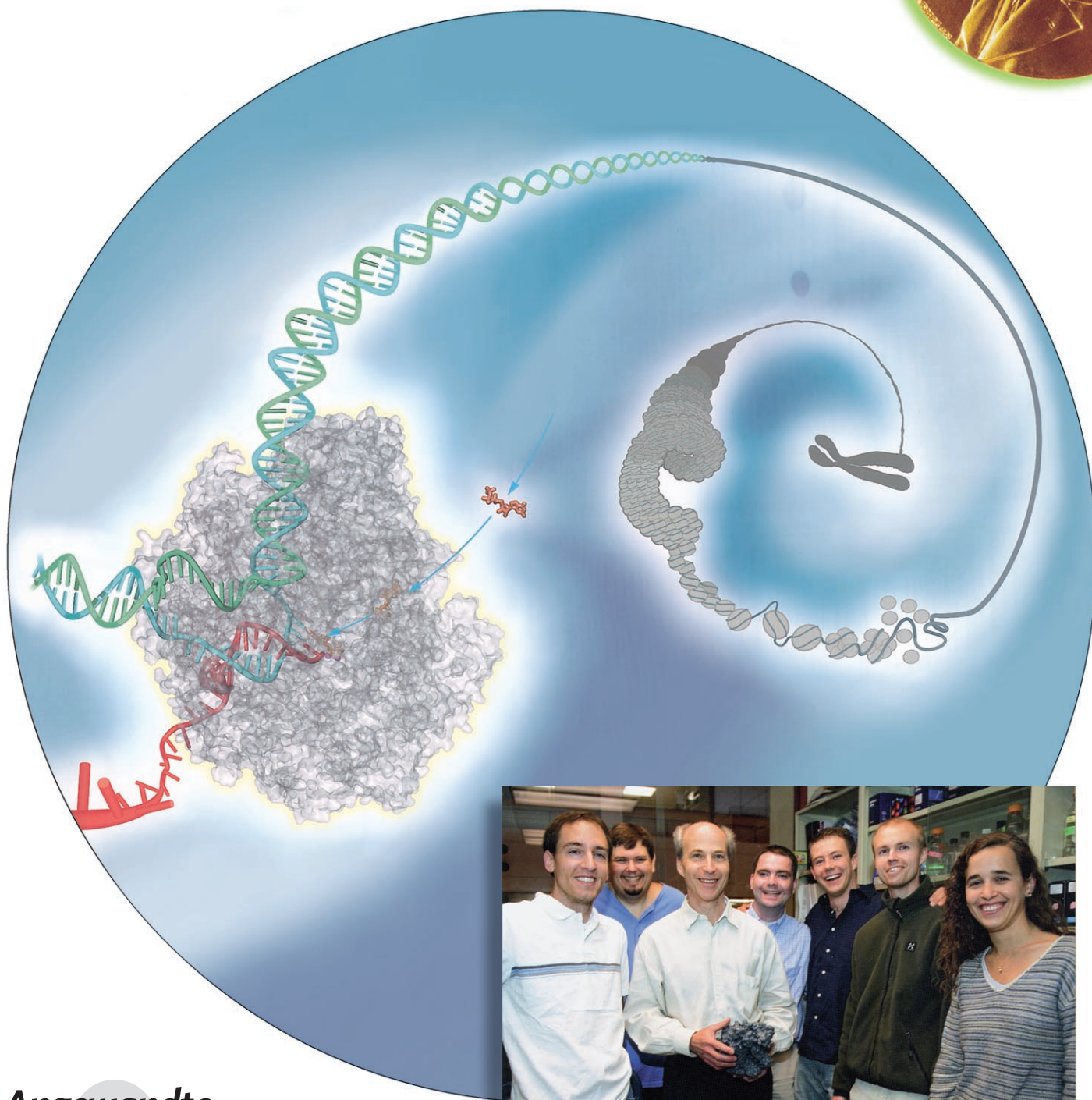


# THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY 2006



## Mechanismus der Gentranskription

## Die molekularen Grundlagen der eukaryotischen Transkription (Nobel-Vortrag)\*\*

Roger Kornberg\*

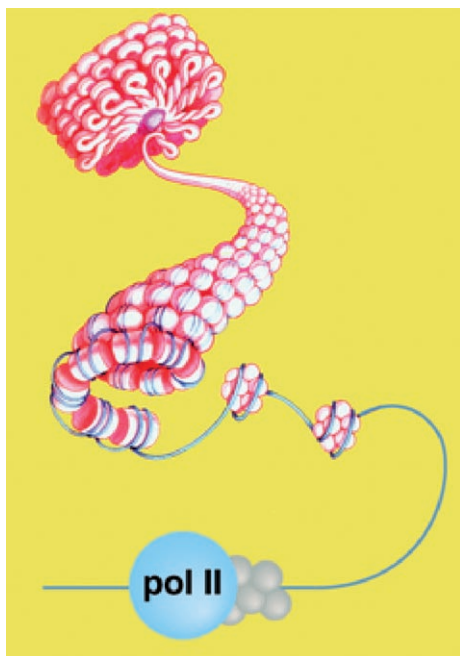
## Stichwörter:

Nobel-Vortrag · Nucleosomen · RNA-Polymerasen ·  
Strukturaufklärung · Transkription

*Ich bin zutiefst dankbar für die große Ehre, die mir das Nobel-Komitee für Chemie und die Königlich-Schwedische Akademie der Wissenschaften gewährt. Es ist eine Ehre, die ich mit meinen Mitarbeitern teile, und es ist auch eine Anerkennung für all diejenigen, die über ein Vierteljahrhundert hinweg zur Erforschung der Transkription beigetragen haben.*

## Das Nucleosom

Meine Beteiligung an der Transkriptionsforschung begann mit der Entdeckung des Nucleosoms, der Grundeinheit der DNA-Fäden im Chromosom von Eukaryoten.<sup>[1]</sup> Aufgrund von Röntgenstrukturuntersuchungen und proteinchemischen Ergebnissen kam ich zunächst zu dem Vorschlag, dass sich im Nucleosom die DNA um einen Komplex von acht Histonmolekülen wickelt (Abbildung 1). Einige Jahre später



**Abbildung 1.** Das Nucleosom, die Grundeinheit des eukaryotischen Chromosoms. Die Darstellung illustriert die Windung der DNA um einen Komplex von acht Histonen, die weitere Windung zum kondensierten (transkriptionsinaktiven) Chromatin und die Entwindung bei Wechselwirkungen mit der RNA-Polymerase II (pol II).

fanden Yahli Lorch und ich heraus, dass diese Wicklung der DNA in vitro die Einleitung der Transkription verhindert,<sup>[2]</sup> und Michael Grunstein und Mitarbeiter wiesen nach, dass dies auch in vivo der Fall ist.<sup>[3]</sup> Das Nucleosom dient als ein allgemeiner Repressor der Genaktivität. Es sorgt dafür, dass die vielen Tausende von Genen in eukaryotischen Zellen inaktiv sind – mit Ausnahme derjenigen, deren Transkription durch spezifische positive Regulationsmechanismen ausgelöst wird. Welches sind diese positiven Regulationsmechanismen? Wie wird die durch die Nucleosomen bewirkte Repression der Transkription aufgehoben? Unsere jüngsten Arbeiten haben gezeigt, dass das Promotorchromatin bei der Genaktivierung von einem statischen in einen dynamischen Zustand überführt wird.<sup>[4]</sup> Nucleosomen werden schnell abgebaut und im aktivierten Zustand wieder zusammengesetzt. Die Promotor-DNA wird vorübergehend für eine Wechselwirkung mit der Transkriptionsmaschinerie zugänglich gemacht.

## Transkription durch die RNA-Polymerase II

Unsere Studien konzentrierten sich auf den Transkriptionskomplex der RNA-Polymerase II (pol II), die für die Synthese der Boten-RNA in Eukaryoten zuständig ist. Die durch pol II vermittelte Transkription ist der erste Schritt in der Genexpression und daher Endpunkt zahlreicher Signal-

[\*] Prof. Dr. R. Kornberg  
Department of Structural Biology  
Stanford University, School of Medicine  
299 Campus Dr. West, Stanford CA, 94305-5126 (USA)  
Fax: (+1) 650-723-8464  
E-Mail: kornberg@stanford.edu

[\*\*] Copyright© The Nobel Foundation 2006. Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck einer deutschen Fassung des Vortrags.

