

# Transkription in Eukaryonten – die Rolle von Transkriptionskomplexen und ihren Komponenten

Von Edgar Wingender\* und Klaus H. Seifart

Daß DNA in RNA transkribiert wird, ist eine alte Erkenntnis und als solche Teil des „Zentralen Dogmas“ der molekularen Genetik. Wie dieser Prozeß jedoch auf die einzelnen Gene hingelenkt wird, ist bei höheren Zellen (Eukaryonten) immer noch nicht völlig verstanden. Die RNA-Polymerasen bedürfen offensichtlich zur Gen-Erkennung einer ganzen Reihe helfender Faktoren (Transkriptionsfaktoren). Diese bilden am Gen zusammen mit dem Enzym einen Transkriptionskomplex. Der Aufbau dieser Komplexe beginnt klar zu werden, und am größten ist das Wissen über die Steuerung der RNA-Polymerase III, die für die Synthese bestimmter kleiner RNA-Moleküle zuständig ist. Wie sehr die Erkenntnisse, die an diesem System gewonnen wurden, Modellcharakter haben, erweist sich besonders deutlich in einer Reihe neuester Arbeiten. Ein besonders gut untersuchtes Protein (TFIIIA), das ein positiver Regulator für die Expression ribosomaler 5S-RNA ist, hat Struktureigenschaften, die bisher bei DNA-bindenden Proteinen unbekannt waren. Es zeigt sich immer mehr, daß die „Architektur“ von TFIIIA nicht die einer exotischen Kuriosität ist, sondern wahrscheinlich als Beispiel für einen generellen Bauplan gesehen werden muß.

## 1. Einleitung

Um sich die in der Erbsubstanz, der DNA, niedergelegte Information nutzbar zu machen, überträgt die lebende Zelle sie von den Genen auf RNA; diesen Vorgang nennt man Transkription. Die regulierte Expression der Gene ist unter anderem der Schlüssel für die Differenzierung der Zellen in einem Zellverband. Die synthetisierte RNA wird dann ihrer jeweiligen Bestimmung zugeführt: Sie wird als ribosomale RNA (rRNA) in Ribosomen eingebaut, oder sie wird als Boten-RNA (mRNA) an den Ribosomen in Proteine „übersetzt“ (=translatiert), oder sie wird als tRNA mit aktivierten Aminosäuren beladen und nimmt dann eine Schlüsselstellung in der Proteinbiosynthese ein. Darüber hinaus gibt es noch RNA-Moleküle mit sehr speziellen Aufgaben, auf die zum Teil später eingegangen werden wird.

Während Bakterienzellen über nur eine DNA-abhängige RNA-Polymerase verfügen, finden sich in pflanzlichen und tierischen Zellen drei Enzyme dieses Typs, die auf die Synthese verschiedener RNA-Gruppen spezialisiert sind und jeweils eigenständige Transkriptionssysteme darstellen. So transkribiert die RNA-Polymerase I (oder A) die großen ribosomalen RNA-Moleküle (5,8S-, 18S- und 28S-rRNA), d. h. eigentlich deren gemeinsamen Vorläufer (45S-RNA), RNA-Polymerase II (oder B) synthetisiert die mRNA, während RNA-Polymerase III (oder C) für die Transkription einer Reihe relativ kleiner RNA-Moleküle zuständig ist. Zu diesen gehört hauptsächlich tRNA, aber auch die kleinste ribosomale RNA, die 5S-rRNA, sowie bestimmte virusassoziierte RNAs (z. B. VA<sub>I</sub>- und VA<sub>II</sub>-RNA des Adenovirus).

Allerdings erkennt keine der drei Polymerasen die von ihr transkribierten Gene direkt, sondern benötigt dazu Hilfsproteine, sogenannte Transkriptionsfaktoren (TF). Man kann zwischen Initiations-, Elongations- und Terminationsfaktoren unterscheiden. Da die Initiationsfaktoren von entscheidender Bedeutung für die Regulation der Genexpression sind, sollen sie hauptsächlich diskutiert werden. Sie bilden als funktionelle Einheit mit dem Enzym am Gen einen Transkriptionskomplex. Elektronenmikroskopische Aufnahmen prokaryoter Transkriptionskomplexe wurden bereits vor einigen Jahren veröffentlicht. Vergleichsweise neuen Datums sind jedoch Erkenntnisse über den Aufbau und die Bildungsweise eukaryoter Transkriptionskomplexe, die durch die Entwicklung von geeigneten eukaryoten in-vitro-Systemen möglich wurden. Besonders fortgeschritten sind die Arbeiten über Polymerase-III-Systeme, die gegenüber den anderen Polymerase-Systemen einige Eigenschaften aufweisen, die die Untersuchungen vereinfachen: 1. In-vitro-Transkription ergibt ein korrektes Produkt, d. h. es finden sowohl Initiation als auch Termination statt. 2. Die Komplexe bleiben über mehrere Transkriptionszyklen stabil, es gibt eine effektive Reinitiation und mithin eine leicht meßbare Produktakkumulation. 3. In vielen Fällen wird das Produkt nicht ausgeprägt posttranskriptionell bearbeitet. 4. Die Konzentration an notwendigen Transkriptionsfaktoren ist im Vergleich zu den Polymerase-II-Systemen relativ hoch. Daher wird im folgenden ganz überwiegend von Polymerase-III-Transkriptionskomplexen die Rede sein, wobei zunächst regulatorische Elemente auf DNA- und Proteinebene erörtert werden sollen, bevor einige funktionelle Eigenschaften der Komplexe beschrieben werden. In einem kurzen Überblick soll dann versucht werden, Erkenntnisse über Polymerase-I- und -II-Systeme zu referieren, um schließlich einige sich abzeichnende, allgemeine Struktureigenschaften genregulierender Proteine aus Eukaryonten zu beschreiben.

[\*] Dr. E. Wingender  
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH  
Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig  
Prof. Dr. K. H. Seifart  
Institut für Physiologische Chemie I der Universität  
Lahnberge, D-3550 Marburg

## 2. Aufbau von Polymerase-III-Transkriptionskomplexen

### 2.1. Promotor-Strukturen

Die bekannten, von RNA-Polymerase III transkribierten Gene (pol-III-Gene) haben eine ungewöhnliche Eigenschaft gemeinsam: Ihre Promotoren befinden sich auf der DNA nicht vor dem Gen, sondern mitten in ihm. Gründliche Untersuchungen an den Genen für verschiedene tRNA-Spezies haben zu einem klaren Bild von der Struktur und Funktion ihrer Promotoren geführt. Man entfernte dazu Teile der isolierten und klonierten Gene von den Enden her und ersetzte sie durch bakterielle Vektor-DNA. Außerdem ersetzte man einzelne Bereiche innerhalb des Gens durch Fremd-DNA. Dann untersuchte man die Transkriptionsfähigkeit dieser Gene: entweder *in vivo*, indem sie *Xenopus*-Oocyten mikroinjiziert wurden, oder *in vitro* durch Inkubation mit Zellextrakten in Gegenwart radioaktiv markierter Nucleosidtriphosphate; in jedem Fall wird in derartigen Experimenten anschließend die neusynthetisierte und somit radioaktiv markierte RNA isoliert, geelektrophoretisch getrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Aus diesen Untersuchungen lernte man, daß beispielsweise im Gen für die Initiator-Methionin-tRNA (tRNA<sup>Met</sup>) die Positionen 1–7 durch beliebige Basen eingenommen werden können, ebenso die Positionen ab 73 und ein Bereich in der Genmitte (14–50); dagegen führten Veränderungen an den Basen 8–13 oder 51–72 zu einer erheblichen Reduktion der Transkription oder gar zu ihrer vollständigen Auslöschung<sup>[1]</sup>. Prinzipiell gleiche Ergebnisse erhielt man mit anderen tRNA-Genen<sup>[2,3]</sup>. Aus diesen Befunden wurde gefolgert, daß tRNA-Gene einen gespaltenen Promotor aufweisen, dessen Teile mit Box (oder Block) A und Box B bezeichnet werden (Abb. 1). Für beide Promotorteile wurden „Konsensus-Sequenzen“ als allgemeine Polymerase-III-Promotoren abgeleitet (Abb. 1), die inzwischen auch durch chemische Synthese bestätigt werden konnten<sup>[4]</sup>. Die Analyse anderer, von RNA-Polymerase III transkribierter Gene zeigte, daß z. B. die Gene für Adenovirus VA<sub>I</sub>- und VA<sub>II</sub>-RNA ebenfalls eine solche gespaltene Promotorstruktur haben<sup>[5]</sup>. Die Sequenzen der beiden Boxen gehorchen dem allgemeinen Schema von Abbildung 1. Ferner fand man, daß dies auch auf Gene der „Alu-Familie“ zutrifft, hochrepetitive Sequenzen im menschlichen Genom (mit Analoga in anderen Spezies), die sich teilweise von RNA-Polymerase III *in vitro* transkribieren lassen, deren Funktion in der Zelle aber noch ungeklärt ist<sup>[6]</sup>.

Eine Sonderstellung nimmt das Gen für die ribosomale

SS-RNA ein (Abb. 1). Eine Interne Kontrollregion wurde wiederum durch Deletionsversuche von beiden Enden des Gens her identifiziert<sup>[7]</sup>. Neuere, detailliertere Untersuchungen lassen auch hier das Bild eines gespaltenen Promotors entstehen<sup>[8,9]</sup>. Sein vorderer Teil ist der Box A der tRNA-Gene homolog, dagegen zeigt der zweite Block keine Verwandtschaft mit Box B. Man hat daher für ihn die Bezeichnung Box C eingeführt.

Auffällig ist, daß beim 5S-RNA-Gen der Abstand vom Genanfang zur Box A sehr viel größer ist als bei den anderen Genen: 50 Basenpaare gegenüber ca. 10. Versuche mit Mischkonstrukten, die die drei Boxen in verschiedenen Kombinationen und unterschiedlichen Abständen zueinander enthielten, halfen die Funktion dieser Promotorelemente bei der Initiation der Transkription aufzuklären<sup>[10]</sup>: Box A ist offenbar dasjenige Element, von dem aus die Transkriptions„maschinerie“ den Startpunkt der RNA-Synthese mißt. Box B und Box C dagegen legen fest, ob zur Synthese ca. 10 bzw. 50 Basenpaare vor Box A mit der Transkription begonnen werden soll.

