

**Tex aus *Bordetella pertussis* definiert eine neue Familie von  
Nukleinsäure-Bindeproteinen**

Dissertation zur Erlangung  
des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der  
Universität Würzburg

vorgelegt von

**Jochen König**

aus Attendorn

Würzburg 2001

Die vorliegende Arbeit wurde von mir selbständig, unter  
Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt  
und war nie Bestandteil eines anderen Prüfungsverfahrens.

Jochen König

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: .....

1. Gutachter: Prof. Dr. Roy Gross

2. Gutachter: PD Dr. Joachim Morschhäuser

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

**“This must be Thursday! –  
I never could get the hang of Thursdays.”**

Arthur Dent

in: “The hitch-hikers guide to the galaxy”

von Douglas Adams

## **Danksagung:**

Mit allen Höhen und Tiefen waren die Jahre am Lehrstuhl für Mikrobiologie eine sehr gute und vielfältig lehrreiche Zeit für mich. Ich möchte mich daher bei all denen bedanken, die für mich diese Zeit, nicht nur am Lehrstuhl, geprägt haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Roy Gross für die Betreuung und Finanzierung meiner Arbeit  
und meinen Eltern.

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
Abstract.....	2
Einleitung.....	3
Tex aus <i>Bordetella pertussis</i> definiert eine neue Familie von prokaryontischen Proteinen.....	3
Der Mannitol-Repressor von <i>E. coli</i> .....	6
Das ribosomale Protein S1 und andere Proteine mit der S1-Domäne.....	7
Ergebnisse.....	12
Verbreitung von Tex in anderen Bakterien.....	12
Deletion von <i>tex</i> in <i>E. coli</i> .....	15
Phänotypanalyse der <i>tex</i> -Mutanten in <i>E. coli</i> .....	17
Transkription von <i>tex</i> in <i>E. coli</i> .....	20
Reinigung von Tex aus <i>E. coli</i> .....	22
Die Bindung von Tex an Nukleinsäuren.....	25
Gelretardationsexperimente.....	25
Festphasen-Bindeassays.....	26
Anreicherung und Klonierung von Bindesequenzen.....	31
Diskussion.....	33
Verbreitung von Tex in anderen Bakterien.....	33
Deletion von <i>tex</i> in <i>E. coli</i> .....	34
Transkription von <i>tex</i> in <i>E. coli</i> .....	35
Bindung von Tex aus <i>E. coli</i> an Nukleinsäuren.....	36
Anreicherung und Klonierung von Bindesequenzen.....	39
Material und Methoden.....	41
Geräte.....	41
Chemikalien, Enzyme und Fertigsätze ("Kits").....	41
Bakterienstämme.....	41
Vektoren und Plasmide.....	42
Oligonukleotide.....	43
Kulturmedien.....	43
Arbeiten mit DNA.....	44
Agarosegelelektrophorese.....	44
Präparation chromosomaler DNA aus gram <sup>-</sup> Bakterien.....	46
Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> im kleinen Maßstab (Miniprep).....	47
Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> im mittlerem Maßstab (Midiprep).....	48
Präparation von $\lambda$ Phagen-DNA aus flüssigen Lysaten.....	48
Präparation von DNA aus Agarosegelen.....	48

Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	48
Glätten und Phosphorylieren von PCR-Produkten .....	49
Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	50
Alkalische Phosphatase-Behandlung.....	50
Ligation .....	50
Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> .....	51
Konjugation von Plasmiden in <i>Bordetella</i> -Stämme .....	51
Hybridisierung von DNA-Fragmenten mit markierten DNA-Sonden (Southern Blot) .....	51
Sequenzierung von doppelsträngiger Plasmid DNA (T7Sequencing™ Kit, Pharmacia).....	52
Allelaustauschmutagenese .....	53
Arbeiten mit RNA .....	54
Ein-Schritt-RNA-Präparation aus Bakterien abgewandelt nach Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987) .....	54
Drei-Detergenzien-Methode zur Präparation von RNA aus gram <sup>-</sup> Bakterien (Syn et al., 1999).....	55
Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese .....	56
Primer Extension.....	57
Arbeiten mit Proteinen.....	58
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	58
Zweidimensionale (2 D-) Gelelektrophorese .....	59
Silber-Färbung von SDS-PAA-Gelen.....	60
Überexpression und Reinigung mit dem QIAexpressionist-System (Qiagen) .....	61
Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	63
Western Blot .....	63
Gelretardationsexperimente .....	64
Festphasen Bindeassays.....	66
Literatur .....	68
Lebenslauf.....	76
Publikationsliste .....	77
Abkürzungsverzeichnis .....	78
Anhang.....	81
DNA Sequenz des <i>tex</i> -Locus in <i>E. coli</i> K12 und Lage der verwendeten Oligonukleotide .....	81
Daten der Bindung von Nukleinsäuren an verschiedene cTex Derivate .....	85