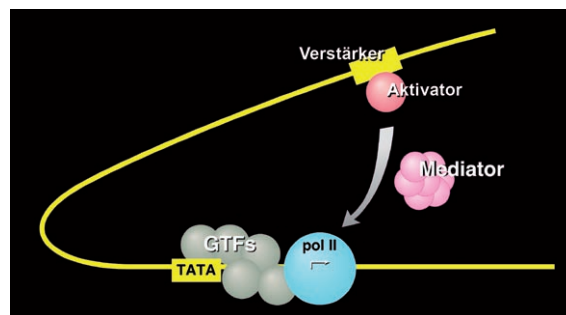
transduktionswege. Die Regulation der polII-Transkription hängt eng mit Aspekten der Zelldifferenzierung und -entwicklung zusammen.

Da sich die Nucleosomen zur Transkription in vivo von der Promotor-DNA ablösen, gelang es uns und anderen, mithilfe von Transkriptionstests mit freier DNA die Komponenten des Transkriptionskomplexes in vitro zu fraktionieren. Robert Roeder und Mitarbeiter begannen mit der Isolierung der polII-Transkriptionsproteine aus humanen HeLa-Zell-extrakten.<sup>[5]</sup> Diese ersten Versuche in diese Richtung wurden später von Ronald und Joan Conaway aufgegriffen und zu einem erfolgreichen Abschluss gebracht (durch Verwendung besser verfügbarer Rattenleberextrakte).<sup>[6]</sup> Wir in Stanford isolierten den polII-Komplex aus Hefe; die Arbeiten wurden von Neal Lue 1987 begonnen, der das seit langem bestehende Problem lösen konnte, einen transkriptionsaktiven polII-Extrakt aus Hefe zu gewinnen.<sup>[7]</sup> Rückblickend erwies sich unsere Entscheidung, Hefe als Modellsystem für unsere Studien zu verwenden, als glückliche Wahl. Mit diesem System gelang es uns gut, die Struktur und den Regulationsmechanismus des polII-Komplexes aufzuklären. Anfangs gab es ernsthafte Zweifel, ob die mit dem Hefesystem erhaltenen Ergebnisse für menschliche Zellen relevant seien. Die Fraktionierung von Hefe- und Säugersystemen führte jedoch zu den gleichen Ergebnissen.

Beide Systeme bestehen aus sechs Proteinen, nämlich polII und den fünf allgemeinen Transkriptionsfaktoren TFIIB, -D, -E, -F und -H.<sup>[8]</sup> Die RNA-Polymerase II ist in der Lage, DNA zu entwinden, RNA zu synthetisieren und DNA anschließend erneut aufzuwickeln. Sie ist aber alleine nicht in der Lage, einen Promotor zu erkennen und die Transkription einzuleiten. Für diese essenziellen Funktionen ist die Beteiligung der allgemeinen Transkriptionsfaktoren erforderlich.

### Transkriptionsregulation durch den Mediator

Die erste Vermutung war, dass dieser Satz von sechs Proteinen ein vollständiges Transkriptionssystem bildet, das sowohl für die Initiation als auch für die Regulation der Transkription zuständig sei. Man nahm daher an, dass eine direkte Kommunikation zwischen einem regulatorischen Protein und dem Transkriptionskomplex stattfindet. Wir fanden nun aber, dass eine zusätzliche Fraktion des Rohextrakts für die Regulation im Hefesystem erforderlich war (Abbildung 2), und wir bezeichneten diese Aktivität als den „Mediator“.<sup>[9,10]</sup> 1994 isolierten Stefan Bjorklund und Young-Joon Kim das aktive Protein als einen Komplex aus mehr als zwanzig Untereinheiten mit einer Gesamtmasse von über einer Million Dalton.<sup>[11]</sup> Dreizehn dieser Untereinheiten waren Produkte von Genen, die zuvor bei der Suche nach Transkriptionsregulatoren identifiziert worden waren. Die Screening-Ansätze waren ganz unterschiedlich und wurden mit verschiedenen Promotoren in verschiedenen Labors zu verschiedenen Zeiten durchgeführt. Mit der Isolierung des Mediators fügten sich die aus diesen Screenings erhaltenen Produkte nun zu einer gemeinsamen biochemischen Funktionseinheit zusammen. Dennoch wurde das Konzept des Mediators zunächst nicht allgemein akzeptiert, weil man in hö-



**Abbildung 2.** Funktion des Mediators in der Transkriptionsregulation: Ein Genaktivatorprotein, das an ein Verstärkerelement gebunden ist, übermittelt regulatorische Information an den polII-Transkriptionskomplex in der Promotorregion.

heren Organismen eine direkte Regulation erwartete, und zwar über die Wechselwirkung des Genaktivatorproteins mit den TAF-Untereinheiten (TAF: TBP-assoziierter Faktor; TBP: TATA-Bindungsprotein) des allgemeinen Transkriptionsfaktors TFIID. 1998 gelang es uns und anderen schließlich, den entsprechenden Mediator aus Säugerzellen zu isolieren (siehe dazu die Übersichtsartikel in Lit. [12,13]); gleichzeitig wurde nachgewiesen, dass die TAFs für die Erkennung des Promotors und nicht für die Regulation zuständig sind.<sup>[14–16]</sup> Hinzu kam später der Befund, dass 22 der 25 Untereinheiten des Mediators Homologe in höheren Zellen haben.<sup>[17,18]</sup>

Der Mediator ist in all seiner Komplexität längst nicht verstanden, dreierlei ist jedoch klar: 1) Der Mediator ist nicht nur die Basis der regulierten Transkription; er wird für beinahe jede Art von Transkription durch fast jeden polII-Promotor benötigt.<sup>[19,20]</sup> Der Mediator ist genauso bedeutsam für die Transkription wie polII selbst. 2) Der Mediator geht mit beiden Aktivatorproteinen und mit polII eine direkte Wechselwirkung ein.<sup>[13]</sup> Er bildet einen stabilen Komplex mit einem Aktivator an einem Verstärkerelement und lagert sich anschließend mit polII und den allgemeinen Transkriptionsfaktoren am Promotor zusammen und leitet so die Transkription ein.<sup>[12]</sup> 3) Der Mediator ist nicht nur für die positive, sondern auch für die negative Transkriptionsregulation wichtig.

Wenn der Mediator im Allgemeinen nur als Coaktivator bezeichnet wird, so ist dies irreführend. Der Mediator ist ein Coaktivator, ein Corepressor und ein allgemeiner Transkriptionsfaktor in einem. Er kann als signalverarbeitende Funktionseinheit angesehen werden. Seine Funktion – die Übertragung von Regulationssignalen von den Verstärkerelementen auf die Promotoren – ist bei allen Organismen, von der Hefe bis zum Menschen, die gleiche.

### Strukturuntersuchungen am polII-Transkriptionskomplex

Ein bekannter Ausspruch lautet: „Um die Funktion zu verstehen, muss man die Struktur untersuchen“. Im Falle des polII-Transkriptionskomplexes liegt die Herausforderung in der schieren Größe des Moleküls. Bevor es zur Transkriptionsinitiation kommt, lagert sich ein riesiger Komplex aus fast



60 Proteinen mit einer Gesamtmasse von über drei Millionen Dalton am polII-abhängigen Promotor zusammen (Abbildung 3). Wir begannen unsere Studien mit der Strukturaufklärung der Polymerase II, die den Kern des Transkriptions-

	Untereinheiten	Masse (kD)
RNA-Polymerase II	12	515
allgemeine Transkriptionsfaktoren	26	1560
Mediator	21	1005
Präkomplex	58	3080

**Abbildung 3.** Der Transkriptionskomplex der RNA-Polymerase II. Angegeben sind die ungefähren Massen der Proteine aus *S. cerevisiae*.

komplexes bildet. Im Nachhinein stellte sich dieses Vorgehen als eine erneut glückliche Wahl heraus, da polII als Plattform fungiert, an der sich die kleineren und einfacheren Transkriptionsfaktoren anordnen. Ein Ergebnis unserer Untersuchungen war, dass einige der allgemeinen Faktoren ihre vollständig und korrekt gefaltete Struktur erst bei der Wechselwirkung mit polII einnehmen. Die Kenntnis der polII-Struktur war der Schlüssel zum Verständnis der eukaryotischen Gentranskription.