Abschließend sei noch erwähnt, daß auch Fälle berichtet wurden, in denen 5'-flankierende Sequenzen der pol-III-Gene für ihre Transkription von essentieller oder modulierender Bedeutung sind. Dabei scheint es sich jedoch nicht um eine generelle Eigenschaft dieser Gene zu handeln<sup>[11]</sup>.

### 2.2. Gen-Erkennung durch Transkriptionsfaktoren

Inkubiert man gereinigte RNA-Polymerase III mit DNA in Anwesenheit aller vier Nucleosidtriphosphate, so erhält man ein Gemisch völlig willkürlicher RNA-Produkte: Die Polymerase initiiert statistisch, unabhängig davon, ob die eingesetzte DNA definierte Gene enthielt oder nicht<sup>[12]</sup>, und terminiert bei einem der auf der DNA folgenden Cluster aus mindestens vier Thymidin-Basen<sup>[13]</sup>. Ersetzt man jedoch die gereinigte RNA-Polymerase durch einen geeigneten präparierten Zellextrakt, so findet man in Abhängigkeit von korrekten Promotorstrukturen auf der eingesetzten DNA ein definiertes Transkript<sup>[12,14]</sup>. Offensichtlich enthält der Zellextrakt neben der RNA-Polymerase III noch für die spezifische Gen-Erkennung notwendige Transkriptionsfaktoren (TF III). Sie lassen sich durch Fraktionierung über Phosphocellulose trennen und werden entsprechend ihrer Elutionsfolge TF IIIA, TF IIIB und TF IIIC genannt<sup>[14]</sup>. Nach dem derzeitigen Erkenntnisstand sind die Faktoren B und C zur Transkription sämtlicher pol-III-Gene erforderlich und für die meisten auch hinreichend. Lediglich die Synthese der ribosomalen 5S-RNA bedarf eines weiteren Faktors, des TF IIIA<sup>[8,14]</sup>.

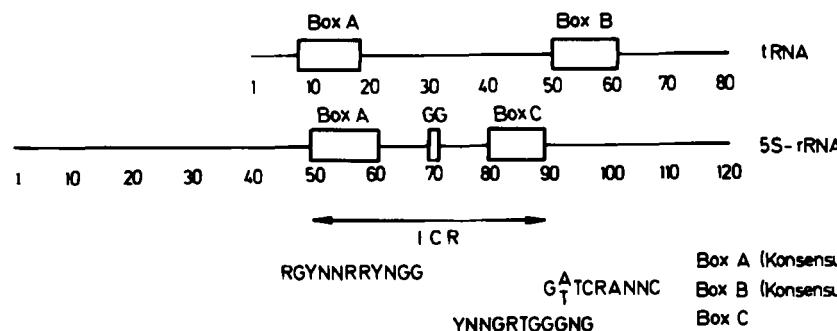


Abb. 1. Promotorstrukturen für RNA-Polymerase III. tRNA-Gene haben wie die meisten anderen pol-III-Gene einen gespaltenen Promotor. Die beiden Boxen (A und B) der Promotoren sind in diesen Genen weitgehend homolog. Die abgeleiteten Konsensus-Sequenzen sind ebenfalls angegeben. Box A findet sich auch in der Internen Kontrollregion (ICR) des Gens für die ribosomale 5S-RNA wieder, in dem mindestens zwei Guanin-Reste (G) sowie eine, Box C genannte, Region ebenfalls zum Promotor gehören. Die Ribonucleoside werden durch Ein-Buchstaben-Symbole dargestellt (Eur. J. Biochem. 15 (1970) 205).

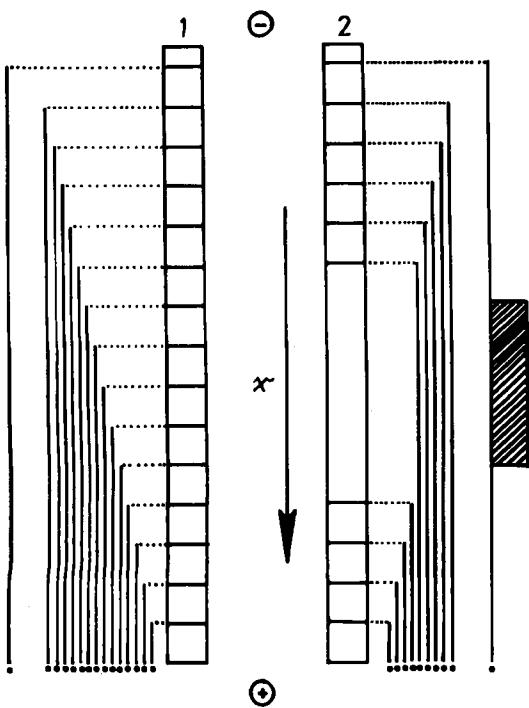


Abb. 2. Das Footprinting zur Bestimmung von Protein-Bindungsstellen auf der DNA geht von einem doppelsträngigen DNA-Fragment aus, das die mutmaßliche Bindungsregion enthält und von dem ein Strang an einem Ende radioaktiv markiert wurde (—●). Statistische Spaltung einer großen Zahl gleicher Fragmente ergibt ein Gemisch kürzerer Bruchstücke, von denen später nur die radioaktiv markierten, also die eines Stranges, erkannt werden. Sie unterscheiden sich im Idealfall in ihrer Länge um jeweils ein Nucleotid und können gelektrophoretisch getrennt ( $x$  = Laufrichtung) sowie autoradiographisch sichtbar gemacht werden (1). Ist die zu spaltende DNA mit Protein besetzt (⊖), wird sie an dessen Bindungsort nicht fragmentiert, die entsprechenden Spaltprodukte werden nicht gebildet, und im Autoradiogramm tritt ein „Fenster“, der Footprint, auf (2).

TFIIC hat bei der Synthese von tRNA eine ähnliche Funktion wie TFIIIA bei der 5S-RNA-Transkription: sie sind die jeweils primär generkennenden und -bindenden Proteine. Zur Analyse der Bindung eines Proteins an spezifische DNA-Sequenzen gibt es mehrere Methoden: An erster Stelle sind die „Footprinting“-Experimente zu nennen, deren Prinzip in Abbildung 2 erläutert ist. Sie werden zumeist mit der Endonuclease DNase I durchgeführt, in zunehmendem Maße wird aber auch der Methidiumpropyl-EDTA-Fe<sup>II</sup>-Komplex<sup>[15]</sup> als Spaltungsreagens verwendet. Alternativ kann man einen DNA-Fragment-Protein-Komplex exonukleolytisch (mit Exonuclease III) von den beiden 3'-Enden her bis zur geschützten Region abbauen. Aus der Größe des Restfragments kann dann auf die Bindungsposition geschlossen werden. Eine weitere Methode zur Lokalisierung spezifischer DNA-Protein-Kontakte besteht darin, die DNA mit einem Modifizierungsreagens zu behandeln, in der Regel mit Dimethylsulfat zur Methylierung der Guanin-Reste oder mit *N*-Ethyl-*N*-nitrosoharnstoff zur Ethylierung der Phosphatgruppen. Man untersucht dann entweder den Einfluß dieser Modifikationen auf die Bindung des Proteins oder den Schutz der DNA vor der Modifikation durch die Bindung des Proteins. Schließlich kann die Bedeutung einzelner Basen für die spezifische Protein-Bindung durch deren Substitution oder Deletion mit nachfolgendem Bindungs- oder Funktionstest aufgeklärt werden.

Für den TFIIIA fand man mit diesen Methoden, daß er an die gesamte Interne Kontrollregion des 5S-tRNA-Gens, also an Box A und C sowie den dazwischenliegenden Be-

reich, bindet<sup>[8]</sup>; jedoch ist der Schutz dieser Zwischenregion – abgesehen von zwei Guanin-Resten – möglicherweise nur sterisch bedingt<sup>[14]</sup>. Besonders stark sind die Kontakte im Bereich der Box C<sup>[16]</sup>. Die publizierten Ergebnisse beziehen sich ausnahmslos auf den Faktor IIIC aus den Oocyten von *Xenopus laevis*, in denen dieses Protein zugleich eine Vorratsfunktion für die 5S-RNA wahrnimmt und 15% des gesamten Zellproteins umfaßt<sup>[17]</sup>. Die Übertragbarkeit z. B. auf den analogen Faktor aus menschlichen Zellen ist noch nachzuweisen.

Sowohl für ein Protein aus Hefe, das vermutlich dem TFIIC entspricht, als auch für den menschlichen TFIIC konnten die Bindungseigenschaften an pol-III-Promotoren in tRNA- und VA-RNA-Genen charakterisiert werden<sup>[18-22]</sup>. Wie bereits bei der Wechselwirkung des TFIIIA mit dem 5S-RNA-Gen beschrieben wurde, schützt auch der Hefe-TFIIC mitunter den zwischen den Boxen liegenden Bereich vor dem Abbau durch DNase I<sup>[21]</sup>. Von einigen Autoren wird ein Modell diskutiert, das eine alternierende Bindung des TFIIC an Box A und Box B beim Durchgang der Polymerase während der Transkription vorsieht<sup>[21]</sup>. In keinem Fall konnte jedoch bisher eine Veränderung (z. B. Erweiterung) der geschützten DNA-Bereiche durch die nachfolgende Bindung der anderen Faktoren oder der RNA-Polymerase entdeckt werden.

### 2.3. Bildung der Transkriptionskomplexe

Damit sich an einem pol-III-Gen ein funktioneller Transkriptionskomplex bilden kann, muß das Gen zuerst erkannt werden. Bringt man z. B. das Gen für VA-RNA mit dem entsprechenden Faktor zusammen, bindet er so fest an den Promotor, daß er nicht auf ein nachträglich zugesetztes tRNA-Gen übergehen kann: In Anwesenheit der übrigen Transkriptionskomponenten (TFIIIB, Polymerase III, Nucleosidtriphosphate) wird ausschließlich VA-RNA synthetisiert<sup>[23, 24]</sup>. Offensichtlich bildet das VA-RNA-Gen mit TFIIC allein bereits einen stabilen Präinitiationskomplex (Abb. 3). Dagegen bindet dieser Faktor zwar auch allein an tRNA-Gen, bildet hier aber nur ein metastabiles Assoziat, aus dem er noch abstrahiert werden kann<sup>[23]</sup>. Damit sich mit tRNA-Genen ein gegen konkurrierende DNA stabiler Komplex bildet, ist zusätzlich TFIIIB erforderlich (Abb. 3).