## Zusammenfassung

Das Tex Protein aus *Bordetella pertussis* definiert eine neue Familie hoch konservierter Proteine in Eubakterien. Ursprünglich wurde das *tex* Gen aufgrund seines Einflusses auf die Toxinexpression in bestimmten regulatorischen Mutanten von *B. pertussis* gefunden (Fuchs et al. (1996), *J Bacteriol* **178**, 4445-52). Wie hier gezeigt wird, sind Leserahmen für entsprechende Proteine bei den Eubakterien ubiquitär und mehrheitlich zu über 69 % konserviert. Eine Ausnahme bilden einige wenige Taxa mit bekanntermaßen reduzierten Genomen, bei denen das Gen wahrscheinlich verloren gegangen ist, wie zum Beispiel verschiedene *Mycoplasma* spp. oder der obligate Blattlaus- (Aphiden-) Symbiont *Buchnera aphidicola*. In Eukaryonten und Archaeen konnte ein zu *tex* homologes Gen bisher nicht gefunden werden. Die Funktion von Tex in der Bakterienzelle ist unklar. Während das Gen in *B. pertussis* essenziell ist und auch nicht überexprimiert werden kann, sind Deletionsmutanten in *Neisseria meningitidis* und *Escherichia coli* phänotypisch nicht von den entsprechenden Wildtypen unterscheidbar. Ausgiebige Wachstumsstudien mit einer *E. coli tex*-Mutante unter verschiedenen Wachstums- und Stressbedingungen ergaben ebenfalls keinen Hinweis auf eine Bedeutung von Tex, die die außerordentliche Konservierung des Proteins erklären könnte.

Das Protein zeigt in seinem N-Terminus ausgeprägte Ähnlichkeit mit dem Mannitol-Repressor (MtlR) von *Escherichia coli* und besitzt eine C-terminale S1-Domäne. Da die meisten der Proteine mit S1-Domänen als RNA-bindende Proteine gelten, wurde die Fähigkeit von Tex untersucht, mit Nukleinsäuren zu interagieren. In Festphasen-Bindeassays mit an Magnetkügelchen immobilisiertem Tex Protein aus *E. coli* konnte eine spezifische Bindung an RNA-Gesamtpräparationen gezeigt werden. DNA wurde hingegen nicht gebunden. Durch Verkürzung des N-Terminus geht die präferenzielle Bindung an RNA jedoch verloren und die Bindung von DNA erfolgt mit der gleichen Effizienz wie die von RNA. Festphasen-Bindeassays wurden weiterhin dazu benutzt, mögliche spezifische Interaktionspartner von Tex aus RNA-Gesamtpräparationen zu finden. Tatsächlich konnten über diesen Ansatz die regulatorische RNA CsrB und die ribosomale 16S RNA als spezifische Liganden isoliert werden. Über die biologische Relevanz dieser Interaktion kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt allerdings noch keine Aussage gemacht werden.

## Abstract

The *Bordetella pertussis* Tex protein defines a new family of highly conserved eubacterial proteins. The *tex* gene was originally found due to its negative influence on toxin expression when over-expressed slightly in certain regulatory mutants of *B. pertussis* (Fuchs et al. (1996), *J Bacteriol* **178**, 4445-52). As shown in this work apparently homologous reading frames are ubiquitous within the *Eubacteria*. The majority of these mostly putative proteins are more than 69 % conserved. Only some of the genomes of some obligate intracellular pathogens, e. g. various *Mycoplasma* spp., or the aphid symbiont *Buchnera aphidicola* known for their reduced gene numbers were found to lack a *tex* gene and probably have lost it during phylogeny. The actual function of Tex within the bacterial cell is as yet mysterious as the gene can neither be deleted nor can it be highly over-expressed in *B. pertussis*. However, deletion mutants in *Neisseria gonorrhoeae* and *Escherichia coli* do not show any phenotype different to the respective wild type. Extensive growth studies on an *E. coli tex*-mutant did not reveal any clue to the reason for the extraordinary conservation of the protein.

The N-terminus of Tex shows extensive similarity to the mannitol repressor (MtlR) of *E. coli* whereas the C-terminus contains an S1 domain. Because most S1 domain containing proteins have been shown to bind RNA, the capacity of Tex to interact with nucleic acids was investigated. In solid phase binding assays with purified Tex protein from *E. coli* immobilized to magnetic beads the protein showed specific binding of RNA but not DNA. N-terminal deletions of different length abolished this preference for RNA and both types of nucleic acid bound equally well. Again a solid phase binding assay was used to enrich for specific ligands of Tex from total cellular RNA preparations. This approach identified the regulatory CsrB RNA and ribosomal 16S RNA as preferential binding targets. However, it is not yet possible to comment on the biological relevance of these findings.