## Zweidimensionale Proteinkristallographie

Die Geschichte der polII-Struktur begann mit meiner Magisterarbeit in physikalischer Chemie, in deren Rahmen ich Kernresonanzexperimente zur lateralen Diffusion von Lipidmolekülen in Multischichten durchführte.<sup>[21]</sup> Auf der Grundlage der damals erzielten Ergebnisse kam mir Jahre später der Gedanke, die laterale Diffusion zur Bildung einschichtiger oder zweidimensionaler (2D) Proteinkristalle zu nutzen. Die Idee war, ein Protein über die Wechselwirkung mit der Lipidkopfgruppe an eine Lipidschicht zu binden. Das gebundene Protein wäre in zwei Dimensionen fixiert, könnte sich aber in der Ebene frei bewegen und kristallisieren (Lit. [22] und Abbildung 4). Seth Darst und Al Edwards gelang auf diese Weise die Herstellung von zweidimensionalen Kristallen von polII.<sup>[23]</sup> Die ersten Kristalle, die auf diese



**Abbildung 4.** Zweidimensionale Proteinkristallisation an Lipidschichten. Proteine (ovale Symbole) binden an die Kopfgruppen (rote Dreiecke) von Lipidmolekülen, die eine Monoschicht an der Luft-Wasser-Grenzfläche bilden. Die schnelle laterale Diffusion der Lipide führt zur Proteinkristallisation.

Weise gezüchtet wurden, waren klein und ziemlich ungeordnet und kaum für eine Strukturbestimmung geeignet, waren aber ein guter Ausgangspunkt für weitere Arbeiten. Die Methode war einfach, schnell und erforderte wenig Material, sodass wir systematische Versuche unternahmen, bessere Kristalle von polII zu erhalten. Wir fanden heraus, dass eine Strukturheterogenität aufgrund des substöchiometrischen Gehalts von zwei kleinen Polymerase-Untereinheiten das Problem war; beide Proteine machten zwar nur 8% der gesamten Enzymmasse aus, beeinträchtigten aber durch ihren veränderlichen Gehalt die Kristallisation. Wir verwendeten daher eine Deletionsmutante von polII aus Hefe, der die beiden Untereinheiten fehlten. Diese ergab sehr große, außerordentlich gut geordnete 2D-Kristalle.<sup>[24]</sup> Sogar bei den niedrigen Proteinkonzentrationen von etwa  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , die bei der Züchtung von 2D-Kristallen eingesetzt werden, konnten wir oft beobachten, dass die Kristalle zusätzliche Schichten anlagerten, die sich an der ersten Schicht ausrichteten. Dieses epitaktische Wachstumsverhalten machten wir uns zu Nutze, um die 2D-Kristalle als Kristallisationskeime für die Züchtung von 3D-Kristallen für die Röntgenstrukturanalyse einzusetzen.

## Röntgenstrukturanalyse der RNA-Polymerase II

Es war ein aufregender Moment, als wir die ersten dreidimensionalen Kristalle erhielten. Das größte unsymmetrische Teilchen, von dem damals – vor 17 Jahren – eine Röntgenkristallstruktur bekannt war, hatte ein Fünftel der Größe von polII. Dafür gab es Gründe, denn Strahlintensitäten, Detektoren und Rechnerkapazitäten waren begrenzt. Soweit kamen wir aber gar nicht, denn unsere Kristalle erzeugten überhaupt keine Beugungssignale! Das Projekt wäre an dieser Stelle zu Ende gewesen, wenn Al Edwards nicht aufgefallen wäre, dass die Kristalle einen leicht gelblichen Farbton hatten. Unser Problem hieß Oxidation: Die Kristalle mussten unter Argon gezüchtet und aufbewahrt werden.

Es stellte sich heraus, dass die Kristalle ausgesprochen polymorph waren, mit Abweichungen von mehr als  $10 \text{ \AA}$  entlang einer Richtung der Elementarzelle. Diese Abweichungen und die schiere Größe von polII machten die Phasenjustierung nach dem mehrfachen isomorphen Ersatz mit Schweratomen zu einer echten Herausforderung. Jianhua Fu fand die am besten beugende Form der polII-Kristalle, wobei er große Datenmengen (die er von einer großen Zahl von Kristallen erhalten hatte) sowie Schweratomcluster nutzte, um das Phasenproblem zu lösen. Er fand passende Paare nativer und derivatisierter Kristalle, von denen er Phasen mit einer Auflösung von  $5 \text{ \AA}$  ableiten konnte.<sup>[25]</sup> Die daraus erhaltene Elektronendichtekarte entsprach ziemlich genau der Struktur von polII mit  $16 \text{ \AA}$  Auflösung, wie sie elektronenmikroskopisch aus den 2D-Kristallen und der dreidimensionalen Rekonstruktion bestimmt worden war. Dies war der entscheidende Wendepunkt in der Erforschung der polII-Struktur. Mit verlässlichen  $5\text{-\AA}$ -Phasen war es im Prinzip möglich, einzelne Schweratome zu lokalisieren und die Struktur bis zu einer beinahe atomaren Auflösung zu bestimmen.

Patrick Cramer und Dave Bushnell kümmerten sich um die Herstellung weiterer Schweratomderivate. Als sie zu diesem Zweck die Stammlösung der Kristalle austauschten, schrumpften die Kristalle um 11 Å entlang der zuvor variablen Richtung der Elementarzelle. Dadurch erledigte sich das Problem der Polymorphie, und die Beugung konnte auf eine Auflösung von 2.8 Å verfeinert werden. Keines der fünfzig Schweratomreagentien, die man gewöhnlich zur Phasenbestimmung einsetzt, ergab brauchbare Derivate. Als geeignet erwiesen sich dann schließlich eine Iridiumverbindung, die von Fu identifiziert wurde, sowie mehrere Rheniumverbindungen. Die resultierende Struktur bestand aus etwa 3500 Aminosäuren mit 28000 Atomen, Wasserstoffatome nicht mitgezählt (Lit. [26,27] und Abbildung 5).



**Abbildung 5.** Struktur der RNA-Polymerase II in 2.8 Å Auflösung. Das Protein ist in Bänderdarstellung gezeigt mit den Untereinheiten in unterschiedlichen Farben und einem  $Mg^{2+}$ -Ion im aktiven Zentrum als rosafarbene Kugel. Das Schema oben rechts zeigt ein Wechselwirkungsdiagramm.

Es stellte sich die Frage, an welcher Stelle von pol II DNA und RNA binden. Die Antwort konnte anhand der Strukturbestimmung der Polymerase in einem aktiven Transkriptionskomplex gegeben werden. Wir versuchten die ganze Zeit, einen solchen Komplex zu kristallisieren, während wir an der Struktur der isolierten Polymerase arbeiteten. Das Problem war, dass sogar hochreines pol II viele inaktive Moleküle enthält, die jede Präparation von Transkriptionskomplexen verunreinigen würden. Letztlich war es Avi Gnatt, der eine Möglichkeit fand, die inaktiven Moleküle zu entfernen und Kristalle von transkribierenden Komplexen zu züchten.<sup>[28]</sup> Die Transkription wurde angehalten, indem man dem System eines der vier Nucleosidtriphosphate (NTPs) vorenthielt, und nach Tränken der Kristalle mit dem fehlenden NTP setzte die Transkription ohne Beeinträchtigung der Kristallmorphologie wieder ein. Die Kristalle waren sehr dünn und ermöglichten nur eine Auflösung von 6 Å. Nach mehreren Jahren Arbeit und vielen weiteren Versuchen gelang es Avi, mit der Methode des molekularen Ersatzes unter Verwendung der 2.8-Å-Polymerasestruktur einen vollständigen Datensatz mit einer Auflösung von 3.3 Å zu erhalten.<sup>[29]</sup>

Die DNA lagert sich als Doppelstrang an den Transkriptionskomplex an und entwindet drei Basen vor dem aktiven Zentrum (Abbildung 6). Der Matrizenstrang macht dann einen scharfen Knick, sodass die nächste Base aus der Helix