Ein metastabiler Komplex bildet sich auch bei der Bindung des TFIIIA an das Gen für 5S-rRNA. Er wird zu einem stabilen Komplex durch die Assoziation von TFIIC<sup>[23]</sup>. Daran kann sich in einem relativ langsam Prozeß TFIIIB anlagern, gefolgt von RNA-Polymerase III (Abb. 3)<sup>[25]</sup>. Eine der beiden letzten Stufen ist energieabhängig, d. h. sie benötigt ATP. Die TFIIIB-Einbindung in einen stabilen Transkriptionskomplex für 5S-rRNA ist ein zeitabhängiger Prozeß; die Transkription beginnt mit ca. 15-minütiger Verzögerung<sup>[17]</sup>. Dagegen startet die Transkription von tRNA und VA-RNA mit einem Extrakt von HeLa-Zellen (spezielle Art menschlicher Krebszellen) nach neueren Untersuchungen sofort<sup>[24]</sup>. Ein Erklärung für dieses unterschiedliche Verhalten könnte sein, daß die für tRNA- und VA-RNA-Synthese erforderlichen Faktoren TFIIIB und TFIIC als Assoziate mit der RNA-Polymerase III vorliegen können<sup>[26]</sup>, während die Assoziation von TFIIIA noch nicht nachgewiesen werden konnte. Mögli-

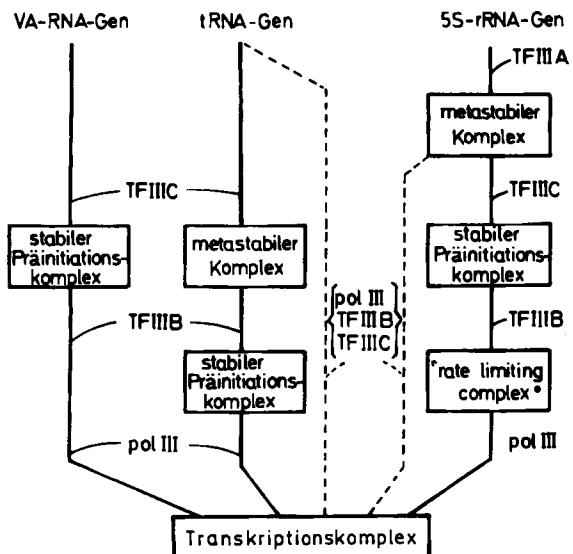


Abb. 3. Bildung von Transkriptionskomplexen an den Genen für VA-RNA, tRNA und ribosomaler 5S-RNA. Die Schritte der sukzessiven Bindung der einzelnen Faktoren werden ebenso wie der hypothetische Alternativweg der Bindung vorgeformer Proteinassoziate (----) im Text erläutert. TF: Transkriptionsfaktor; pol III: RNA-Polymerase III.

cherweise initiieren und elongieren diese vorgebildeten Protein-Protein-Assoziate schneller z.B. an tRNA-Genen als eine Mischung zuvor voneinander isolierter Transkriptionskomponenten (Abb. 3). Dagegen müßten an den 5S-RNA-Genen TFIIIA und ein Polymerasenkomplex zusammenfinden, ein Prozeß, der Ursache für die 5S-spezifische Verzögerung von ca. 15 Minuten sein könnte.

Noch ungeklärt ist die Funktion der nicht primär DNA-bindenden Faktoren. Weder gab es bisher einen experimentellen Anhaltspunkt für die Rolle, die TFIIIC bei der

Transkription von 5S-RNA-Genen spielen könnte (etwa Erkennung der Box A), noch existieren gesicherte Erkenntnisse über die Funktion des TFIIIB. Neuere Untersuchungen ergaben starke Hinweise auf eine TFIIIC-Bindung an die Box A des Promoters im 5S-RNA-Gen<sup>[27]</sup>. Vor kurzem konnte TFIIIB aus Hefe gereinigt und in einigen seiner molekularen Eigenschaften charakterisiert werden. Er ist offenbar ein Protein von ca. 60 kDa, doch sind in der Präparation immer auch Proteine mit kleineren Molekulargewichten zu erkennen<sup>[28]</sup>. Möglicherweise ist TFIIIB mit einer Proteinkinase-Aktivität verknüpft<sup>[28]</sup>. Einige unserer Ergebnisse deuten darauf hin, daß zumindest TFIIIB kein einheitliches Protein ist, sondern einer „Polymorphie“ unterliegt; das gilt möglicherweise auch für TFIIIC. Über die recht gut untersuchten Eigenschaften des TFIIIA wird im Abschnitt 5 berichtet.

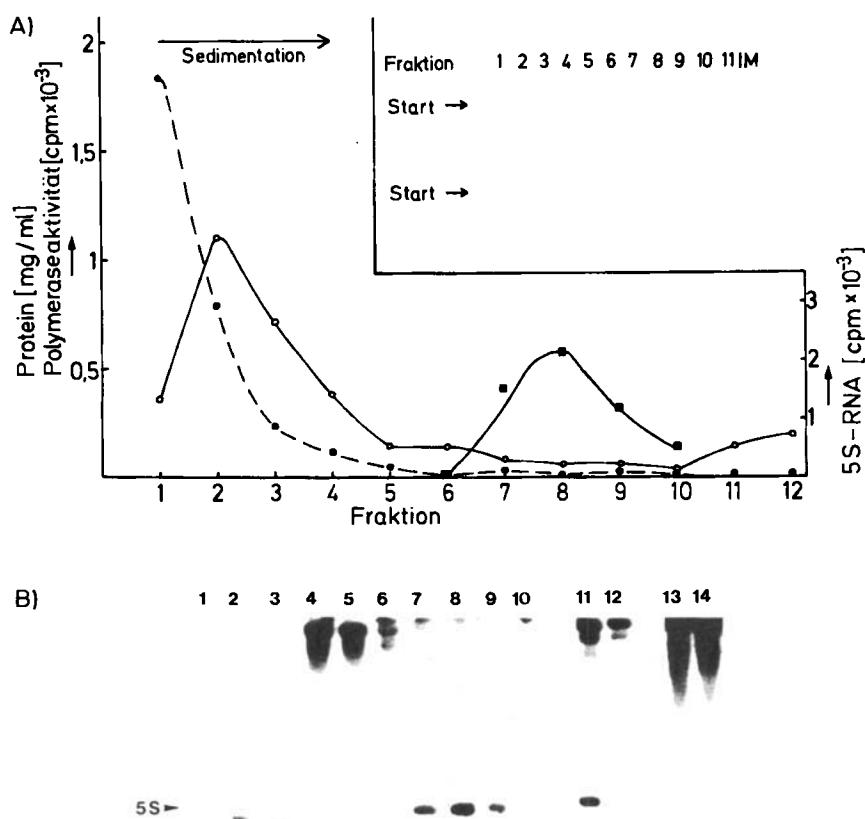
### 3. Eigenschaften von Polymerase-III-Transkriptionskomplexen

#### 3.1. Isolierung

Aufgrund vielfältiger Komplikationen bei der Isolierung und Charakterisierung der einzelnen Transkriptionsfaktoren in nativer Form schien es sinnvoll, alternative Strategien zur Untersuchung der Polymerase-III-Transkriptionskomponenten zu entwickeln. Es wurde versucht, intakte, vollständige Transkriptionskomplexe zu isolieren, funktional zu charakterisieren und ihre Zusammensetzung zu bestimmen.

Die Isolierung funktioneller Transkriptionskomplexe wurde erreicht durch Zentrifugieren ganzer in-vitro-Transkriptionsansätze über Glyceringradienten. Sowohl an den Genen für 5S-rRNA<sup>[29]</sup> (Abb. 4) als auch für tRNA oder

Abb. 4. Isolierung von Transkriptionskomplexen für ribosomale 5S-RNA. A) Cytoplasmatischer Extrakt aus menschlichen HeLa-Zellen wurde mit Plasmid-DNA inkubiert, die die Gene für 5S-rRNA enthielt. Der Ansatz wurde dann auf einen Glyceringradienten (20-45%) aufgetragen und zentrifugiert. Nach Fraktionierung wurden das Proteinprofil (---o---), die Gesamtpolymeraseaktivität in [cpm = counts per minute] (o-o) und die Fähigkeit zu spezifischer 5S-RNA-Synthese analysiert (—■—, siehe B). Der Einschub oben rechts zeigt die Sedimentationsposition komplexgebundener (oben) und freier DNA (unten), bestimmt durch elektrophoretische Analyse auf Agarose-Gelen, wobei auch die unterschiedliche Migration freier und gebundener DNA im Gel zu erkennen ist (M: freie DNA auf dem oberen Gel zum Vergleich). B) In den Bahnen 1-10 ist die Fähigkeit der entsprechenden Fraktionen dargestellt, durch Inkubation mit radioaktiv markierten Nucleosidtriphosphaten 5S-RNA zu synthetisieren. Die Transkripte wurden über ein Polyacrylamid-Gel getrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Position der 5S-RNA ist angegeben, die Banden in den Fraktionen 2 und 3 sind nichttranskriptiven Ursprungs. Die Bande in den Fraktionen 7-9 ist hingegen auf von RNA-Polymerase III erzeugte 5S-RNA zurückzuführen, da sie bei Inhibition der Polymerase durch Zugabe von 200 µg/mL des Pilzgifts α-Amanitin nicht beobachtet wird (Bahnen 11 und 12). Gemäß Bahn 13 entsteht ohne DNA in der Vorinkubation kein spezifisches Transkript; dieses ist auch durch nachträgliche DNA-Zugabe nicht zu erzeugen (Bahn 14).



VA-RNA<sup>[24,30]</sup> konnten inzwischen alle erforderlichen Komponenten als Komplexe isoliert werden. Kinetik-Untersuchungen mit diesem Material zeigten, daß alle RNA-Synthesen ohne Verzögerung starteten, daß also auch die 5S-RNA-Transkription keine „lag“-Phase mehr aufwies<sup>[29]</sup>.