## Einleitung

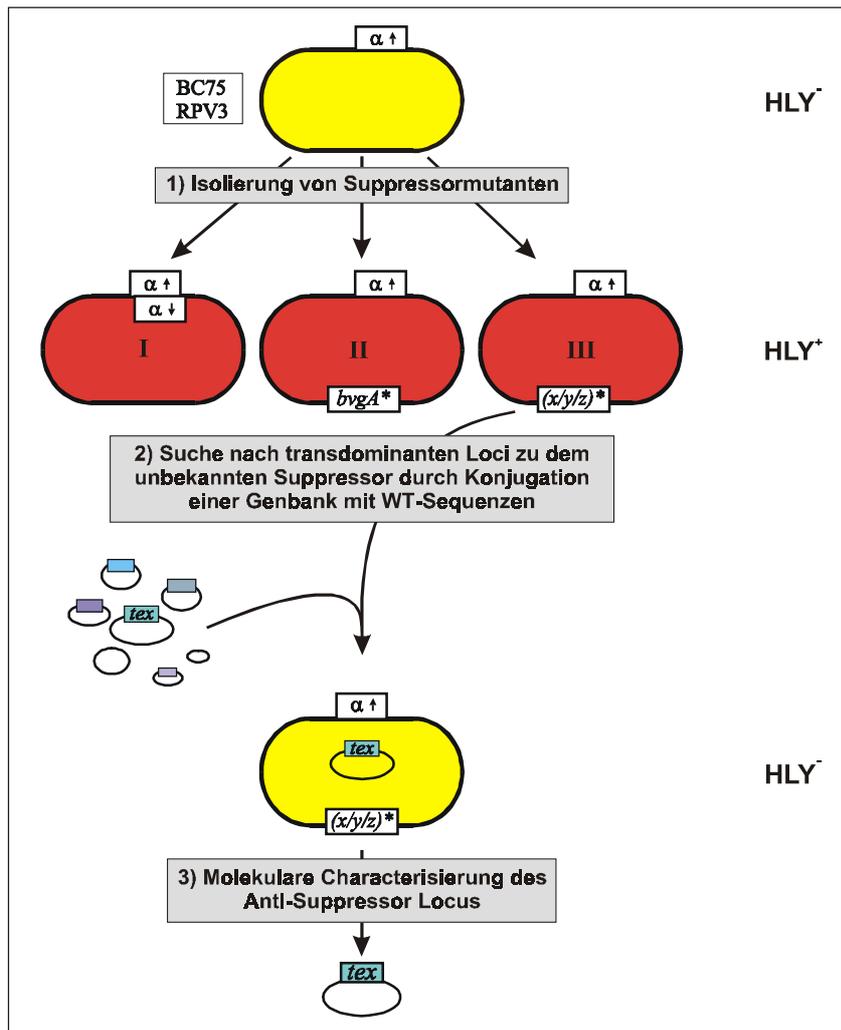
### Tex aus *Bordetella pertussis* definiert eine neue Familie von prokaryontischen Proteinen

Der Erreger des Keuchhustens *Bordetella pertussis* exprimiert unter permissiven Bedingungen eine Reihe verschiedener Virulenzfaktoren mit unterschiedlicher Bedeutung für die Etablierung und die klinische Ausprägung einer Infektion (Fuchs, 1996; Parton, 1999). Diese Faktoren umfassen Oberflächenproteine, deren Bedeutung größtenteils in der Adhärenz an Wirtsstrukturen liegt, aber auch einige sekretierte Toxine, die einerseits zum Schutz des Bakteriums vor dem Immunsystem und andererseits zur Schädigung des Wirtes beitragen. Die Infektion mit *B. pertussis* erfolgt vermutlich ausschließlich durch Tröpfcheninfektion von Mensch zu Mensch (Hewlett, 1997). Der Keim gilt als obligat humanpathogen und konnte, anders als nahe verwandte Arten des Genus, bisher weder aus Tieren noch aus der Umwelt isoliert werden (Parton, 1999).

Nach dem geltenden Modell kann das Infektionsgeschehen in eine frühe und eine späte Phase unterteilt werden. Die frühe Phase ist durch die Expression der Adhäsine Filamentöses Hämagglutinin (FHA), Pertactin (PRN) und verschiedene Fimbrien gekennzeichnet. In der späten Phase kommen zu den Adhäsinen noch verschiedene Toxine, wie das für *B. pertussis* kennzeichnende Pertussistoxin (PTX) und das Adenylatzyclase-Hämolyisin (CyaA), hinzu (Hewlett, 1999). Die Regulation aller genannten Virulenzfaktoren erfolgt durch das BvgAS Zwei-Komponenten-System (Uhl & Miller, 1995). Die Signale, die *in vivo* für die Autohosphorylierung der Sensor kinase BvgS und die anschließende Weitergabe des Phosphatrestes an den Response-regulator BvgA auslösen (Perraud *et al.*, 1999; Uhl & Miller, 1994), sind nicht bekannt. Bei Bakterien in Kultur kann die Aktivierung des Bvg Systems jedoch durch geringe Wachstumstemperaturen (25 °C) oder ein Wachstumsmedium mit MgSO<sub>4</sub> oder Nikotinsäure reprimiert werden (Melton & Weiss, 1989). Die Unterteilung in frühe und späte Virulenzfaktoren spiegelt sich in den Promotoren der entsprechenden Gene wieder. Die Bindestellen für phosphoryliertes BvgA (BvgA~P) liegen bei den späten Genen weiter stromaufwärts und sind deutlich weniger affin für den Aktivator als die der frühen Gene (Boucher *et al.*, 1997; Boucher & Stibitz, 1995; Karimova *et al.*, 1996; Karimova & Ullmann, 1997).