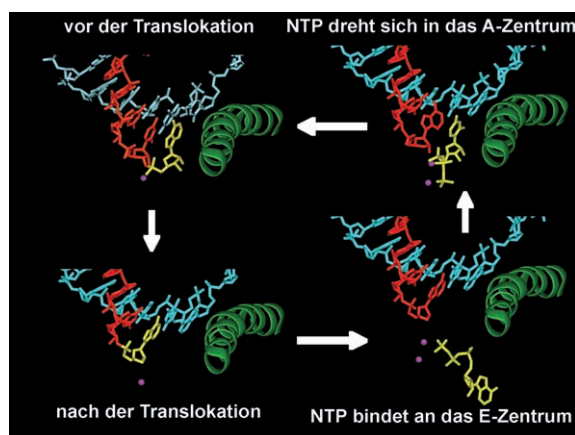


**Abbildung 6.** Struktur der RNA-Polymerase II (nahe atomarer Auflösung) während der Gentranskription. Die Polypeptidkette ist weiß, orange (bewegliche „Klammer“) und grün (Brückenhelix zwischen den beiden größten Untereinheiten) dargestellt, die Nucleinsäuren (nur das Rückgrat ist gezeigt) sind blau (Matrizenstrang), grün (Gegenstrang) und rot (RNA).

gleitet und in Richtung des aktiven Zentrums ragt. Diese Base wird mit dem Ribonucleotid gepaart, das gerade an den RNA-Strang angefügt wird. In der Struktur kann man acht weitere DNA-RNA-Hybridbasenpaare und eine zusätzliche Base am Matrizenstrang der DNA erkennen. Der Rest des Matrizenstrangs, die RNA und der nichtcodierende DNA-Gegenstrang sind hochbeweglich oder liegen ungeordnet vor und werden nicht beobachtet.

### Genauigkeit der Transkription

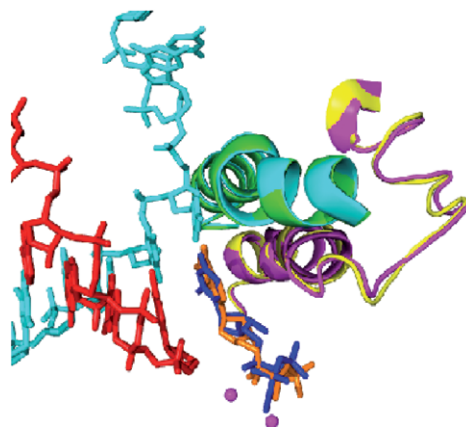
Wie wählt pol II das richtige Nucleotid für die Verlängerung der RNA-Kette aus? Dies ist das Kernproblem der Transkription: das genaue Ablesen des genetischen Codes. In unseren jüngsten Studien konnten wir zeigen, wie dieses genaue Ablesen erreicht wird. In unserem ursprünglich untersuchten Transkriptionskomplex befand sich das Nucleotid, das gerade an die RNA angefügt wurde, noch im aktiven Zentrum. In darauf folgenden Strukturbestimmungen konnten wir den Komplex in dem Stadium abfangen, das auf die Translokation der DNA und RNA folgt; dabei entsteht im aktiven Zentrum eine Leerstelle, in die das nächste NTP binden kann (Abbildung 7). Nach Imprägnieren von Kristallen dieses Posttranslokationskomplexes mit NTPs wurde an zwei Stellen des Komplexes zusätzliche Elektronendichte beobachtet.<sup>[30]</sup> Alle vier NTPs banden an die Eintrittsstelle (E), aber nur das zur nächsten codierenden Base der DNA passende NTP fand sich im aktiven Zentrum an der Nucleotidverknüpfungsstelle (A) wieder. Die NTPs in der E-Stelle waren umgekehrt orientiert wie die in der A-Stelle, was zu dem Vorschlag führte, dass die NTPs in der E-Stelle rotieren, um eine mögliche Basenpaarung in der A-Stelle auszutesten.



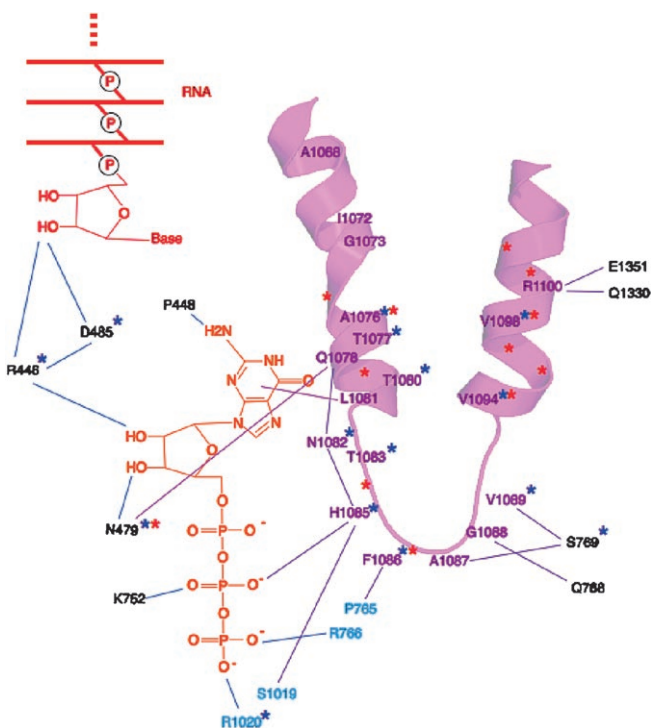
**Abbildung 7.** Ein Zyklus des Nucleotideinbaus durch die RNA-Polymerase II. Oben links: vereinfachte Struktur nach Abbildung 6 mit DNA (blau) und RNA (rot) in unmittelbarer Umgebung des aktiven Zentrums (violett) und der Brückenhelix (grün). Das Ribonucleotid im aktiven Zentrum, das gerade an die RNA-Kette angefügt wird, ist gelb dargestellt. Unten links: Struktur nach der Translokation von DNA und RNA über die Oberfläche der Polymerase II. Unten rechts: die gleiche Struktur mit einem ungepaarten NTP an der Eintrittsstelle (E, „entry site“). Oben rechts: Um an die RNA-Kette angefügt zu werden, muss das NTP mit der codierenden Base im Matrizenstrang eine passgenaue Basenpaarung an der Verknüpfungsstelle (A, „addition site“) eingehen.

Die Genauigkeit der Transkription war anhand der beschriebenen Strukturen jedoch nicht zu erklären. Der Energiegewinn der Basenpaarung – entsprechend zwei oder drei Wasserstoffbrücken zum Matrizenstrang der DNA – ist viel zu gering, um für Selektivität in der Polymerasereaktion zu sorgen. Das Rätsel blieb lange ungelöst, bevor es letztlich Dong Wang und Dave Bushnell 2006 gelang, nach Durchmusterung von vielen hunderten von Kristallen eine verbesserte Auflösung und Datenqualität der Kristallstruktur zu erzielen. Demnach tritt im Transkriptionskomplex mit korrekt gepaartem NTP ein charakteristisches Strukturelement in unmittelbarer Umgebung der A-Stelle auf, das als Triggerschleife bezeichnet wird (Lit. [31] und Abbildung 8). Die Triggerschleife war schon in vielen polII-Strukturen wahrgenommen worden, wurde nun aber erstmals in unmittelbarer Nachbarschaft zur A-Stelle beobachtet. In allen zuvor bestimmten Strukturen war dieses Strukturelement 30 Å oder mehr von der A-Stelle entfernt. Die Triggerschleife ist offensichtlich ein bewegliches Element, das bei korrekt gepaarten NTPs in der A-Position wie eine Falltür zuschlägt.

Die Triggerschleife befindet sich mit allen Bestandteilen der NTPs in Kontakt: mit der Base, dem Phosphatrest und – über Aminosäurereste von polII – auch mit dem Zucker (Abbildung 9). Das entstehende Netzwerk aus Wechselwirkungen schließt sogar die 2'-OH-Gruppe des zuletzt eingefügten RNA-Nucleotids mit ein. Die Bedeutung der jeweiligen Wechselwirkungen lässt sich durch Mutationen der Triggerschleife ermitteln. Mutiert man beispielsweise Asparagin 479, das über eine Wasserstoffbrücke mit der 3'-OH-Gruppe des NTP verbunden ist, so geht die Diskriminierung zwischen dem normalen Nucleotid und einem 3'-Desoxynucleotid verloren. Die Diskriminierung ist nicht sehr groß und



**Abbildung 8.** Die Triggerschleife. Überlagerte Strukturen von Transkriptionskomplexen (vgl. Abbildung 7, oben rechts) mit einem Purin- (orange) oder einem Pyrimidin-Nucleotid (dunkelblau) in der A-Stelle. Die entsprechenden Triggerschleifen sind violett bzw. gelb und die Brückenhelices grün bzw. hellblau dargestellt.