Außer über Glyceringradienten-Zentrifugation konnten diese Komplexe auch gelektrophoretisch<sup>[29]</sup> isoliert werden. Nach diesem Verfahren isolierte Polymerase-II-Komplexe<sup>[31]</sup> waren zwar nicht mehr aktiv, doch ließ sich an ihnen als sogenannten ternären Komplexen noch die naszierende RNA nachweisen. Dagegen sind die pol-III-Komplexe nach Isolierung noch aktiv, enthalten aber keine nachweisbaren Mengen an Transkript<sup>[29]</sup>. Dieses wird anscheinend rasch als ein Nucleoprotein-Partikel entlassen, wie zumindest im Falle der 5S-RNA gezeigt werden konnte<sup>[32]</sup>.

### 3.2. Stabilität von Transkriptionskomplexen

Einen ersten Hinweis auf die Art der Wechselwirkungen, die einen Transkriptionskomplex zusammenhalten, kann die Stabilität gegenüber erhöhten Ionenstärken liefern. Hier ist der Vergleich mit anderen, gut untersuchten DNA-Protein-Komplexen wie etwa den Nucleosomen instruktiv. Diese Assoziate werden hauptsächlich durch Salzbrücken zwischen den Phosphatgruppen der DNA und den basischen Aminosäureresten der Histone, hauptsächlich Arginin- und Lysin-Seitenketten, zusammengehalten; die stabilsten dieser Bindungen, das sind die zwischen den Histonen H3 und H4 und der DNA, werden durch Salzkonzentrationen von etwas über 1 M NaCl aufgebrochen<sup>[33,34]</sup>.

Sowohl für 5S-RNA- als auch für tRNA-Transkriptionskomplexe konnten wir Salzstabilitäten nachweisen, die die von Nucleosomen bei weitem übertreffen<sup>[24,35]</sup>. Die entsprechenden Experimente sind in Abbildung 5 erläutert; mit ihnen wurde das „Umsatteln“ von Transkriptionskomponenten aus Komplexen auf kompetierende freie Gene oder Teilkomplexe getestet. Es zeigte sich, daß alle untersuchten Transkriptionskomplexe bis mindestens 1 M KCl stabil sind und lediglich die Polymerase reversibel entlassen<sup>[24]</sup>. Die Komplexe für 5S-RNA und tRNA können sogar KCl-Konzentrationen von 2.5 M und mehr ausgesetzt werden, ohne daß der Verlust einzelner Transkriptionsfaktoren zu beobachten ist. Diese Eigenschaft zeigt an, daß die in Transkriptionskomplexen wirksamen Wechselwirkungen hochspezifisch sind und über ionische Bindungen zwischen basischen Aminosäuren und dem Phosphatgerüst der DNA hinausgehen müssen.

Die ausgeprägte Stabilität der Transkriptionskomplexe gegenüber hohen Ionenstärken ermutigte dann auch zu dem Versuch, die Komplexe durch Gleichgewichtszentrifugation über Caesiumsulfat-Gradienten zu reinigen. Dabei dissoziert erwartungsgemäß die RNA-Polymerase von allen untersuchten Komplexen ab, während die Transkriptionsfaktoren teilweise am jeweiligen Gen bleiben<sup>[24]</sup>. Die so gereinigten Teilkomplexe sind nach Zugabe von RNA-Polymerase III aktiv und können analysiert sowie elektronenmikroskopisch untersucht werden. Diese Experimente sind noch nicht abgeschlossen.

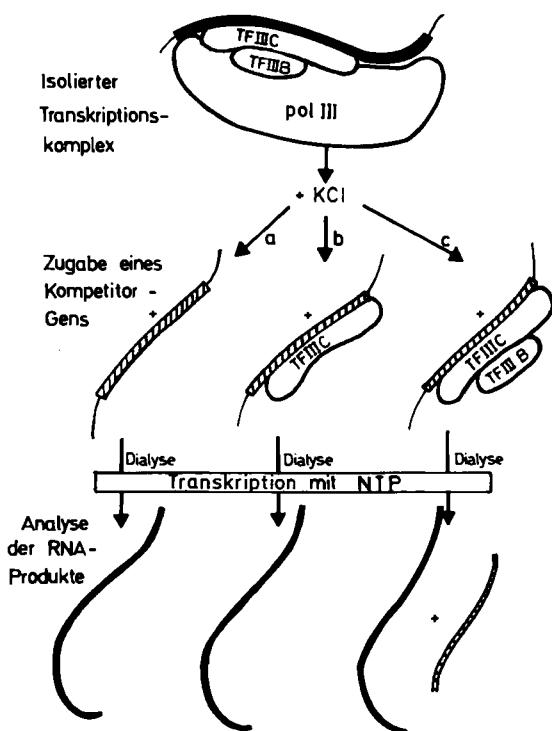


Abb. 5. Stabilität von Transkriptionskomplexen gegenüber hohen Ionenstärken. An beispielsweise einem VA-RNA-Gen (schwarz) gebildete und isolierte Transkriptionskomplexe werden auf eine hohe Salzkonzentration (z. B. 1 M KCl) eingestellt und mit einem funktionell äquivalenten, strukturell unterschiedlichen Gen (z. B. für tRNA, hier schraffiert dargestellt) vermischt (a), das auch mit TFIIC (b) oder TFIIC + TFIIB (c) beladen sein kann. Anschließend wird gegen niedrige Ionenstärke zurückdialysiert, mit den vier Nucleosidtriphosphaten (NTP) versetzt und auf Transkription getestet. In jedem Fall wird RNA vom ersten Gen synthetisiert (schwarz). Das zweite Gen jedoch wird nur erkannt, wenn es mit den erforderlichen Transkriptionsfaktoren besetzt ist (c): Die RNA-Polymerase kann bei höheren Ionenstärken „umsatteln“.

## 4. Transkriptionsfaktoren der anderen RNA-Polymerasen

### 4.1. RNA-Polymerase I

Die RNA-Polymerase I transkribiert das Gen für die 45S-RNA, den Vorläufer der größeren ribosomalen RNA-Moleküle; dieser Vorläufer wird dann zu reifer 5.8S-, 18S- und 28S-rRNA prozessiert. Dies bedeutet, daß die RNA-Polymerase I ausschließlich für die Transkription einer einzigen, wenn auch mehrfach repetierten Transkriptions-einheit zuständig ist. Obwohl sie also nur einen Promotor erkennen muß, braucht sie dazu wie alle anderen RNA-Polymerasen die Hilfe von Transkriptionsfaktoren.

Die Promotorstrukturen, die von diesen Faktoren erkannt werden, sind inzwischen mit den in Abschnitt 2.1 beschriebenen Methoden für eine Reihe von Organismen aufgeklärt worden. Im Gegensatz zu den Polymerase-III-Promotoren gibt es hier jedoch zwischen den Spezies größere Unterschiede, die deren biologischen Verwandtschaftsgrad widerspiegeln (Übersicht siehe<sup>[36]</sup>). Vereinfachend kann man sagen, daß die Promotorstrukturen für RNA-Polymerase I innerhalb der 40 Basenpaare liegen, die sich „stromaufwärts“ von den rRNA-Genen befinden und möglicherweise einige Basenpaare in die transkribierte Region hineinreichen. Innerhalb dieses Blocks kann man weiter differenzieren in Sequenzen, deren Deletion

nur eine Reduktion der Transkriptionseffizienz bewirkt, und solche, die absolut unentbehrlich sind<sup>[37]</sup>; schließlich findet man hochkonserviert Thymidin in Position – 1 und Guanin in Position – 16 vor dem Gen, so daß eine besondere Bedeutung dieser Basen angenommen werden darf. Außerdem dieses Bereichs gibt es noch ein bislang weit weniger gut untersuchtes „Upstream Element“ etwa von Position – 40 bis – 169, das anscheinend in der Lage ist, die Transkriptionseffizienz zu modulieren<sup>[38]</sup>.

Entsprechend der evolutionären Divergenz der Promotorstrukturen der rRNA-Gene unterscheidet sich auch der an sie bindende Transkriptionsfaktor, der Transkriptionsinitiationsfaktor(TIF)-IB<sup>[39]</sup>; er ist nur zwischen vergleichsweise eng verwandten Spezies austauschbar, z. B. zwischen Ratte und Maus<sup>[36]</sup>. Inzwischen wurde dieser Faktor, der den Maus-rRNA-Promotor erkennt, aus Ehrlich-Ascites-Zellen rein isoliert, und sein Bindungsort wurde durch Verdauung mit Exonuclease III auf die Positionen – 21 bis – 7 eingegrenzt<sup>[39]</sup>. Das analoge Protein aus *Acanthamoeba castellanii* schützt dagegen die Region von – 69 bis – 12 des homologen rRNA-Gens vor dem Abbau durch DNase I (vgl. Abschnitt 2.1 und Abb. 2)<sup>[40]</sup>. In diesem System ist besonders bemerkenswert, daß erstmals auch die nachfolgende Bindung der RNA-Polymerase im Footprint-Experiment sichtbar gemacht werden konnte: Der geschützte Bereich dehnt sich dann bis Position + 20 aus, ein Befund, der allein mit gereinigter Polymerase I nicht zu beobachten ist<sup>[40]</sup>.

Außer TIF-IB ist noch ein zweiter Transkriptionsfaktor zur rRNA-Synthese erforderlich, TIF-IA (von anderen Autoren TFIC genannt)<sup>[41]</sup>. Er ist eng mit der Polymerase I assoziiert und zeigt keine DNA-bindenden Eigenschaften. Seine Konzentration in der Zelle verändert sich stark mit deren physiologischem Zustand. So enthalten Zellen im Ruhezustand keine auffindbaren Mengen an TIF-IA, Extrakte aus diesen Zellen sind dementsprechend transkriptionsaktiv; durch Zugabe von aus exponentiell wachsenden Zellen isoliertem Transkriptionsfaktor können sie jedoch wieder zur rRNA-Synthese befähigt werden<sup>[41]</sup>. Wahrscheinlich sind nur faktorassoziierte Enzymmoleküle in der Lage, mit TIF-IB und dem Gen in Wechselwirkung zu treten und einen Transkriptionskomplex aufzubauen. Auch hier zeigt sich wieder, wie schon im pol-III-System (Abschnitt 2.3), die Bedeutung der Protein-Protein-Wechselwirkung für die Bildung von Transkriptionskomplexen.

