Spindel-Virus RNA, ein Viroid, das zirkulär und zum größten Teil ds ist.

Bei einigen RNA Molekülen, wie z.B. den t-RNAs, ist die Struktur so fixiert wie die eines Proteins. Fast jedes RNA-Molekül hat viele kurze ds helikale Regionen

-Mögliche Basenpaarungen: G C
 A U
 G U (rel. schwach, trägt jedoch zur Sekundärstr. bei)

-2 Prinzipien, die für die Faltung eines Proteins gültig sind gelten auch für die der RNA-Faltung:

- a) Die Struktur ergibt sich aus der Sequenz der funktionellen Gruppen in der Kette;
- b) Die Struktur formt sich noch während der Synthese der Kette.

-Jede Zelle besitzt viele RNA-Moleküle, die < 50 bis mehrere 20.000 von Nukleotiden lang sind.

Regulation der Transkription:

-Auf Transkriptions-Ebene spielt sich ein großer Teil der sehr komplexen Regulation der Genexpression ab; alle Phasen der RNA-Synthese können reguliert werden:

z.B.

Wann und wie effizient erfolgt Start und Stop der RNA-Synthese. Dies wird beeinflusst durch:

- a) Sequenzabweichung im Promoterbereich
- b) stromaufwärts gelegene DNA-Sequenzen
- c) Transkriptionsfaktoren

sodann ist die Stabilität der RNA (biologische Halbwertszeit / RNase-Abbau) ein wichtiger Parameter.

a) Sequenzabweichung im Promoterbereich

1. Abweichende Konsensussequenz (-35 / -10 -Region)
2. Abweichender Abstand zwischen "
3. Operator-Regionen

b) stromaufwärts gelegene DNA-Sequenzen:

-Die P-Aktivität kann auch noch durch DNA-Sequenzen die 50 - 200 Nukleotide stromaufwärts von der Startstelle liegen beeinflusst werden.

1. Eine AT-reiche Sequenz in diesem Bereich (-40 bis -80) erhöht häufig die P-Aktivität; (d.h. die Häufigkeit der Transkriptions-Initiation pro Zeiteinheit).
2. Es können sich dort Bindungsstellen für Aktivatoren der RNA-Pol befinden.
3. Es könnte sich dort eine Bindungsstelle für eine Topoisomerase befinden, durch deren Einwirkung eine, für die RNA-Pol optimale, superhelikale DNA-Struktur ausgebildet wird.

- Die **DNA-Gyrase (Topo-Isom. II)** hält die DNA (-) superhelical; begünstigt dadurch die Aufwindung; eine Hemmung dieses Enzyms durch Nalidixinsäure führt zu einer Hemmung der Expression vieler Gene.

- Eine Hemmung der **Topo-Isomerase I** führt zu einer Steigerung der Expression bestimmter Gene.
- Aber, nicht in jedem Fall führt eine erhöhte (-)superhelikale Struktur zu einer Steigerung der Promoteraktivität!!

c) Transkriptionsfaktoren:

Abb. NusA/ NusB: (Neidhardt 836, 838, 842)
(N-utilization substance)

Sie binden an bestimmte rotationssymmetrische Sequenzen; erwarten dort die RNA-Pol., springen auf und können entweder

1. die Transkription beschleunigen oder
 2. bewirken, dass entweder terminiert wird oder Terminationssignale überlesen werden.
- (z.B. diese Regulation spielt bei der Wahl des lytischen oder lysogenen Zyklus des lambda-Bakteriophagen eine wichtige Rolle)

Verschiedene Sigma-Faktoren bei *E. coli* bzw. *B. subtilis*

Sigma factor	Use	-35	separation bp	-10
70	general	TTGACA	16 to 19	TATAAT
32	heat shock	CCCTTGAA	13 to 15	CCCGATNT
28	flagella	CTAAA	15	GCCGATAA
54	nitrogen starvation	-25 CTGGNA	6	-12 TTGCA

Tab.: crt Promoter sequence of *S. aureus* Newman and the SigB promoter sequences from *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*