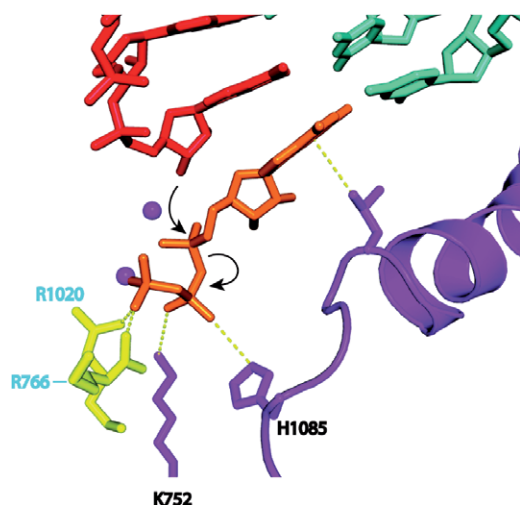


**Abbildung 9.** Strukturelle Vernetzung der Triggerschleife. Triggerschleife: magenta, GTP: orange, 3'-Ende der RNA: rot; andere Aminosäurereste der Untereinheiten Rpb1 und Rpb2: schwarz bzw. cyan. Die Sterne markieren Aminosäurereste, deren Mutation die Kettenverlängerung in vivo beeinträchtigt (blau: Literaturdaten; rot: unpublizierte Daten von Craig Kaplan).

beträgt nur etwa das zehnfache der Energie einer Wasserstoffbrücke. Im Vergleich dazu ist die Diskriminierung zwischen einem normalen Ribo-NTP und einem 2'-Desoxy-NTP sehr groß (mindestens Faktor 1000), wird aber durch die Mutation von Asparagin 479 nicht beeinträchtigt. Wie wird eine so außergewöhnliche Spezifität für eine einzelne OH-Gruppe erreicht? Die Antwort liegt in der Anordnung der



Triggerschleife zum NTP und der exakten Positionierung einer Histidin-Seitenkette in 3.5 Å Entfernung von der  $\beta$ -Phosphatgruppe (Abbildung 10). Das Histin vermittelt den Elektronenfluss beim nucleophilen Angriff der 3'-OH-



**Abbildung 10.** Die Triggerschleife koppelt die NTP-Erkennung an die Bildung der Phosphodiesterbindung. Farbcodierung wie in Abbildung 8; Seitenketten von Rpb2-Arg1020 und Rpb2-Arg766 sind gelb dargestellt. Die Wechselwirkungen, die für die Anordnung sowie den Kontakt von Histidin 1085 mit dem die Katalyse vermittelnden NTP maßgeblich sind, sind mit gestrichelten Linien gekennzeichnet. Nucleophiler Angriff und Spaltung der Phosphoanhydridbindung sind durch Pfeile angedeutet.

Gruppe am Kettenende sowie die Spaltung der Phosphoanhydridbindung und wirkt als Protonendonator für die Pyrophosphat-Abgangsgruppe. Es löst damit die Bildung der Phosphodiesterbindung aus und koppelt die Nucleotidselektion an die Katalyse.

Die elektronischen Vorgänge, an denen die Triggerschleife beteiligt ist, erfordern eine exakte Anordnung der wechselwirkenden Reste. Hierzu wird das im Falle des richtigen NTP gebildete Netzwerk der Triggerschleife genutzt. Bei einem falschen NTP – beispielsweise einem 2'-Desoxy-NTP – kommt es dagegen zu einer falschen Anordnung. Eine Doppelhelix mit einem 2'-Desoxynucleotid ist um 2 Å schmaler als mit einem Ribonucleotid. Die resultierende Fehlstellung zum katalytischen Histidinrest ist so groß wie bei einer Pyrimidin-Pyrimidin-Basenfehlpaarung, sodass die Bildung der Phosphodiesterbindung um den Faktor 1000 verlangsamt wird.

### Nucleinsäuretranslokation

Die Bedeutung des Triggerschleifennetzwerks reicht über die Nucleotidselektion und Katalyse hinaus. Das Netzwerk bildet auch viele Kontakte zur Brückenhelix, die ihrerseits mit der codierenden Base im Matrizenstrang interagiert. Die bakterielle Polymerase, deren Struktur Seth Darst bestimmte, weist ebenfalls eine Brückenhelix auf, die im Unterschied zu derjenigen in polII aber gebogen ist (Lit. [32] und Abbil-

dung 11). Die Biegung resultiert in einer Auslenkung um etwa 3 Å in Richtung des Matrizenstrangs, was einem Schritt um eine Base entlang des Strangs entspricht. Wir schlossen daraus, dass dem Translokationsschritt bei der Transkription

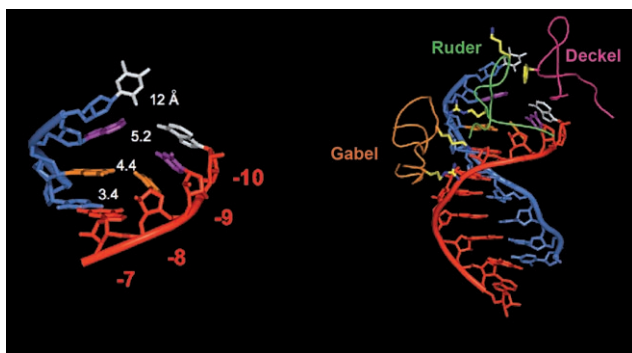


**Abbildung 11.** Gerade und gebogene Konformation der Brückenhelix in der Struktur der RNA-Polymerase II und der bakteriellen RNA-Polymerase, denen eine Rolle bei der Translokation der Nucleinsäure in der Transkription zugeschrieben wird. Farbcodierung wie in Abbildung 6, nur die Brückenhelix ist violett dargestellt.

Konformationsübergänge der Brückenhelix zwischen der gestreckten und der gebogenen Form zugrunde liegen. Die Brückenhelix kann man sich als eine Art Hebel vorstellen, der die Polymerase für den Translokationsschritt von der DNA und RNA löst, gleichzeitig aber mit dem wachsenden Ende der DNA-RNA-Hybridhelix verbunden bleibt und die Kontrolle über die Transkription aufrechterhält. Inzwischen gibt es eine Reihe biochemischer und genetischer Befunde, die diese Vorstellung untermauern.

### RNA-Freisetzung

Der letzte Schritt der Transkription ist die Freisetzung der RNA. Es stellt sich die Frage, wie die RNA von der DNA-Matrize abgeschält wird, wie also die sehr stabile RNA-DNA-Hybridhelix aufgebrochen und die RNA in die Lösung entlassen wird. Während unsere ursprüngliche Struktur des Transkriptionskomplexes keinen Hinweis auf den Mechanismus dieses wichtigen Reaktionsschritts lieferte, bot eine von Ken Westover aufgeklärte Struktur Einblicke in die RNA-Freisetzung.<sup>[33]</sup> In dieser Struktur liegt das Basenpaar 7 des DNA-RNA-Hybrids in normaler Anordnung vor, d.h., die Basen sind coplanar mit einem Abstand, der für die Ausbildung der Wasserstoffbrücken passend ist (Abbildung 12). Die Basenpaare 8, 9 und 10 weisen jedoch zunehmend größere Abstände auf, sodass sich DNA- und RNA-Strang aufspreizen. Entscheidend beteiligt sind drei Proteinschleifen, die Gabelschleife 1 (fork loop), die Ruderschleife (rudder) und die Deckelschleife (lid) (Abbildung 12). Diese Schleifen wurden in allen vorhergehenden Strukturen von polII in einer ungeordneten Konformation beobachtet. Ruder- und Deckelschleife befinden sich zwischen DNA- und RNA-Strang, wobei die Ruderschleife mit der DNA und die Deckelschleife mit der RNA interagiert. Eine Phenylalanin-Seitenkette der Deckelschleife dient als Keil, der die Stränge getrennt hält. Die Gabelschleife 1 ist mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der Hybridhelix bei den Basenpaaren 6 und 7 assoziiert, stabilisiert die Helix und begrenzt die Strangtrennung auf die Positionen 8 und später; damit wird verhindert, dass sich die DNA-RNA-Hybridhelix weiter auftrennt.