Die Bvg-vermittelte Regulation der Virulenzgene in Bordetellen, die auch als Phänotypische Modulation bezeichnet wird, unterliegt offenbar fein eingestellten Gleichgewichten. Mutationen, die zu einer leichten Überexpression der  $\alpha$ -Untereinheit der RNA-Polymerase (RpoA) führen, bewirken unter virulenzaktivierenden Bedingungen die differenzielle Expression der Adhäsine und das Ausbleiben der Toxin-Expression (Carbonetti *et al.*, 1994; Fuchs, 1996). Weitergehende Untersuchungen weisen auf eine direkte Interaktion von BvgA~P und dem C-Terminus der RNA-Polymerase an den Virulenzgenpromotoren hin (Carbonetti *et al.*, 2000; Stibitz, 1998), wie sie auch schon für andere Aktivatoren beschrieben wurde (Ayers *et al.*, 1994; Gussin *et al.*, 1992; Lohrke *et al.*, 1999; Slauch *et al.*, 1991; Thomas & Glass, 1991).

Abb. 1: Klonierung von *tex* aus *B. pertussis*. Erläuterungen im Text.



nach Fuchs et al., 1996

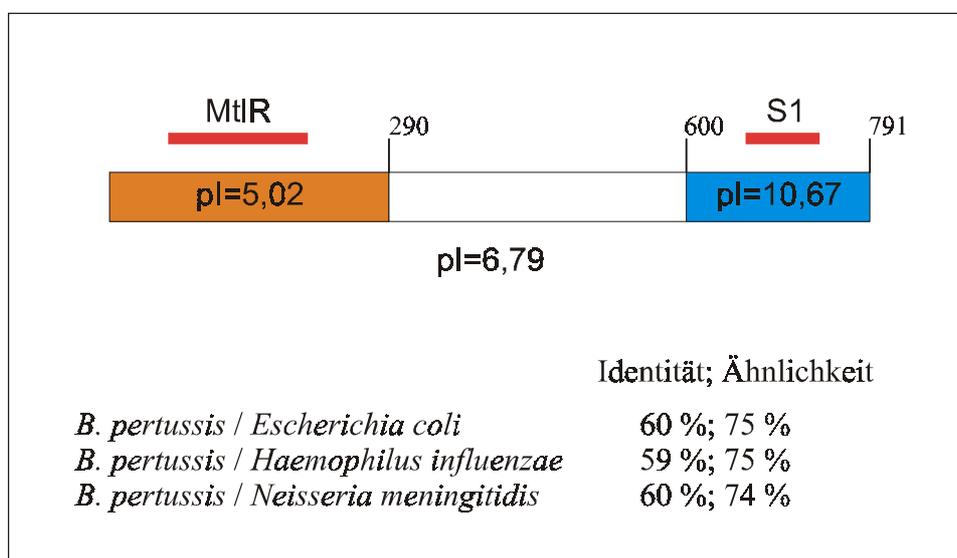
Thilo M. Fuchs hat im Rahmen seiner Doktorarbeit ein System entwickelt, mit dem weitere an der differentiellen Regulation in *B. pertussis* beteiligte Faktoren aufgefunden werden können (Fuchs, 1996; Fuchs *et al.*, 1996; Abb. 1). Dazu wurden die von Carbonetti und Koautoren (1994) beschriebenen RpoA-Überexpressions-Mutanten BC75 und RPV3 ( $PTX^-$ ,  $CyaA^-$ ) einer chemischen Mutagenese unterzogen und phänotypische Revertanten in Bezug auf die Toxinexpression isoliert (Schritt 1). Die Mutationen führten in den Revertanten anscheinend zur Wiederherstellung des regulatorischen Gleichgewichts zwischen den an der Toxinexpression beteiligten Faktoren. Revertanten, deren kompensatorische Mutationen anscheinend in *bvgA* oder *rpoA* liegen, wurden durch Komplementation mit den entsprechenden WT-Loci identifiziert und von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen. In Suppressor-Stämme, deren kompensatorischen Mutation nicht im *rpoA* oder *bvg* Locus lagen, wurde dann eine Cosmid-Genbank mit chromosomaler DNA des WT Stammes *B. pertussis* Tohama I (TI) konjugiert (Schritt 2). Die Cosmide der Klone, die erneut zum anfänglichen Toxin-negativen Phänotyp zurückgekehrt waren, wurden anschließend einer Tn5-Mutagenese unterzogen. Abschließend wurde die Sequenz jener, auf den Cosmiden gelegenen Loci, die nach der Insertion des Transposons, nicht mehr als Anti-Suppressoren wirkten, ermittelt (Schritt 3). Ziel war es, die

Mutationen aus Schritt 1 entweder wie beschrieben mit ihren WT-Allelen zu komplementieren und so zu charakterisieren oder Anti-Suppressoren zu identifizieren, die negativ mit dem Suppressorphänotyp nach der chemischen Mutagenese interferieren. Solche Anti-Suppressoren könnten z. B. an der Kontrolle der  $\alpha$ -Aktivität beteiligt sein (Fuchs, 1996).