	-35	spacer (N14-16)	-10	+1
<i>B. subtilis</i>				
<i>sigB</i>	GTTT	AACGTCTGTCAGACGA	GGGTAT	AAAGCAACT AGT
<i>ctc</i>	GTTT	AAATCCTTATCGTTAT	GGGTAT	TGTTTGTAAT AGG
<i>csbA</i>	GATT	GATTTTGGCTGAAAAG	GGGTAT	GGTGTAAGT AGA
<i>gsiB</i>	GTTT	AAAAGAATTGTGAGC	GGGAAT	ACAACAACC AAC
<i>gtaB</i>	GTGT	AAAAACATATTGAAA	GGGTAA	ATAGAGAAT AGT
<i>katE</i>	GTTT	ATATGAAGAACGCCAC	GGGTAA	ATGTGCTGTT AGA
<i>gspA</i>	GTTT	ATTTTTTTGAAAAA	GGGTAT	GTAACCTGT ACA
<i>S. aureus</i>				
<i>sigB</i>	GATT	AGAAATTATTTTCGAT	GGGTAT	
<i>sar</i>	GTGA	TAAAATTCTGAAAAAT	GGGTAT	
<i>asp23</i>	GTTT	AATTGGTGTAGGTATT	GGGTAT	
<i>coa</i>	GTTT	CTTTAATGTAGATT	GGCAA	
<i>crt</i>	GTTT	ATTCACTGATCTTTA	GGGAA	CTAAGTAA TAA

B. subtilis and *S. aureus* sequences [Hecker, 1996 #125; Miyazaki, 1999 #187].

Chan, P. F., Foster, S. J., Ingham, E., and Clements, M. O. (1998). The *Staphylococcus aureus* alternative sigma factor sigmaB controls the environmental stress response but not starvation survival or pathogenicity in a mouse abscess model. *J Bacteriol* 180, 6082-9.

The role of sigmaB, an alternative sigma factor of *Staphylococcus aureus*, has been characterized in response to environmental stress, starvation-survival and recovery, and pathogenicity. sigmaB was mainly expressed during the stationary phase of growth and was repressed by 1 M sodium chloride. A sigB insertionally inactivated mutant was created. In stress resistance studies, sigmaB was shown to be involved in recovery from heat shock at 54 degreesC and in acid and hydrogen peroxide resistance but not in resistance to ethanol or osmotic shock. Interestingly, *S. aureus* acquired increased acid resistance when preincubated at a sublethal pH 4 prior to exposure to a lethal pH 2. This acid-adaptive response resulting in tolerance was mediated via sigB. However, sigmaB was not vital for the starvation-survival or recovery mechanisms. sigmaB does not have a major role in the expression of the global regulator of virulence determinant biosynthesis, staphylococcal accessory regulator (sarA), the production of a number of representative virulence factors, and pathogenicity in a mouse subcutaneous abscess model. However, SarA upregulates sigB expression in a growth-phase-dependent manner. Thus, sigmaB expression is linked to the processes controlling virulence determinant production. The role of sigmaB as a major regulator of the stress response, but not of starvation-survival, is discussed.