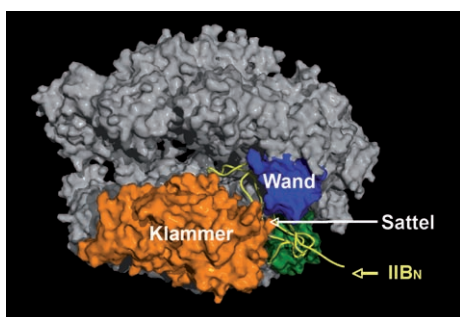


**Abbildung 12.** Freisetzung des RNA-Transkripts aus dem DNA-RNA-Hybrid; der Mechanismus wurde anhand der Struktur eines Transkriptionskomplexes der RNA-Polymerase II abgeleitet. Links: das strang-aufwärts gelegene Ende der DNA-RNA-Hybridhelix, sieben bis zehn Reste vom aktiven Zentrum entfernt; die Abstände zwischen den DNA- und den RNA-Basen sind angegeben. Rechts: gesamte DNA-RNA-Hybridhelix zusammen mit Proteinschleifen, die an der Auftrennung (Ruderschleife und Deckelschleife) und Stabilisierung (Gabelschleife) der Helix beteiligt sind.

### Der pol II-TFIIB-Komplex

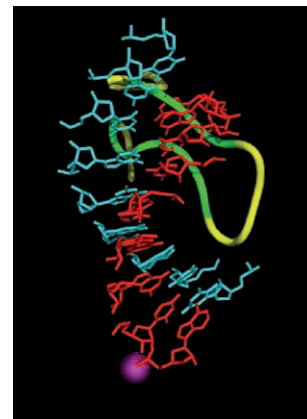
Zuletzt bleibt noch die Frage, wie sich der Transkriptionskomplex zu Beginn der Reaktion bildet. Wie wird der gestreckte DNA-Doppelstrang im Promotorbereich aufgetrennt, gebogen und in das aktive Zentrum der pol II eingefügt, wodurch die Transkription initiiert wird? Diese Vorgänge werden durch die allgemeinen Transkriptionsfaktoren TFIIB, -D, -E, -F und -H vermittelt. Unsere Röntgenstrukturanalysen der pol II-TFIIB- und pol II-TFIIF-Komplexe ermöglichten einen Einblick in den Initiationsmechanismus.

Anhand der Struktur des pol II-TFIIB-Komplexes<sup>[34]</sup> konnten die unterschiedlichen Funktionen der N- und C-terminalen Domänen von TFIIB geklärt werden. Die Polypeptidkette der N-terminalen Domäne (gelb in Abbildung 13) beginnt mit einem Zn-bindenden Faltblatt, das zwischen den als Klammer und Wand bezeichneten Bereichen an die pol II-Oberfläche bindet. Was dann folgt, ist erstaunlich: Anstatt sich in das Lösungsmittel zurückzufalten, legt sich die Polypeptidkette über den Sattel zwischen



**Abbildung 13.** Struktur eines pol II-TFIIB-Komplexes. Hervorgehoben sind die als Klammer und Wand bezeichneten Bereiche der Oberfläche von pol II (siehe auch Abbildung 6), eine Verlaufsspur für die Polypeptidkette des aminoterminalen Endes von TFIIB (IIB<sub>N</sub>; gelb) und die mit dem IIB<sub>N</sub> interagierende Region der pol II-Oberfläche (grün).

Klammer und Wand und orientiert sich zum aktiven Zentrum hin; von dort aus kehrt sie mit einer Haarnadelschleife zurück über den Sattel. Die Schleife, die wir B-Finger genannt haben, nimmt fast die gleiche Position ein wie das DNA-RNA-Hybrid im Transkriptionskomplex. Überlagert man den B-Finger mit dem DNA-RNA-Hybrid des Transkriptionskomplexes, zeigt sich bis zur Position 5 kein sterischer Konflikt mit dem Matrizenstrang der DNA oder der RNA, in Position 6 und dahinter kommt es jedoch zur Kollision mit der RNA (Abbildung 14).

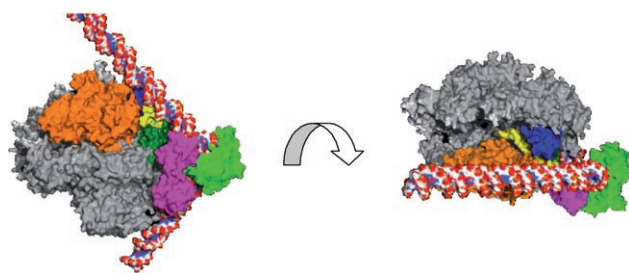


**Abbildung 14.** Überlagerung der DNA-Hybridhelix in einem Transkriptionskomplex der RNA-Polymerase II (Abbildung 6) mit dem B-Finger in einem pol II-TFIIB-Komplex (Abbildung 13). Die konservierte Region des B-Fingers ist grün dargestellt.

Biochemische Experimente belegen, dass der B-Finger nicht nur mit dem fünf RNA-Reste langen Hybrid kompatibel ist, sondern für die Stabilität eines solchen Komplexes sogar benötigt wird. Sobald die RNA allerdings über fünf oder sechs Reste hinauswächst, muss sie mit TFIIB um ihren Platz auf dem Sattel von pol II konkurrieren. Behält TFIIB die Oberhand, wird die Initiierung abgebrochen und muss aufs Neue eingeleitet werden. „Gewinnt“ dagegen die RNA, wird TFIIB abgestoßen, und pol II wird vom Promotor gelöst, damit die Transkription fortgesetzt und abgeschlossen werden kann. Der B-Finger erklärt somit zwei entscheidende und bis vor kurzem rätselhafte Aspekte der pol II-Transkription, nämlich den Abbruch der Initiation und die Ablösung vom Promotor. Der Mechanismus findet seine Parallele in der Funktion des Sigma-Faktors bei der bakteriellen Transkription.<sup>[35,36]</sup>

Wenden wir uns nun der C-terminalen Domäne von TFIIB zu. Anhand ihrer Position im pol II-TFIIB-Komplex ließ sich in Modellstudien ein Strukturelement konstruieren, das bereits seit längerem bekannt ist:<sup>[37]</sup> ein ternärer Komplex aus einem C-terminalen TFIIB-Fragment, der TBP-Untereinheit (TBP: TATA-bindendes Protein) von TFIID und einem DNA-Fragment, der TATA-Box (Abbildung 15). Diese Modellierung brachte uns auf eine zündende Idee: Die TATA-Box wird durch die TBP-Untereinheit eng umgeben – was würde nun geschehen, wenn die Enden des gebogenen Fragments mit geraden DNA-Stücken in der B-Form verlängert würden? Das Ergebnis war in doppelter Hinsicht



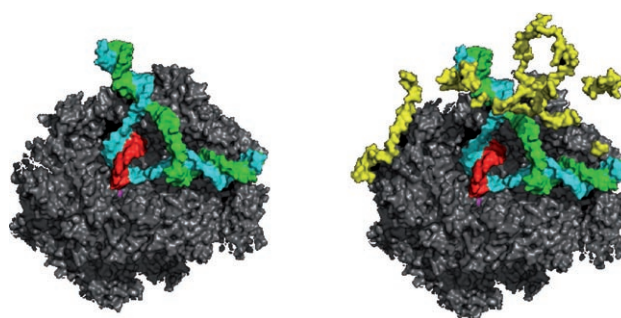


**Abbildung 15.** Modell eines polII-TBP-TFIIB-DNA-Komplexes. Die Struktur der C-terminalen Region von TFIIB (violett) im Komplex mit TBP (grün) und der TATA-Box der DNA (rot, weiß, blau) wurde an die Struktur des polII-TFIIB-Komplexes andockt (wie in Abbildung 13 gezeigt). Die Ansichten rechts und links sind um 90° gedreht, wie durch den gebogenen Pfeil angedeutet ist. Die Blickrichtung auf der rechten Seite ist die gleiche wie in Abbildung 13.

bemerkenswert: Erstens passte die DNA nun bequem in das Protein (Abbildung 15, links), da das TBP offensichtlich die Form der Promotor-DNA an die Konturen der polII-Oberfläche anpasst. Zweitens verläuft der DNA-Abschnitt unterhalb der TATA-Box über den Sattel (Abbildung 15, rechts). Der Abstand zwischen TATA-Box und Sattel beträgt etwa 1.5 Windungen der Doppelhelix entsprechend fünfzehn Basenpaaren. Wir wissen von der Struktur des Transkriptionskomplexes, dass etwa zwölf Basenpaare erforderlich sind, um den Sattel zum aktiven Zentrum hin zu überqueren. Die Summe von fünfzehn Basenpaaren von der TATA-Box und zwölf Basenpaaren bis zum aktiven Zentrum macht 27 Basenpaare aus, was gut mit dem Abstand von 25 bis 30 Basenpaaren zwischen TATA-Box und Transkriptionsstartstelle bei fast allen polII-abhängigen Promotoren übereinstimmt. Auf diese Weise könnte die polII-TFIIB-Wechselwirkung die Startstelle für die Transkription festlegen.