Auch Transkriptionskomplexe von RNA-Polymerase I wurden inzwischen nachgewiesen<sup>[42]</sup> und durch Ultrazentrifugation ähnlich wie in Abschnitt 3.1 beschrieben isoliert<sup>[43]</sup>. Ihre Eigenschaften, z. B. Stabilität gegenüber kompetierenden Genen oder erhöhter Ionenstärke, entsprechen denen der pol-III-Komplexe. Aus ihrer Zusammensetzung könnten Hinweise darauf entnommen werden, ob z. B. die modulierenden Sequenzen weiter „stromauf“ noch mit Faktoren belegt sind. Zu denken wäre in diesem Zusammenhang etwa an Glucocorticoid-Rezeptoren, da mit einigen Steroidhormonen die rRNA-Synthese stimuliert werden konnte; dieser Effekt ist möglicherweise mit einer gesteigerten Zellteilungsrate gekoppelt<sup>[44, 45]</sup>. Außerdem werden im fraglichen Bereich Sequenzen gefunden, die den bekannten Rezeptorbindungsstellen vor Struktur-Genen homolog sind (vgl. Abschnitt 4.2)<sup>[46]</sup>.

## 4.2. RNA-Polymerase II

Während die Polymerase-I- und -III-Systeme und deren Regulationen einigermaßen leicht überschaubar sind, findet man bei der RNA-Polymerase II erheblich kompliziertere Verhältnisse. Das ist verständlich, da dieses Enzym die große Zahl der proteincodierenden Gene transkribiert, die etwa während der Zelldifferenzierung sehr subtilen Regulationsprogrammen unterliegen. Dementsprechend scheint es heute so, als ob es zu jeder sich abzeichnenden Regel auch gleich wieder Ausnahmen gäbe.

Für eine detailliertere Beschreibung der Promotorstrukturen bei Struktur-Genen sei auf Übersichten verwiesen<sup>[47, 48]</sup>. Vereinfachend soll hier festgehalten werden: Ca. 30 Basenpaare stromaufwärts vom Transkriptionsstart findet sich die „TATA-Box“ (TATA<sup>↑</sup>A<sup>↑</sup>), und noch weiter stromaufwärts haben viele Gene eine weitere homologe Region, die „CAAT-Box“ (GG<sup>↑</sup>CAATCT). Noch sehr viel weiter vor dem Transkriptionsstartpunkt können weitere modulierende/aktivierende und regulierende Sequenzen liegen, darunter die Enhancer. Letztere üben ihren stimulierenden Einfluß sogar noch aus, wenn sie sich stromabwärts vom Gen auf der DNA oder in umgekehrter Orientierung zum Gen befinden. Nach heutigem Erkenntnisstand sind die Enhancer für die Bindung von spezies-, zell- oder genspezifischen Faktoren verantwortlich. Gegenläufig zu ihnen wirken Silencer<sup>[49]</sup> oder Dehancer<sup>[50]</sup>, auf deren Charakterisierung hier nicht weiter eingegangen werden kann. Als eine interessante, aber in ihrer Bedeutung noch unverstandene Beobachtung sei lediglich erwähnt, daß viele der bekannten Enhancer Sequenzen enthalten, die Homologien zu den beschriebenen Polymerase-III-Promotoren (Box A und Box B) aufweisen<sup>[51]</sup>.

Weiterhin wird das Bild der Polymerase-II-Kontrolle dadurch kompliziert, daß viele Gene hormonell reguliert werden. Auch dazu gibt es wieder besondere Sequenzen, auf die später in diesem Abschnitt im Zusammenhang mit den an diese Sequenzen bindenden Hormon-Rezeptoren eingegangen werden soll.

Das Mosaik der pol-II-Transkriptionsfaktoren erscheint noch recht fragmentarisch, da es stark vom untersuchten System abhängt. Es kann daher nur exemplarisch beschrieben werden. Mit die ersten systematischen Untersuchungen über Polymerase-II-Transkriptionsfaktoren (TFII) wurden in der Gruppe von Roeder nach einem Verfahren vorgenommen<sup>[52]</sup>, das dem in Abschnitt 2.2 für RNA-Polymerase III und ihre Faktoren beschriebenen prinzipiell entsprach: Ein transkriptionsaktiver Zelleextrakt (aus HeLa-Zellen) wird über Phosphocellulose und zum Teil weitere Säulen fraktioniert und durch Rekombination das Transkriptionssystem rekonstituiert.

Diese Untersuchungen wurden am späten Hauptpromotor von Adenovirus 2 (AdML) vorgenommen. Dabei wurden mindestens drei Faktoren gefunden, die zur Transkription der von diesem Promotor kontrollierten Gene notwendig sind: TFIIB, TFIID und TFIE<sup>[52]</sup>. Ferner gibt es noch einen „Upstream Sequence Binding Factor“ (USF), der spezifisch an weiter stromaufwärts liegende Sequenzen bindet und die AdML-Transkription stark stimuliert<sup>[53]</sup>. Auf die Funktionsweise von TFIIB und TFIE gibt es bisher noch keine Hinweise. Ob ihnen einige der von anderen Autoren beschriebenen, generellen Transkriptionsfaktoren

(z. B. „A-Faktor“<sup>[54]</sup>; „Sp 2“<sup>[55]</sup>) entsprechen, bleibt noch zu klären. Beide Faktoren, insbesondere TF II E, können mit der RNA-Polymerase II assoziiert sein.

TFII D scheint identisch zu sein mit dem TATA-Box-bindenden Protein<sup>[56,57]</sup>. Footprint-Versuche mit dem Methidiumpropyl-EDTA·Fe<sup>II</sup>-Komplex zeigten eine Bindung des TFII D an ca. 10 Basenpaare um die TATA-Box<sup>[53]</sup>. Das diesem Faktor möglicherweise analoge Protein aus *Drosophila* („B-Faktor“) schützt eine 65-Basenpaar-Region um die TATA-Box der Histon-H3- und -H4-Gene sowie des Actin-5C-Gens vor dem Abbau durch DNase I<sup>[54,58]</sup>. Interessanterweise wird dieser TATA-Box-bindende Faktor im Fall der Hitzeschock-Proteine entbehrlich: Zu ihrer Transkription genügen der A-Faktor und ein spezieller Hitzeschock-Transkriptionsfaktor (HSTF), der an eine Region bindet, die unmittelbar stromaufwärts von der durch das TATA-bindende Protein geschützten Sequenz liegt<sup>[58]</sup>: er wird also nicht durch die Bindung des B-Faktors beeinflußt. Tatsächlich kann die simultane Bindung beider Proteine gezeigt werden, doch ist der B-Faktor anscheinend funktionslos. Andererseits ist der HSTF an den Histon-Genen (für H3 und H4) und dem Actin-5C-Gen inaktiv<sup>[58]</sup>. Offenbar handelt es sich daher bei HSTF nicht um einen generellen Faktor, sondern um ein spezifisches Regulatorprotein mit Bindungsaffinität an stromauf liegende, aktivierende Sequenzen.

Ein anderes Protein mit speziellem Bindungsort ist Sp1, ein zellulärer Faktor, durch den spezifisch einige virale Promotoren, z. B. die frühen Promotoren von SV40 und dem BK-Virus oder der Promotor des Thymidinkinase-Gens vom *Herpes-simplex*-Virus (HSV TK), aktiviert werden<sup>[59]</sup>. Es konnte aber auch eine Bindung von Sp1 an zelluläre Promotoren nachgewiesen werden. Das den von ihm erkannten DNA-Sequenzen gemeinsame Motiv ist GGGCGG; diese Basenfolge erscheint meist mehrfach hintereinander, ihre Orientierung zum Transkriptionsstartpunkt ist jedoch ohne Bedeutung. Vor kurzem konnte auch gezeigt werden, daß Sp1 den Promotor des AIDS-Retrovirus aktiviert<sup>[60]</sup>.

Ein weiteres Beispiel für einen positiv regulatorischen Faktor ist das Produkt des GAL4-Gens der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*), das an die UAS („upstream activating sequences“) einiger Galactose-induzierbarer Gene über ein bis vier Bindungsstellen bindet<sup>[61]</sup>. Paarweise auftretende Bindungsstellen haben die höchste Bindungsaffinität, wenn der Abstand zwischen ihnen 82–87 Basenpaare beträgt. Diese positive Regulation kann durch eine negative überdeckt werden, die auf das Produkt des GAL80-Gens zurückzuführen ist und besonders effektiv an den dimeren Bindungsstellen für den Transkriptionsaktivator wirkt.

An dieser Stelle sei als Einschub eine Mutmaßung über den Funktionsmechanismus bestimmter Transkriptionsfaktoren erwähnt: Nachdem Di Mauro et al. zeigen konnten, daß sogar gereinigte RNA-Polymerase II eine Reihe von Hefe-Promotoren, darunter die regulatorischen Sequenzen der GAL1- bis GAL10-Gene oder des Alkoholdehydrogenase-2-Gens (ADH2) erkennen kann, wenn diese nur in eine optimale topologische Konformation gebracht werden<sup>[62]</sup>, konnten sie kürzlich die Bildung einzelsträngiger Bereiche gerade in regulatorischen Regionen nachweisen<sup>[63]</sup>. Die Einstellung einer für die Transkription geeignete-

ten DNA-Topologie scheint eine der Aufgaben von Transkriptionsfaktoren zu sein.