Auf diese Weise konnte der Leserahmen eines bis dahin unbekanntes Gens isoliert werden. Wegen des negativen Einfluss des Locus auf die Toxinexpression in den Suppressor-Stämmen wurde das Gen als *tex* bezeichnet.

Die konzeptionelle Translation von *tex* liefert ein 791 Aminosäuren langes Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 85 kDa, für das eine ausgeprägte Ähnlichkeit zu putativen Proteinen aus *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* und *Neisseria meningitidis* festgestellt wurde (Fuchs et al., 1996). Im direkten Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen zwischen *B. pertussis* und den anderen Arten waren rd. 60 % der Positionen identisch und weitere 15 % konserviert ausgetauscht. Ähnliche Leserahmen finden sich nach dem heutigen Stand in Bakterien aus fast allen phylogenetischen Gruppen, für die bereits Genomsequenzdaten verfügbar sind (s. Ergebnisse). Allerdings wurde noch keines der entsprechenden Gene oder Proteine experimentell umfassend charakterisiert.

**Abb. 2:** Schematische Darstellung von *Tex* aus *B. pertussis*. Die orange und blau abgegrenzten Bereich entsprechen den beiden endständigen putativen Domänen mit Ähnlichkeit zum Mannitol-Repressor von *E. coli* (MtlR) und der S1-Domäne (S1). Die Zahlen an den Domänengrenzen bezeichnen die entsprechende Aminosäureposition. Die roten Balken geben die entsprechenden homologen Bereiche an. In den Domänen und unter dem Gesamtprotein sind die entsprechenden isoelektrischen Punkte (pI) angegeben.



nach Fuchs et al., 1996

Aufgrund des unterschiedlichen Grades der Konservierung verschiedener Abschnitte der Aminosäuresequenzen der *Tex* Proteine wurden potenzielle Domänen abgegrenzt (vgl. Abb. 2). Die postulierten Domänen unterscheiden sich deutlich in ihrem isoelektrischen Punkt (pI). Während der Aminoterminus (Positionen 1-290) einen Überschuss an sauren Aminosäuren (neg. Ladung bei pH 7) trägt (pI=5,02) ist der Carboxyterminus (Positionen 600-791) stark basisch (pI=10,67). Für das gesamte

Protein errechnet sich ein pI von 6,79. Das heißt, bei etwa neutralem pH erscheint Tex ohne Nettoladung. BLAST-Analysen (Altschul *et al.*, 1997) der Aminosäuresequenzen der Domänen ergaben für den Aminoterminus eine Ähnlichkeit zum Mannitol-Repressor MtlR von *E. coli* (Figge *et al.*, 1994) und für den Carboxyterminus eine ausgeprägte Ähnlichkeit zur S1-Domäne RNA-bindender Proteine (Bycroft *et al.*, 1997; Subramanian, 1983) gefunden.

Über den genauen Transkriptionsstart und den Promoter von *tex* in *B. pertussis* und die Expression des Proteins unter verschiedenen Bedingungen ist nichts bekannt. Da die beiden oberhalb und unterhalb von *tex* gelegenen Leseramen auf dem Gegenstrang liegen und somit in entgegengesetzter Richtung abgelesen werden, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass *tex* als monocistronische mRNA transkribiert wird.

Wie gezeigt wurde, ist *tex* für *B. pertussis* essenziell und kann vom Chromosom nicht ohne die Bereitstellung einer intakten Kopie in *trans* deletiert werden. Die Überexpression des Gens von einem multi-copy-Plasmid aus ist in *B. pertussis* ebenfalls nicht möglich. In *B. pertussis* scheint *tex* also eine wichtige und fein regulierte Funktion auszuüben. Die Rolle von *tex* in Hinsicht auf die Virulenzgenexpression in *B. pertussis* ergibt bislang kein kohärentes Bild: Wurde *tex* auf einem Plasmid mit nur wenigen Kopien in WT-Stämme (*B. p.* TI, W28) eingebracht, waren keine Veränderungen des Phänotyps zu beobachten. Das Ausbleiben der Toxinexpression konnte nur in den Plasmid-komplementierten Suppressormutanten der *rpoA*-Überexpressionsstämme (vgl. Abb. 1, Schritt 2) und im Stamm TI $\Delta$ tox festgestellt werden. TI $\Delta$ tox unterscheidet sich von seinem Mutterstamm (TI) lediglich durch die Inaktivierung des *ptx*-Operons (Pizza *et al.*, 1989). Der Grund für die unterschiedliche Reaktion der beiden Stämme auf den *tex*-Locus in *trans* ist unklar.