### Der polII-TFIIF-Komplex

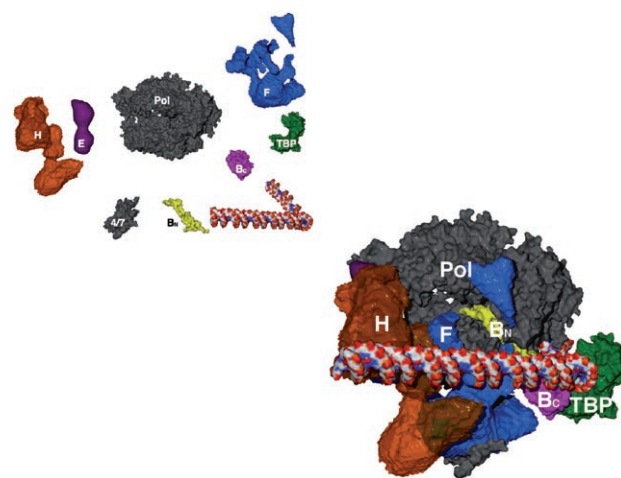
Die Cokristallstruktur eines Transkriptionskomplexes mit der zentralen Untereinheit von TFIIF gibt ebenfalls Aufschluss über die Initiation der Transkription. Die Befunde sind Gegenstand laufender Studien von Guillermo Calero und beruhen auf fundierten Erkenntnissen zum biochemischen Verhalten von TFIIF. Die Struktur umfasst eine vollständige Transkriptionsblase – also nicht nur den Matrizenstrang der DNA mit der assoziierten RNA, wie er schon in früheren Strukturen sichtbar war, sondern auch den DNA-Gegenstrang und die strangaufwärts liegende Region, in der die DNA-Doppelhelix nach der Transkription zurückgebildet wird (Abbildung 16). Die Strukturaufklärung ist der Tatsache zu verdanken, dass die Beweglichkeit sowohl des nichtcodierenden Strangs als auch des strangaufwärts gelegenen DNA-Doppelstrangs durch die Wechselwirkung mit TFIIF eingeschränkt ist. Diese Wechselwirkung des nichtcodierenden Strangs mit TFIIF stabilisiert möglicherweise eine transiente Blase in der Promotor-DNA und initiiert damit die Transkription.



**Abbildung 16.** Struktur eines Transkriptionskomplexes der Polymerase II mit der zentralen Untereinheit von TFIIF (laufende Untersuchungen von Guillermo Calero). Links: Struktur mit der Polymerase II und Nucleinsäuren; rechts: Struktur einschließlich der TFIIF-Untereinheit (gelb, bezeichnet als Tfg2). Blickrichtung und Farbcodierung wie in Abbildung 6.

### Der Transkriptionsinitiationskomplex mit polII

Mit den verfügbaren Strukturinformationen lässt sich ein vorläufiges Bild des Transkriptionsinitiationskomplexes mit der Polymerase II entwerfen (Abbildung 17). Die Strukturen von polII, TBP und TFIIB stammen aus Röntgenstrukturanalysen, wie sie oben beschrieben wurden. Die Strukturen von TFIIE, TFIIF und TFIIFH wurden mit Elektronenkrystallographie, Kryoelektronenmikroskopie und der Analyse einzelner Partikel gewonnen.



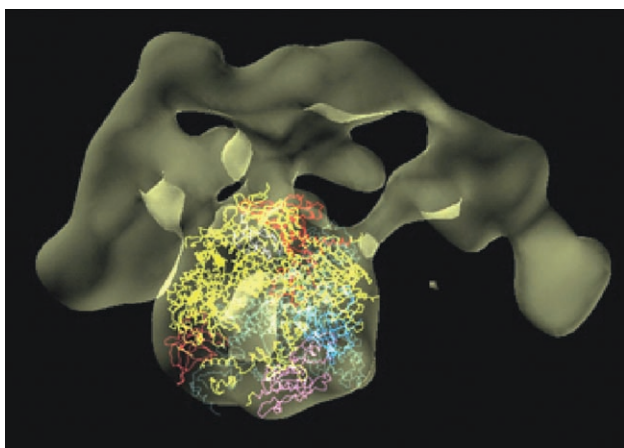
**Abbildung 17.** Modell eines Präinitiationskomplexes der Polymerase II. Die Strukturen oben links fügen sich zum unten rechts abgebildeten Komplex zusammen. Die Blickrichtung ist die gleiche wie in den Abbildungen 5 und 13. 4/7 markiert die polII-Untereinheiten Rbp4 und Rbp7, die in der Abbildung 5 fehlen.

Die Darstellung des vollständigen Komplexes gibt einigen Aufschluss über den Mechanismus der Transkriptionsinitiation. Jeder der allgemeinen Faktoren spielt eine simple, aber essenzielle Rolle beim Initiationsprozess: TBP faltet die Promotor-DNA um die Polymerase und um die C-terminale Domäne von TFIIB. Die N-terminale Domäne von TFIIB dirigiert die DNA an eine Stelle an der Oberfläche der Po-

lymerase, von der aus sie nur noch einem geraden Pfad zu folgen braucht. Da der Abstand zwischen der TATA-Box und der Startstelle für die Transkription in polII-Promotoren konserviert ist, liegt die Startstelle genau gegenüber dem aktiven Zentrum. TFIIE tritt in den Komplex ein und rekrutiert TFIIH, dessen ATPase/Helicase-Untereinheit eine negative superhelicale Spannung in der DNA induziert. Die thermische Entwindung der DNA erzeugt eine transiente Blase, die durch die Bindung von TFIIIF an den nichtcodierenden Strang stabilisiert wird. Die einsträngige Region der DNA kann sich nun durchbiegen und in das aktive Zentrum von polII eindringen. Initiation und RNA-Synthese schließen sich an, wobei der Vorgang zunächst durch den B-Finger stabilisiert wird. Die Synthese eines Transkripts von mehr als sechs Basenpaaren Länge löst die Verschiebung von TFIIIF aus, der polII-Komplex verlässt die Promotorregion, und die Transkription wird vervollständigt.

### Der Mediator und die Transkriptionsregulation

Offene Fragen betreffen die Struktur des Mediators und den Mechanismus der Transkriptionsregulation. Francisco Asturias ermittelte die Struktur eines polII-Mediator-Komplexes mit niedriger Auflösung durch Kryoelektronenmikroskopie und Partikelanalyse (Lit. [38] und Abbildung 18). Der



**Abbildung 18.** Kryoelektronenmikroskopische Struktur eines polII-Mediator-Komplexes. Die polII-Struktur wurde an den zentralen Elektrendichtebereich andockt; Blickrichtung und Farbcodierung sind analog wie in Abbildung 5.

zur polII gehörende Strukturteil wurde durch Docking der Polymerase identifiziert. Die restliche, zum Mediator gehörende Struktur hüllt polII fast sichelförmig ein, sodass eine Vielzahl von Kontaktpunkten entsteht, über die regulatorische Information übertragen werden könnte. Mit einer bis zur atomaren Auflösung verfeinerten Struktur wird es sicher einmal gelingen, den Regulationsmechanismus aufzudecken.