Als letzter Punkt sei noch kurz die hormoninduzierte Gen-Regulation angesprochen, die ebenfalls eine zumeist positive Regulation ist. Besonders gut untersucht wurde in den letzten Jahren der Wirkungsmechanismus der Steroidhormone: Sie binden im Cytoplasma der Zielzelle an „ihren“ Rezeptor, der Hormon-Rezeptorkomplex erkennt dann am Chromatin regulatorische Sequenzen, bindet an sie und aktiviert das betreffende Gen. Die Rezeptoren können somit ebenfalls als Transkriptionsfaktoren betrachtet werden. Beispielsweise wurden inzwischen die Bindungsregionen und -sequenzen des Glucocorticoid-Rezeptors in den 5'-flankierenden Bereichen einiger Gene mit den bereits beschriebenen Methoden (z. B. Deletionen, Footprint-Experimente) ermittelt: Sie liegen stromaufwärts bestimmter Gene des MMTV (mouse mamma tumor virus)<sup>[64]</sup>, des Uteroglobin-Gens<sup>[65]</sup>, der Lysozym-Gene des Huhns<sup>[66]</sup> sowie der Metallothionein-Gene<sup>[67]</sup>. Letztere verfügen interessanterweise noch über eine weitere, unabhängige Induktionsmöglichkeit: In ihrer Kontrollregion finden sich metallresponsive Elemente, über die eine größere Konzentration an Metall-Ionen in der Zelle die Transkription anregt. Ferner sind unter anderem die Bindungsorte des Progesteron-Rezeptors vor den Genen für Lysozym<sup>[68]</sup> und Ovalbumin<sup>[68]</sup> sowie des Östrogen-Rezeptors vor den Vitellogenin-Genen<sup>[69]</sup> (alle vom Huhn) bekannt.

Inzwischen wurden auch Methoden entwickelt, mit denen intakte Transkriptionskomplexe für RNA-Polymerase-II-Systeme isoliert werden konnten. Sie umfassen teilweise elektrophoretische Verfahren<sup>[13]</sup> oder auch die bereits beschriebenen Zentrifugationsprotokolle<sup>[43]</sup> (siehe Abschnitt 3.1). Doch konnte noch in keinem Fall die Reinigung so weit vorangetrieben werden, daß es möglich geworden wäre, die Zusammensetzung dieser Komplexe aufzuklären.

## 5. Strukturelle Eigenschaften von Transkriptionsfaktoren

### 5.1. Struktur des TF III A

TF III A benötigt zur Erkennung der 5S-RNA-Gene Zink-Ionen als Cofaktoren. Nachgewiesen wurde dies zunächst in Footprint-Experimenten mit dem *Xenopus*-Faktor A<sup>[70]</sup>. Später konnte gezeigt werden, daß auch die Funktion des menschlichen A-Faktors zinkabhängig ist<sup>[34]</sup>.

Etwa zur gleichen Zeit wurde die cDNA des TF III A sequenziert, so daß seine Aminosäure-Sequenz bekannt war<sup>[71]</sup>: Er ist ein basisches Protein aus 344 Aminosäuren. Die computergestützte Analyse dieser Primärstruktur ergab, daß TF III A vom N-Terminus her aus neun Wiederholungen eines Motivs besteht<sup>[72]</sup>, und auch die restliche, C-terminale Sequenz kann man sich aus drei degenerierten Einheiten desselben Strukturelements zusammengesetzt vorstellen<sup>[73]</sup>. Dieses Motiv zeigt vor allem eine konstante Anordnung von paarweise auftretenden Cystein- und Histidin-Resten (Abb. 6), von denen angenommen wird, daß je zwei in tetraedrischer Koordination ein Zink-Ion binden. Die dazwischenliegende Sequenz aus in der Regel zwölf Aminosäuren stellt man sich als eine Art „Finger“ vor (Abb. 6), der den Kontakt zu einer spezifischen Basen-

folge der DNA herstellt<sup>[72]</sup>. Innerhalb dieser Finger sind außerdem die Positionen von je einem Phenylalanin- und Leucin-Rest recht gut konserviert.

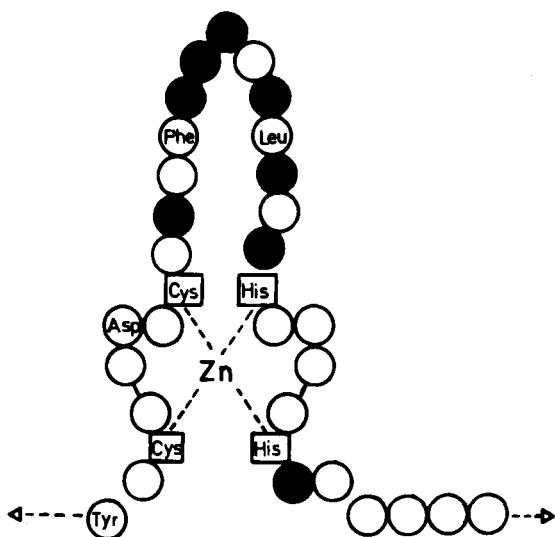


Abb. 6. Die Fingerstruktur genaktivierender Proteine. Ein Metall-Ion (bei TF IIIA  $Zn^{2+}$ ) ist tetraedrisch koordiniert von den Thiolgruppen zweier Cystein- und den Imidazolgruppen zweier Histidin-Reste, in einigen Fällen auch von vier Cys-SH-Gruppen (vgl. Tabelle 1 in Abschnitt 5.2). Dazwischenliegende und angrenzende Aminosäuren sind durch Kreise symbolisiert, wobei besonders gut konservierte Aminosäuren benannt sind. Die ausgefüllten Kreise stehen für potentiell DNA-bindende Aminosäuren [72].

Experimentelle Daten zur räumlichen Faltung des TF IIIA liegen noch nicht vor; daher ist man auf Vorhersagen der Sekundärstruktur angewiesen. Solche Vorhersagen gibt es von *Brown et al.*<sup>[73]</sup> und basierend auf Rechnungen, die von uns nach den Modellen von *Chou und Fasman*<sup>[74]</sup> sowie *Robson et al.*<sup>[75]</sup> durchgeführt wurden. Sie legen etwa in der zweiten Hälfte der Fingersequenz die Bildung einer  $\alpha$ -Helix von zwei bis drei Windungen nahe, die ungefähr die Aminosäuren zwischen den konservierten Phenylalanin- und Leucin-Resten umfaßt, sich aber auch bis zu den beiden Histidin-Resten erstrecken kann. Dagegen befinden sich die Cystein-Reste in wenig strukturierten bzw. durch hohe  $\beta$ -Turn-Wahrscheinlichkeit gekennzeichneten Bereichen, so daß sie sich in einer zur Zinkbindung geeigneten Weise anordnen können.

Helices ähnlicher Länge sind auch bei bakteriellen und viralen Repressoren durch Einlagerung in die große Furche der DNA für spezifische DNA-Kontakte verantwortlich. Ebenso trägt die „Erkennungshelix“ dieser Proteine an ihrer DNA-zugewandten Seite polare Aminosäuren, auf der zum Restprotein orientierten Rückseite hydrophobe Seitenketten<sup>[76]</sup>. Hier kommt es zu einem stabilisierenden Kontakt mit einer zweiten  $\alpha$ -Helix, die durch einen Turn mit der ersten verbunden ist (Helix-Turn-Helix-Motiv).

Die TF IIIA-Struktur dagegen wird möglicherweise durch das Zink-Ion stabilisiert; die Modelle zur Strukturvorhersage ergeben jedenfalls keine weiteren Bereiche mit signifikanter  $\alpha$ -Helix-Wahrscheinlichkeit. Daher braucht die hydrophobe Rückseite nur schwach ausgeprägt zu sein und beschränkt sich häufig auf den konservierten Leucin-Rest.

## 5.2. Weitere „Fingerproteine“

TF IIIA ist das erste Beispiel für ein Protein, das zur spezifischen DNA-Bindung Metall-Ionen braucht. Diese Entdeckung führte zu der Frage, ob TF IIIA ein interessanter „Exot“ ist oder ob der ihm zugrundeliegende Bauplan eine gewisse Allgemeingültigkeit hat. Inzwischen wurden einige Proteinsequenzen publiziert, die sich in das vom TF IIIA abgeleitete Schema gut einfügen lassen. Ihre „Fingersequenzen“ sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Zu nennen wäre hier zunächst das Krüppel(Kr)-Genprodukt von *Drosophila*<sup>[77]</sup>. Dieses Protein spielt eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung und Organisation der Larvensegmente, Mutationen in seinem Gen können zu schwersten Mißbildungen führen. Das Gen wurde sequenziert; in der abgeleiteten Aminosäure-Sequenz konnten vier hintereinanderliegende Fingermotive identifiziert werden, in denen sich Cystein-, Histidin-, Phenylalanin- und Leucin-Reste in den erwarteten Positionen befinden.

In zwei weiteren *Drosophila*-Genprodukten wurden zu einander homologe Bereiche gefunden, in denen sich eine bestimmte Konsensus-Sequenz sechs- bzw. siebenmal wiederholt, und deren Verwandtschaft mit dem Fingermotiv des TF IIIA man erst nachträglich erkannte. Diese Proteine werden vom Serendipity-Locus (*sry*) codiert ( $\beta$ - und  $\delta$ -*sry*-Polypeptid)<sup>[78]</sup>, ihre biologische Bedeutung ist noch unklar. Da ihre Expression aber spezifisch für bestimmte Entwicklungsstadien ist, könnten auch sie eine genregulierende Funktion haben.

Schließlich sind noch einige Proteine aus Hefezellen anzuführen. Perfekt in das Schema passen zwei aufeinanderfolgende Teilsequenzen im ADR 1, das die Transkription des Gens für die Alkoholdehydrogenase 2 aktiviert<sup>[79]</sup>. Ge- gewisse Abweichungen gibt es dagegen bei GAL4<sup>[80]</sup>, PPR 1<sup>[81]</sup> und ARG R II<sup>[82]</sup>, weiteren genregulierenden Proteinen der Hefe, in denen jedoch das Histidin-Paar durch ein zweites Cystein-Paar ersetzt ist. Auch gibt es hier keine Phenylalanin- und Leucin-Reste in den erwarteten Positionen, so daß die Frage nach einer gewissen Homologie noch mit Vorsicht zu beantworten ist.

Dennoch läßt sich das Bild von transkriptionsaktivierenden Proteinen abrunden durch den vor kurzem publizierten Befund, daß auch in der DNA-bindenden Domäne der Glucocorticoid- und der Östrogen-Rezeptoren das Fingermotiv auftritt, ebenso wie im v-erbA-Gen-Produkt, einem viruscodierten Protein, das bei der onkogenen Transformation von Hühnerzellen eine Rolle spielt<sup>[83]</sup>.