Der Einfluss von *tex* auf die Regulation der Virulenzgene scheint aber eher indirekt zu sein und könnte auf übergeordneten Phänomenen beruhen (Fuchs, 1996; Fuchs *et al.*, 1996).

## Der Mannitol-Repressor von *E. coli*

Die Nukleotidsequenz des Mannitol-Repressor *mtlR* von *E. coli* und einige Daten die seine Wirkung auf das *mtl* Operon zeigen wurden 1993 von Figge und Koautoren veröffentlicht. MtlR wird in dieser Arbeit als ein lösliches Protein mit einem errechneten Gewicht von ca. 22 kDa und einem isoelektrischen Punkt (pI) von 4,1, ähnlich dem N-Terminus von Tex, beschrieben. Die Deletion des Gens verursacht die konstitutive Expression der oberhalb von *mtlR* im selben Operon gelegenen Gene *mtlA* und *mtlD*. Eine BLAST Suche mit der Aminosäuresequenz von MtlR gegen die SwissProt Datenbank (Stand Okt. 2000) findet ähnliche Leserahmen in *Klebsiella pneumoniae* und *Vibrio cholerae*. In beiden Fällen sind die Gene aber lediglich als ähnlich zu der *E. coli* Sequenz beschrieben und nicht weiter untersucht. MtlR enthält keine bekannten Nukleinsäure-Bindedomänen. Es wurde jedoch gezeigt, dass die MtlR-vermittelte Repression des *mtl* Operons durch Zugabe zusätzlicher Kopien der vermuteten regulatorischen DNA Region austitriert werden kann. Die Bindung des MtlR Proteins an die Operatorsequenzen wurde allerdings nicht gezeigt.

## Das ribosomale Protein S1 und andere Proteine mit der S1-Domäne

Das ribosomale Protein S1, kodiert von *rpsA*, ist mit einem Molekulargewicht von 61 kDa das größte Protein der kleinen (30S) Untereinheit des bakteriellen Ribosoms. – Ribosomale Proteine werden entsprechend der Untereinheit zu der sie gehören (L=large, S=small) und der Reihenfolge ihrer Mobilität im 2D-Gel benannt (Draper & Reynaldo, 1999). – Außerdem ist S1 als Wirtsprotein ein essenzieller Bestandteil der RNA-abhängigen RNA Polymerase des Phagen Q $\beta$  (Subramanian, 1983) und formt einen Komplex mit dem Rekombinationsprotein  $\beta$  des Phagen  $\lambda$  (Venkatesh & Radding, 1993). In beiden Fällen scheint S1, zumindest teilweise, die Nukleinsäurebindung der Proteinkomplexe zu vermitteln.

S1 besteht aus einer linearen Aneinanderreihung (tandem repeats) von insgesamt sechs gleichen Motiven von je ca. 70 Aminosäuren, abgegrenzt durch 10 –15 Aminosäuren lange Zwischensequenzen (Linker). Vier der sogenannten S1-Domänen (S1-D) sind hoch konserviert, die zwei N-terminalen Kopien wurden allerdings erst nach Sequenzprofilanalyse erkannt (Gribskov, 1992). Funktionell ist S1 zweigeteilt in einen Protein- und einen RNA-bindenden Bereich. Die beiden N-terminalen S1-Domänen vermitteln die Bindung von S1 an das Ribosom (Boni *et al.*, 1982; Giorganis & Subramanian, 1980). Entsprechend ihrer grundlegend unterschiedlichen Liganden im Vergleich zu den S1-D im C-Terminus (Protein vs. Nukleinsäuren) haben sie sich fast zur Unkenntlichkeit von der Sequenz der anderen S1-Domänen wegentwickelt (Bycroft *et al.*, 1997; Gribskov, 1992). Die vier C-terminalen Wiederholungen der S1-D (R1-R4) bilden den RNA-bindenden Teil des Proteins (Subramanian, 1983). In verschiedenen Studien wurden zwei unterschiedliche RNA-Bindestellen in diesem Bereich mit gut unterscheidbaren Affinitäten für verschiedene RNA-Homopolymere beschrieben und teilweise auch einzelnen S1-D zugeschrieben (Hahn *et al.*, 1987; Kalapos *et al.*, 1997; Schnier *et al.*, 1986; Suryanarayana & Subramanian, 1984). Trotz der Anpassung der N-terminalen S1-D an die Proteinbindung (s. o.), ist die Bindung von S1 an freie Ribosomen nur schwach und es kommt häufig zum Austausch von S1-Proteinen zwischen individuellen freien Ribosomen (Subramanian & van Duin, 1977). Bei mRNA-gebundenen Ribosomen findet ein solcher Austausch jedoch nicht statt (Sørensen *et al.*, 1998). Im ternären Komplex von Ribosom, mRNA und neu synthetisiertem Polypeptid scheinen demnach zusätzliche Kräfte den Gesamtkomplex zu stabilisieren. Wegen der schwachen Bindung an das Ribosom und weil das Protein bei der Präparation von Ribosomen oft nicht in stöchiometrischen Mengen isoliert wird (Subramanian & van Duin, 1977), war lange Zeit strittig, ob es sich bei S1 tatsächlich um ein ribosomales Protein oder einen akzessorischen Faktor handelt (Ramakrishnan & White, 1998). Hinzu kommt, dass der autonome Zusammenbau des Ribosoms auch ohne S1 erfolgen kann (Held *et al.*, 1973).