*Meine Aufgabe für diesen Vortrag war es, den Verlauf der Forschungen nachzuzeichnen, die letztlich mit dem Nobelpreis gewürdigt wurden. An den beschriebenen Studien war eine*

*Vielzahl von Studenten und Postdoktoranden beteiligt, deren Geschick und unermüdlicher Einsatz über mehr als ein Vierteljahrhundert einen wissenschaftlichen Traum Wirklichkeit werden ließen. Nur wenige konnte ich namentlich nennen ohne den Vortragsfluss zu unterbrechen – jedoch waren die Beiträge anderer nicht weniger wichtig. Ich bin all jenen zu tiefem Dank verpflichtet, die mich bei meinen Forschungen begleitet haben (Abbildung 19) – nicht nur bei der Untersuchung der polII-*

Chris Ackerson	Opher Gileadi	Barbara Maier-Davis
Francisco Asturias	Avi Gnatt	Lynne Mercer
Maia Azubel	Dave Goldfarb	Gavin Meredith
Brad Baer	Joachim Griesenbeck	Larry Myers
Avital Baraket-Samish	Claes Gustafsson	Kazuko Nishikura
Stefan Björklund	Lynn Henry	Hiroschi Nojima
Hinrich Boeger	John Heumann	Claudia Poglitsch
Tilman Borggrefe	Glenn Horn	Ariel Prunell
Rick Bram	Pablo Jadzinsky	Jeff Reidler
Andy Buchman	Grant Jensen	Hans Ribi
Dave Bushnell	Yi-Wei Jiang	Phil Robinson
Brad Cairns	Craig Kaplan	Alan Sachs
Guillermo Calero	Lin-Woo Kang	Mike Sayre
Wei-hau Chang	Don Katcoff	Jonny Sexton
Dan Chasman	Ray Kelleher	Dong Shin
Joan Conaway	Young-Joon Kim	Henrik Spahr
Patrick Cramer	Hirofumi Komori	Seth Strattan
Seth Darst	Guy Lorch Kornberg	Nori Sugimoto
Peter David	Liz Kubalek	Jesper Svejstrup
Ralph Davis	Yoshikazu Kurashima	Yuro Takagi
Al Edwards	Jan LaPointe	Herbert Tschochner
Andy Ehrensberger	Karl-Magnus Larsson	Ed Uzgiris
John Feaver	Kerstin Leuther	Philippe Verschambre
Martha Fedor	Alan Levine	Daguang Wang
Peter Flanagan	Yang Li	Dong Wang
Jianhua Fu	Yahli Lorch	Ken Westover
Brian Gibbons	Neal Lue	Mincheng Zhang

**Abbildung 19.**

*Struktur, sondern auch der Chromatin-Struktur, der Biochemie der Transkription und der EM-Methodik. Ich sollte hinzufügen, dass dies ein Vortrag ist und kein Übersichtsartikel, weshalb auch die Literaturauswahl sehr begrenzt ist. Die Aufklärung der polII-Struktur resultiert aus den Forschungen vieler Arbeitsgruppen, und ich danke allen, die daran beteiligt waren.*

Eingegangen am 25. April 2007

Online veröffentlicht am 2. August 2007

Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] R. D. Kornberg, *Science* **1974**, *184*, 868–871.
- [2] Y. Lorch, J. W. LaPointe, R. D. Kornberg, *Cell* **1987**, *49*, 203–210.
- [3] M. Han, M. Grunstein, *Cell* **1988**, *55*, 1137–1145.
- [4] H. Boeger, J. Griesenbeck, J. S. Strattan, R. D. Kornberg, *Mol. Cell* **2003**, *11*, 1587–1598.
- [5] T. Matsui, J. Segall, P. A. Weil, R. G. Roeder, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 11992–11996.
- [6] J. W. Conaway, D. Reines, R. C. Conaway, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 7552–7558.
- [7] N. F. Lue, R. D. Kornberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 8839–8843.
- [8] R. Conaway, J. Conaway, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **1997**, *56*, 327–346.
- [9] R. J. Kelleher, P. M. Flanagan, R. D. Kornberg, *Cell* **1990**, *61*, 1209–1215.

- [10] P. M. Flanagan, R. J. Kelleher, M. H. Sayre, H. Tschochner, R. D. Kornberg, *Nature* **1991**, 350, 436–438.
- [11] Y.-J. Kim, S. Björklund, Y. Li, M. H. Sayre, R. D. Kornberg, *Cell* **1994**, 77, 599–608.
- [12] R. D. Kornberg, *Trends Biochem. Sci.* **2005**, 30, 235–239.
- [13] S. Malik, R. G. Roeder, *Trends Biochem. Sci.* **2005**, 30, 256–263.
- [14] Z. Moqtaderi, Y. Bai, D. Poon, P. A. Weil, K. Struhl, *Nature* **1996**, 383, 188–191.
- [15] S. S. Walker, J. C. Reese, L. M. Apone, M. R. Green, *Nature* **1996**, 383, 185–188.
- [16] W.-C. Shen, M. R. Green, *Cell* **1997**, 90, 615–624.
- [17] R. C. Conaway, S. Sato, C. Tomomori-Sato, T. Yao, J. W. Conaway, *Trends Biochem. Sci.* **2005**, 30, 250–255.
- [18] H. M. Bourbon et al., *Mol. Cell* **2004**, 14, 553–557.
- [19] C. M. Thompson, R. A. Young, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 4587–4590.
- [20] J. Takagi, R. D. Kornberg, *J. Biol. Chem.* **2005**, 281, 80–89.
- [21] R. D. Kornberg, H. M. McConnell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1971**, 68, 2564–2568.
- [22] E. E. Uzgiris, R. D. Kornberg, *Nature* **1983**, 301, 125–129.
- [23] A. M. Edwards, S. A. Darst, W. J. Feaver, N. E. Thompson, R. R. Burgess, R. D. Kornberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 2122–2126.
- [24] S. A. Darst, E. W. Kubalek, A. M. Edwards, R. D. Kornberg, *J. Mol. Biol.* **1991**, 221, 347–357.
- [25] J. Fu, A. L. Gnatt, D. A. Bushnell, G. J. Jensen, N. E. Thompson, R. R. Burgess, P. R. David, R. D. Kornberg, *Cell* **1999**, 98, 799–810.
- [26] P. Cramer, D. A. Bushnell, J. Fu, A. L. Gnatt, B. Maier-Davis, N. E. Thompson, R. R. Burgess, A. M. Edwards, P. R. David, R. D. Kornberg, *Science* **2000**, 288, 640–649.
- [27] P. Cramer, D. A. Bushnell, R. D. Kornberg, *Science* **2001**, 292, 1863–1876.
- [28] A. Gnatt, J. Fu, R. D. Kornberg, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 30799–30805.
- [29] A. L. Gnatt, P. Cramer, J. Fu, D. A. Bushnell, R. D. Kornberg, *Science* **2001**, 292, 1876–1882.
- [30] K. D. Westover, D. A. Bushnell, R. D. Kornberg, *Cell* **2004**, 119, 481–489.
- [31] D. Wang, D. A. Bushnell, K. D. Westover, C. D. Kaplan, R. D. Kornberg, *Cell* **2006**, 127, 941–954.
- [32] G. Zhang, E. A. Campbell, L. Minakhin, C. Richter, K. Severinov, S. A. Darst, *Cell* **1999**, 98, 811–824.
- [33] K. D. Westover, D. A. Bushnell, R. D. Kornberg, *Science* **2004**, 303, 1014–1016.
- [34] D. A. Bushnell, K. D. Westover, R. E. Davis, R. D. Kornberg, *Science* **2004**, 303, 983–988.
- [35] K. S. Murakami, S. Masuda, E. A. Campbell, O. Muzzin, S. A. Darst, *Science* **2002**, 296, 1285–1290.
- [36] K. S. Murakami, S. Masuda, S. A. Darst, *Science* **2002**, 296, 1280–1284.
- [37] D. B. Nikolov, H. Chen, E. D. Halay, A. A. Usheva, K. Hisatake, D. Kun Lee, R. G. Roeder, S. K. Burley, *Nature* **1995**, 377, 119–128.
- [38] J. A. Davis, Y. Takagi, R. D. Kornberg, F. J. Asturias, *Mol. Cell* **2002**, 10, 409–415.