## 5.3. Bedeutung der Fingerstruktur

Nun wäre es sicherlich überzogen, für alle eukaryoten Gen-Aktivatoren diese Fingerstruktur zu erwarten. Zunächst bleibt noch der Nachweis zu führen, daß das entworfene Modell überhaupt richtig ist. Auch muß geklärt werden, ob die anderen Proteine ebenfalls Metall-Ionen, mutmaßlich Zink-Ionen, binden und für ihre Funktion brauchen, oder ob dies nur für TF IIIA gilt. Unterstellt man jedoch die Richtigkeit der geschilderten Überlegungen, muß man nach der spezifischen Aufgabe gerade dieser Struktur fragen.

Tabelle I. Bisher bekannte Fingersequenzen. Die für die Fingerstruktur essentiellen und daher besonders gut konservierten Aminosäuren sind halbfett, weitere gut konservierte kursiv dargestellt. Die Aminosäuren in Bereichen mit Lücken wurden so zugeordnet, daß möglichst hohe Homologie gewahrt bleibt. Die Aminosäuren werden gemäß dem Ein-Buchstaben-Code von Dayhoff [86] bezeichnet.

Gen, Gen-Produkt	Fingersequenzen																															
TFIIIA [a]	P	V	V	Y	K	R	Y	I	C	S	F	A	D	C	G	A	A	Y	N	K	W	K	L	Q	A	H	L	C	K	H		
	T	G	E	K		P	F	P	C	K	E	G	C	E	K	G	F	T	S	L	H	H	L	T	R	H	S	L	T	H		
	T	G	E	K	N	F	T	C	D	S	D	G	C	D	L	R	F	T	K	A	N	M	K	K	H	F	N	R	F	H		
	N	I	K	I	C	V	Y	V	C	H	F	E	N	C	G	K	A	F	K	K	H	N	Q	L	K	V	H	Q	F	S	H	
	T	Q	Q	L	P	Y	E	C	P	H	E	G	C	D	K	R	F	S	L	P	S	R	L	K	R	H	E	K	V	H		
	A	G				Y	P	C	K	K	D	D	S	C	S	F	V	G	K	T	W	T	L	Y	L	K	H	V	A	E	C	H
	Q	D				L	A	V	C		D	V	C	N	R	K	F	R	H	K	D	Y	L	R	D	H	Q	K	T	H		
	E	K	E	R	T	T	V	Y	L	C	P	R	D	G	C	D	R	S	Y	T	A	F	N	L	R	S	H	I	Q	S	F	H
	E	E	Q	R	P	F	V	C	E	H	A	G	C	G	K	C	F	A	M	K	K	S	L	E	R	H	S	V	V	H		
Kr [b]	S	R	D	K	S	F	T	C	K	I	C	S	R	S	F	G	Y	K	H	V	L	Q	N	H	E	R	T	H				
	T	G	E	K	P	F	E	C	P	E	C	D	K	R	F	T	R	D	H	H	L	K	T	H	M	R	L	H				
	T	G	E	K	P	Y	H	C	S	H	C	D	R	Q	F	V	Q	V	A	N	L	R	R	H	L	R	V	H				
	T	G	E	R	P	Y	T	C	E	I	C	D	G	K	F	S	D	S	N	Q	L	K	S	H	M	L	V	H				
	T	G	E	K	P	F	E	C	E	R	C	H	M	K	F	R	R	R	H	H	L	M	N	H	K	C						
$\beta$ -sry [c]	F	T	E	T	T	E	I	P	C	H	I	C	G	E	M	F	S	S	Q	E	V	L	E	R	H	I	K	A	D	T	C	
	Q	K	S	E	Q	A	T	C	N	V	C	G	L	K	V	D	D	E	V	L	D	L	H	H	M	N	L	H				
	E	G	K	T	E	L	E	C	R	Y	C	D	K	K	F	S	H	K	R	N	V	L	R	H	M	E	V	H				
	W	D	K	K	K	Y	Q	C	D	K	C	G	E	R	F	S	L	S	W	L	M	Y	N	H	L	M	R	H				
	D	A	E	E	N	A	L	I	C	E	V	C	H	Q	Q	F	K	T	K	R	T	Y	K	H	H	L	R	T	H			
	Q	T	D	R	P	R	Y	P	C	P	D	C	E	K	S	F	V	D	K	Y	T	L	K	V	H	K	R	V	H			
$\delta$ -sry [c]	T	K	K	R	V	K	Q	E	C	T	T	C	G	K	V	Y	N	S	W	Y	Q	L	Q	K	H	I	S	E	E	H		
	S	K	Q	P	N	H	I	C	P	I	I	C	G	V	I	R	R	D	E	E	Y	L	E	L	H	M	N	L	H			
	E	G	K	T	E	K	Q	C	R	Y	C	P	K	S	F	S	R	P	V	N	T	L	R	H	M	R	S	H				
	W	D	K	K	K	Y	Q	C	E	K	C	G	L	R	F	S	Q	D	N	L	L	Y	N	H	R	L	R	H				
	E	A	E	E	N	P	I	I	C	S	I	C	N	V	S	F	K	S	R	K	T	F	N	H	H	T	L	I	H			
	K	E	N	R	P	R	H	Y	C	S	V	C	P	K	S	F	T	E	R	Y	T	L	K	M	H	M	K	T	H			
	E	G	D	V	V	Y	G	V	C	L	I	C	N	T	T	F	E	N	K	K	E	L	E	H	H	L	Q	F	D	H		
ADR [d]	S	G	K	L	R	S	F	V	C	E	V	C	T	R	A	F	A	R	Q	E	H	L	K	R	H	Y	R	S	H			
	T	N	E	K	P	Y	P	C	G	L	C	N	R	C	F	T	R	R	D	L	L	I	R	H	A	Q	K	I	H			
GAL4 [e]	L	L	S	S	I	E	A	A	C	D	I	C	R	L	K	L	K	C	S	K	E	K	P	K	C	A	K	C				
PPR1 [f]	G	I	S	K	S	R	T	A	C	K	R	C	R	L	K	K	I	K	C	D	Q	E	F	P	S	C	K	R	C			
ARG RII [g]	G	R	A	K	T	F	T	G	C	W	T	C	R	G	R	K	V	K	C	D	L	R	H	P	H	C	Q	R	C			
cER [h]	E	S	T	K	E	T	R	Y	C	A	V	C	N	D	Y	A	S	G	Y	H	Y	G	V	W	S	C	E	G	C			
hGR [i]	T	T	G	P	P	P	K	L	C	L	V	C	S	D	E	A	S	G	C	H	Y	G	V	L	T	C	G	S	C			
erbA [j]	S	C	L	D	K	D	E	Q	C	V	V	C	G	D	K	A	T	G	Y	H	R	C	I	T	C	E	G	C				

[a] Transkriptionsfaktor IIIA [71, 72]. [b] Genprodukt des Krüppel-Gens aus *Drosophila* [77]. [c] Genprodukt des *Drosophila*-Serendipity-Locus [78]. [d] Alkohol-dehydrogenase-regulierendes Protein 1 der Hefe [79]. [e] Galactosemetabolismus-regulierendes Protein [80]. [f] Pyrimidinpfad-regulierendes Protein [81]. [g] Arabininmetabolismus-regulierendes Protein [82]. [h] Östrogen-Rezeptor vom Huhn. [i] Menschlicher Glucocorticoid-Rezeptor [83]. [j] Genprodukt des v-erbA-Gens des Vogel-Erythroblastosis-Virus [83].

Die Autoren des Modells schlagen eine teilweise unabhängige DNA-Bindung der einzelnen Finger vor, die zur sukzessiven, vorübergehenden Dissoziation während des Durchgangs der RNA-Polymerase III führt<sup>[72]</sup>. So könnten diese Proteine in der Lage sein, an DNA zu binden, ohne sie zu blockieren, wie es beispielsweise Histone tun. Ferner gibt es zur Bedeutung der DNA-Topologie für die Transkription interessante Hinweise<sup>[62, 63]</sup>, die gerade auch den TFIIIA einbeziehen<sup>[84, 85]</sup>. In einem Analogieschluß könnte man spekulieren, daß sich außerdem die Bindung dieser Proteine an RNA als weiteres gemeinsames Merkmal herausstellen wird. Sehr gut untersucht ist das für den TFIIIA, der mit 5S-rRNA ein 7S-RNP-Partikel bildet<sup>[17]</sup> und so zu einer Rückkopplungsregulation der Expression dieses Gens beiträgt. Auch eine Bindung des Kr-Proteins an seine eigene mRNA oder an die eines anderen Kontroll-Gens kann aus guten Gründen angenommen werden<sup>[77]</sup>. Es ist jedenfalls abzusehen, daß diese überaus interessante Klasse regulatorischer Proteine noch für einige Überraschungen gut ist.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Die Steuerung der Expression spezifischer Gene wird durch zahlreiche Komponenten bewirkt. Die Promotorstrukturen und die regulatorischen Elemente der DNA müssen durch Transkriptionsfaktoren (im weitesten Sinne) erkannt werden. Durch Protein-Protein-Kontakte sind weitere Faktoren und die RNA-Polymerasen fest am Gen zu verankern und zu einem funktionellen Transkriptionskomplex zu vereinigen. Die erforderlichen Komponenten können sukzessive oder als (teilweise) vorgeformte Proteinkomplexe an die DNA binden. In jedem Fall ist der fertige Transkriptionskomplex ein außergewöhnlich stabiles Gebilde, dessen Kernstruktur sogar noch die von Nucleosomen an Festigkeit zu übertreffen scheint. Die weitere Untersuchung der Komplexkomponenten wird uns wichtige Einblicke in die Mechanismen verschaffen, die zur Differenzierung der Zellen in einem Organismus und zum geordneten Zusammenspiel seiner Organe führen.

Die ersten, jüngst gewonnenen Erkenntnisse über die

Struktur der genaktivierenden Transkriptionsfaktoren deuten ebenfalls völlig neue Entwicklungen an. Es scheint möglich, durch detaillierte Analyse der Wechselwirkungen von DNA und Proteinen mit „Fingermotiv“ einen Schritt vorwärts zu kommen bei der Entschlüsselung des DNA-Protein-Bindungscodes.