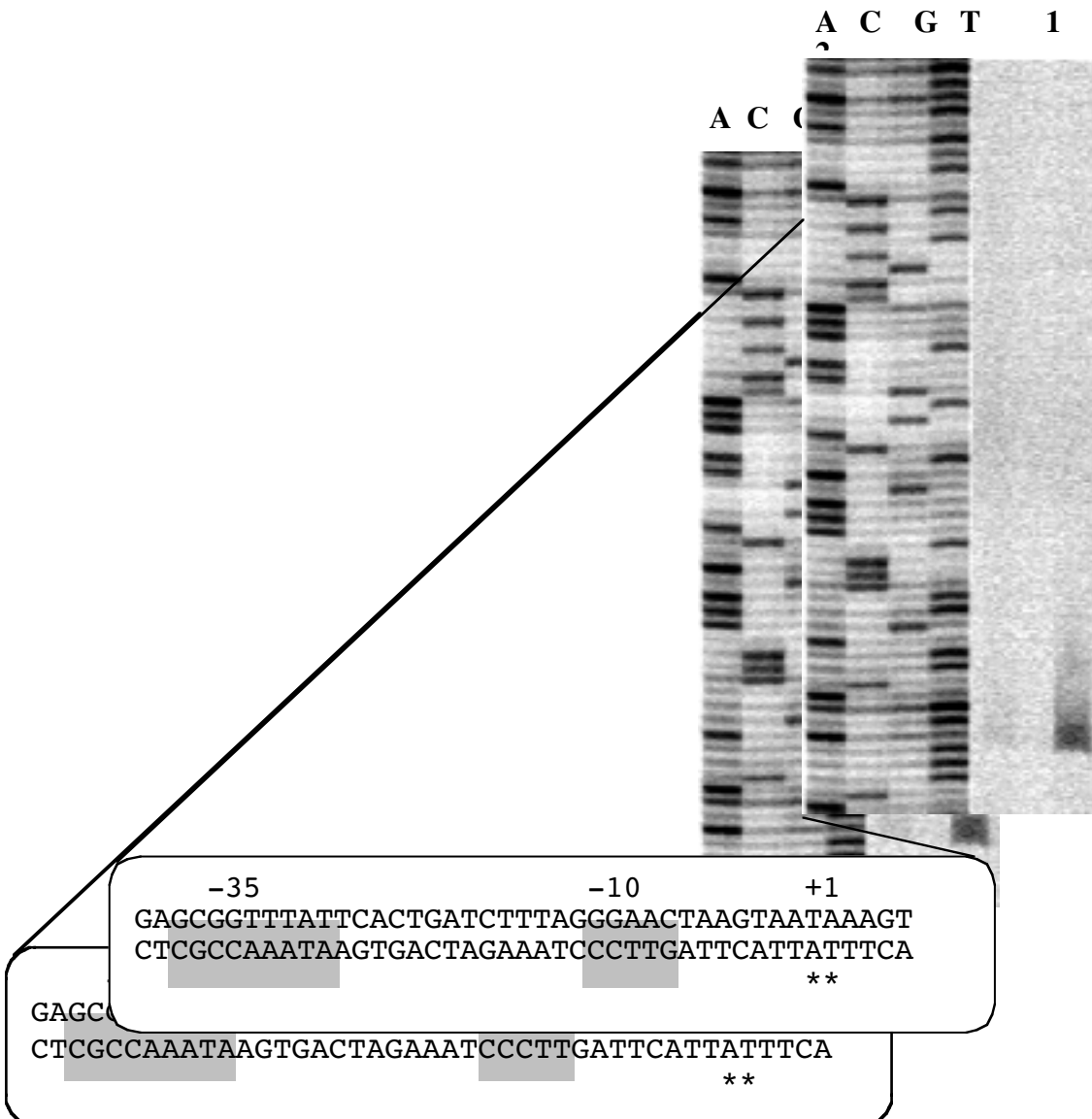


Abb.: Primer Extension des crt Promoters aus S. aureus Newman

In Spur 1 wurden die Primer Extension Reaktion mit der RNA aus der nicht -induzierten Kultur und in Spur 2 die Reaktion mit der RNA aus der induzierten Kultur aufgetragen. (Aus Dissertation von K-P. Wieland (1999): Lehrstuhl Mikrobielle Genetik, Uni Tübingen)

Tabor, S., and Richardson, C. C. (1985). A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes, Proc Natl Acad Sci U S A 82, 1074-8.

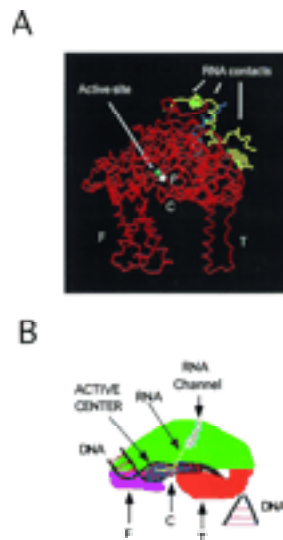


Fig. 7. (A) -Carbon backbone (red) representation of the crystal structure of T7 RNAP (10). The coordinates in Brookhaven PDB file (4RNP) were displayed using an INSIGHTII program and a Silicon Graphics workstation. The major cross-link site is in cyan and the minor site is in yellow. The white and blue spheres are D537 and D812, respectively, in the active site. (B) A model of transcription complex based on the shape of T7 RNAP. C, cleft; P, palm is in blue; T, thumb is in orange; F, fingers are in violet; the DNA is in black while the base pairs are in red; RNA is in yellow. The proposed RNA channel is shown in light blue.

From:

Srin Sastry and Barbara M. Ross. RNA-binding site in T7 RNA polymerase . Biochemistry.. 95, 9111-9116 (1998)