Die genaue Rolle von S1 im Translationsgeschehen ist noch nicht geklärt. Ungewöhnlich im Vergleich mit anderen ribosomalen Proteinen ist vor allem, dass S1 bei einer ganzen Gruppe von Bakterien, den gram<sup>+</sup> mit geringen G/C-Gehalt (*Bacillus/Clostridium* Gruppe), nicht vorkommt. Gleichzeitig ist in dieser Gruppe eine deutlichere Ausprägung des Shine-Dalgarno (SD) Konsensus innerhalb der Ribosomenbindestellen (RBS) zu beobachten (Roberts & Rabinowitz, 1989; Shine & Dalgarno, 1974). Übereinstimmend wurde S1 eine Bedeutung bei der Translationsinitiation an mRNAs mit einer schwacher oder schlecht zugänglichen SD Sequenz zugewiesen (de Smit &

van Duin, 1994). *In vitro* sind *E. coli* Ribosomen ohne S1 in der Lage mRNAs mit starken SD-Sequenzen oder unstrukturierten 5' Enden zu translatieren (Farwell *et al.*, 1992; Tedin *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu ist *in vivo* S1 essentiell für die Translationsinitiation und -elongation vermutlich aller natürlichen mRNAs in *E. coli* (Sørensen *et al.*, 1998).

Vermutlich ist S1 an der Entwindung strukturierter Translationsinitiationsregionen (TIR) beteiligt (Subramanian, 1983). S1 vermittelt so zusätzlich und ergänzend zu der Interaktion zwischen SD Sequenz und 16S RNA die Bindung des Ribosoms an die RBS der mRNA (de Smit & van Duin, 1994). Allgemein wird für S1 *in vivo* eine eher unspezifische Bindung an einzelsträngige RNA mit Präferenz für bestimmte U-reiche Abschnitte, wie sie in der Nähe oberhalb vieler effizienter Translationsstarts gefunden werden, angenommen (Boni *et al.*, 1991; Zhang & Deutscher, 1992). Bei mRNAs ohne 5'-UTR wurde S1 eine Rolle bei der Erkennung des richtigen Start-Codons trotz fehlender SD-16S RNA Interaktion zugewiesen (Moll *et al.*, 1998). *In vitro* trägt S1 außerdem zur Auswahl der korrekten Aminoacyl-tRNAs während der Translationselongation bei (Potapov & Subramanian, 1992).

Durch *in vitro* Selektion und Anreicherung von Bindestellen ausgehend von Zufallssequenzen (SELEX, „systematic evolution of ligands by exponential enrichment“) konnten spezifische, hoch affine RNA Liganden zu S1 und kompletten Ribosomen generiert werden. Die gewonnenen Sequenzen ähneln bestimmten natürlichen TIRs, darunter auch der RBS von *rpsA* selbst (Ringquist *et al.*, 1995). Die Selektion ergab die gleichen Liganden für S1 und für ganze Ribosomen. Interessanterweise wurden bei Einsatz von Ribosomen ohne S1 Liganden, die das SD Motiv enthielten, angereichert, nicht aber in Ansätzen mit ganzen Ribosomen oder S1 allein.