Eingegangen am 6. August 1986 [A 612]

- [1] H. Hofstetter, A. Kressmann, M. L. Birnstiel, *Cell (Cambridge Mass.)* 24 (1981) 573.
- [2] G. Ciliberto, C. Traboni, R. Cortese, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 1921.
- [3] S. Sharp, T. Dingermann, J. Schaack, D. De Franco, D. Söll, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 2440.
- [4] M. H. Murphy, F. E. Baralle, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 10208.
- [5] R. Guilfoyle, R. Weinmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 3378.
- [6] G. Paoletta, M. A. Lucero, M. H. Murphy, F. E. Baralle, *EMBO J.* 2 (1983) 691.
- [7] D. R. Engelke, S.-Y. Ng, B. S. Shastray, R. G. Roeder, *Cell (Cambridge Mass.)* 19 (1980) 717.
- [8] D. F. Bogenhagen, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 6466.
- [9] T. Pieler, S.-L. Oei, J. Hamm, U. Engelke, V. Erdmann, *EMBO J.* 4 (1985) 3751.
- [10] G. Ciliberto, G. Raugei, F. Costanze, L. Dente, R. Cortese, *Cell (Cambridge Mass.)* 32 (1983) 725.
- [11] J. D. Johnson, G. J. Raymond, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 5590.
- [12] W. Gruissem, M. Kotzerke, K. H. Seifart, *Eur. J. Biochem.* 117 (1981) 407.
- [13] N. R. Cozzarelli, S. P. Gerrard, M. Schlissel, D. D. Brown, D. F. Bogenhagen, *Cell (Cambridge Mass.)* 34 (1983) 829.
- [14] J. Segall, T. Matsui, R. G. Roeder, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 11986.
- [15] M. W. van Dyke, P. B. Dervan, *Nucleic Acids Res.* 11 (1983) 5555.
- [16] S. Sakonju, D. D. Brown, *Cell (Cambridge Mass.)* 31 (1982) 395.
- [17] H. R. B. Pelham, D. D. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 4170.
- [18] A. Ruet, S. Camier, W. Smagowicz, A. Sentenac, P. Fromageot, *EMBO J.* 3 (1984) 343.
- [19] R. Klemenz, D. J. Stillman, E. P. Geiduschek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 6191.
- [20] D. J. Stillman, E. P. Geiduschek, *EMBO J.* 3 (1984) 847.
- [21] S. Camier, O. Gabrielsen, R. Baker, A. Sentenac, *EMBO J.* 4 (1985) 491.
- [22] R. E. Baker, O. Gabrielsen, B. D. Hall, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 5275; S. A. Fuhrman, D. R. Engelke, E. P. Geiduschek, *ibid.* 259 (1984) 1934.
- [23] A. B. Lassar, P. L. Martin, R. G. Roeder, *Science (Washington D.C.)* 222 (1983) 740.
- [24] D. Jahn, E. Wingender, K. H. Seifart, *J. Mol. Biol.*, im Druck.
- [25] J. J. Bieker, P. L. Martin, R. G. Roeder, *Cell (Cambridge Mass.)* 40 (1985) 119.
- [26] E. Wingender, D. Jahn, K. H. Seifart, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 1409.
- [27] T. Pieler, J. Hamm, R. G. Roeder, *Cell (Cambridge Mass.)*, im Druck.
- [28] M. S. Klekamp, P. A. Weil, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 2819.
- [29] E. Wingender, X.-P. Shi, A. Houpert, K. H. Seifart, *EMBO J.* 3 (1984) 1761.
- [30] G. R. Greenberg, D. S. Louis, L. Duncan, R. C. Miller, G. B. Spiegelman, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 6248.
- [31] S. Ackerman, D. Bunick, R. Zandomeni, R. Weinmann, *Nucleic Acids Res.* 11 (1983) 6041.
- [32] A. Houpert, E. Wingender, unveröffentlicht.
- [33] J. Bode, K. Henco, E. Wingender, *Eur. J. Biochem.* 110 (1980) 143.
- [34] E. Wingender, K. Maass, J. Bode, *Int. J. Biol. Macromol.* 3 (1981) 114.
- [35] E. Wingender, D. Dilloo, K. H. Seifart, *Nucleic Acids Res.* 12 (1984) 8971.
- [36] J. Sommerville, *Nature (London)* 310 (1984) 189.
- [37] J. A. Skinner, A. Ohrlein, I. Grummt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 2137.
- [38] I. Grummt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 6908.
- [39] J. Clos, D. Buttgerit, I. Grummt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 604.
- [40] E. Bateman, C. T. Iida, P. Kownin, M. R. Paule, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 8004.
- [41] D. Buttgerit, G. Pflugfelder, I. Grummt, *Nucleic Acids Res.* 13 (1985) 8165.
- [42] C. Wandelt, I. Grummt, *Nucleic Acids Res.* 11 (1983) 3795.
- [43] V. Cizewski Culotta, R. J. Wides, B. Sollner-Webb, *Mol. Cell. Biol.* 5 (1985) 1582.
- [44] A. Frey, K. H. Seifart, *Mol. Cell. Endocrinol.* 28 (1982) 161.
- [45] A. H. Cavanaugh, E. A. Thompson, Jr., *Nucleic Acids Res.* 13 (1985) 3357.
- [46] M. Beato (Universität Marburg), persönliche Mitteilung.
- [47] R. Breathnach, P. Chambon, *Annu. Rev. Biochem.* 50 (1981) 349.
- [48] E. Serfling, M. Jasin, W. Schaffner, *Trends Genet.* 1 (1985) 224; S. McKnight, R. Tjian, *Cell (Cambridge Mass.)* 46 (1986) 795.
- [49] A. H. Brand, L. Breedon, J. Abraham, R. Sternglanz, K. Nasmyth, *Cell (Cambridge Mass.)* 41 (1985) 41.
- [50] E. F. Remmers, J.-Q. Yang, K. B. Marcu, *EMBO J.* 5 (1986) 899.
- [51] A. L. Bak, A. L. Jørgensen, *J. Theor. Biol.* 108 (1984) 339.
- [52] T. Matsui, J. Segall, P. A. Weil, R. G. Roeder, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 11992.
- [53] M. Sawadogo, R. G. Roeder, *Cell (Cambridge Mass.)* 43 (1985) 165.
- [54] C. S. Parker, J. Topol, *Cell (Cambridge Mass.)* 36 (1984) 357.
- [55] W. S. Dynan, R. Tjian, *Cell (Cambridge Mass.)* 32 (1983) 669.
- [56] B. L. Davison, J.-M. Egly, E. R. Mulvihill, P. Chambon, *Nature (London)* 301 (1983) 680.
- [57] X.-P. Shi, R. Lee, R. Weinmann, *Nucleic Acids Res.* 14 (1986) 3729.
- [58] C. S. Parker, J. Topol, *Cell (Cambridge Mass.)* 37 (1984) 273.
- [59] K. A. Jones, K. R. Yamamoto, R. Tjian, *Cell (Cambridge Mass.)* 42 (1985) 559.
- [60] K. A. Jones, J. T. Kadonaga, P. A. Luciw, R. Tjian, *Science (Washington D.C.)* 232 (1986) 755.
- [61] R. J. Bram, N. F. Lue, R. D. Kornberg, *EMBO J.* 5 (1986) 603.
- [62] E. Di Mauro, M. Caserta, R. Negri, F. Carnevali, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 152.
- [63] G. Camilloni, F. Della Seta, R. Negri, E. Di Mauro, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 6145.
- [64] C. Scheidereit, S. Geisse, H. M. Westphal, M. Beato, *Nature (London)* 304 (1983) 749.
- [65] A. C. B. Cato, S. Geisse, M. Wenz, H. M. Westphal, M. Beato, *EMBO J.* 3 (1984) 2771.
- [66] R. Renkawitz, G. Schütz, D. von der Ahe, M. Beato, *Cell (Cambridge Mass.)* 37 (1984) 503.
- [67] M. Karin, A. Haslinger, H. Holtgreve, R. I. Richards, P. Krauter, H. M. Westphal, M. Beato, *Nature (London)* 308 (1984) 513.
- [68] J. G. Compton, W. T. Schrader, B. W. O’Malley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 16.
- [69] J.-P. Jost, M. Seldran, M. Geiser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 429.
- [70] J. S. Hanas, D. J. Hazuda, D. F. Bogenhagen, F. Y.-H. Wu, C.-W. Wu, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 14120.
- [71] A. M. Ginsberg, B. O. King, R. G. Roeder, *Cell (Cambridge Mass.)* 39 (1984) 479.
- [72] J. Miller, A. D. McLachlan, A. Klug, *EMBO J.* 4 (1985) 1609; S. Böhm, B. Drescher, *Stud. Biophys.* 107 (1985) 237.
- [73] R. S. Brown, C. Sander, P. Argos, *FEBS Lett.* 186 (1985) 271.
- [74] P. Y. Chou, G. D. Fasman, *Biochemistry* 13 (1974) 222.
- [75] B. Robson, R. H. Pain, *J. Mol. Biol.* 58 (1971) 237.
- [76] R. P. Wharton, M. Ptashne, *Trends Biochem. Sci. Pers. Ed.* 11 (1986) 71.
- [77] U. B. Rosenberg, C. Schröder, A. Preiss, A. Kienlin, S. Cote, I. Riede, H. Jäckle, *Nature (London)* 319 (1986) 336.
- [78] A. Vincent, H. V. Colot, M. Rosbash, *J. Mol. Biol.* 186 (1985) 149.
- [79] T. A. Hartshorne, H. Blumberg, E. T. Young, *Nature (London)* 320 (1986) 283.
- [80] A. Laughon, R. F. Gesteland, *Mol. Cell. Biol.* 4 (1984) 260.
- [81] B. Kammerer, A. Guyonvarch, J. C. Hubert, *J. Mol. Biol.* 180 (1984) 239.
- [82] F. Messenguy, E. Dubois, F. Desamps, *Eur. J. Biochem.* 157 (1986) 77.
- [83] A. Krust, S. Green, P. Argos, V. Kumar, P. Walter, J.-M. Bornert, P. Chambon, *EMBO J.* 5 (1986) 891.
- [84] W. F. Reynolds, J. M. Gottesfeld, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 1862.
- [85] E. B. Kmiec, F. Razvi, A. Worcel, *Cell (Cambridge Mass.)* 45 (1986) 209.
- [86] M. O. Dayhoff: *Atlas of Protein Structure, Vol. 5, Suppl. 3*. National Biomedical Research Foundation, Washington D.C. 1978.