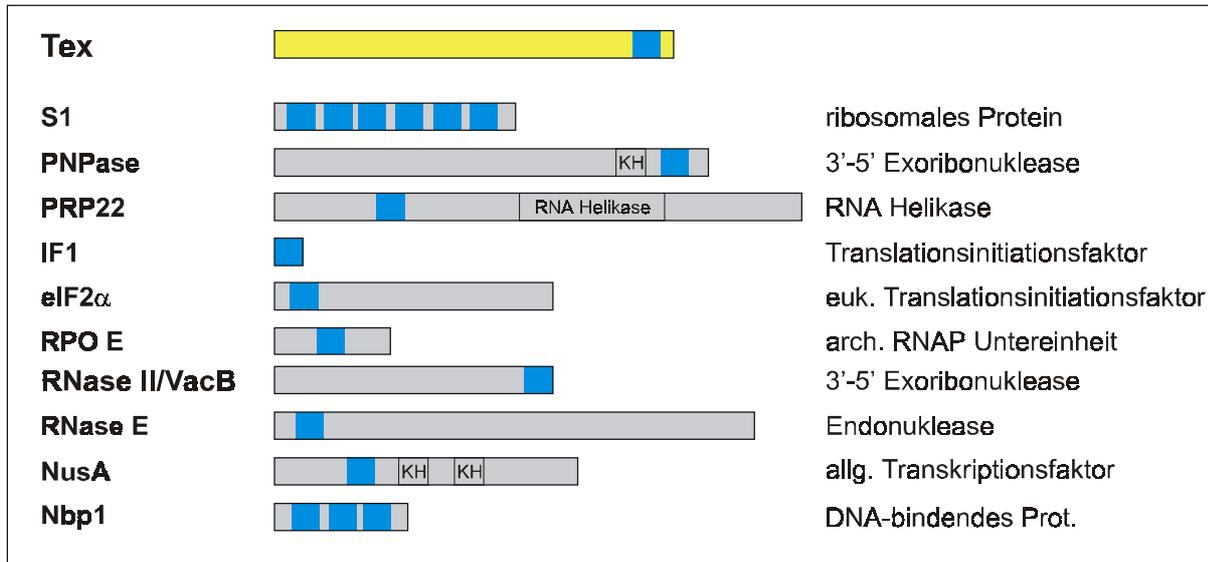
Eine andere Interpretation der Daten von Ringquist und Koautoren (1995) betont die Annäherung der spezifischen Liganden an das „Downstream box“ (DB) Motiv, komplementär zu den Basen 1481-1467 (anti-DB) der *E. coli* 16S rRNA (Etchegaray *et al.*, 1998). Anders als der Shine-Dalgarno Konsensus findet sich das DB Motiv in den Liganden aus allen Ansätzen der Studie. Die Relevanz und Mechanistik des DB-Motivs ist kontrovers (Bläsi *et al.*, 1999; Etchegaray & Inouye, 1999b). Wegen der ausgeprägten Komplementarität zwischen DB und dem 3' Ende der 16S rRNA wird von einigen Arbeitsgruppen eine Bindung zwischen DB und anti-DB bei der Translationsinitiation postuliert (Etchegaray & Inouye, 1999a; Etchegaray & Inouye, 1999c; Sprengart *et al.*, 1990; Sprengart *et al.*, 1996). Allerdings gibt es bislang keine experimentellen Hinweise auf eine direkte Interaktion und verfügbare Daten zur Lage und Konformation der anti-DB innerhalb des Ribosoms sprechen ebenfalls eher gegen die Hypothese (Bläsi *et al.*, 1999; O'Connor *et al.*, 1999). In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass das DB Motiv auch als Ligand zu S1 allein, ohne rRNA oder andere ribosomale Proteine, isoliert wurde (Etchegaray *et al.*, 1998; Ringquist *et al.*, 1995). Der translationsverstärkende Effekt der DB könnte also auch teilweise S1-vermittelt sein. Gegen beide Deutungen des DB-Effektes spricht, dass die Erhöhung der Translationseffizienz durch das DB-Motiv auch in *Bacillus* zu beobachten ist, obwohl die Sequenzen der entsprechenden anti-DB auf der 16S rRNA von *B. subtilis* und *E. coli* sich nicht ähneln und S1 in *Bacillus* nicht vorkommt (Roberts & Rabinowitz, 1989; Tedin *et al.*, 1997). Der Hintergrund und die Bedeutung der Basenkomplementarität zwischen DB und 16S rRNA bleibt somit spekulativ.

Eine sequenzspezifische Bindung von S1 konnte außerdem für die transkriptionelle Antiterminator-RNA *boxA* (Mogridge & Greenblatt, 1998) und an polyadenylierte mRNA aus *E. coli* (Kalapos et al., 1997) gezeigt werden. *boxA* ist an der Antitermination bei der Transkription der rRNA-Gene beteiligt (Greenblatt et al., 1993; Nodwell & Greenblatt, 1993). Die Bedeutung der S1-Bindung an *boxA* für die Antitermination, konnte jedoch nicht aufgeklärt werden (Mogridge & Greenblatt, 1998). Auch die Beschreibung der Bindung an polyadenylierte mRNA aus *E. coli* geht über den reinen Befund kaum hinaus.

Die Expression von S1 ist auf posttranskriptioneller Ebene autoreguliert (Christiansen & Pedersen, 1981). Der genaue Mechanismus ist noch unklar, Anscheinend sind jedoch die C-terminale S1 Domäne und die 5'-untranslatierte Region (5'-UTR) der *rpsA* mRNA daran beteiligt. Deletionen des 5' Endes der UTR über die Position -91 hinaus verhindern die Autoregulation der S1-Expression. Deletionen der C-terminalen S1-Domäne bewirken den gleichen Phänotyp. Der Verlust dieser letzten S1-D beeinflusst aber anscheinend nicht die Funktion von S1 innerhalb des Ribosoms (Boni et al., 2000). Die 5'-UTR der *rpsA* mRNA formt vermutlich ausgiebige Sekundärstrukturen aus. In einer der möglichen Strukturen bilden die Nukleotide A<sup>-104</sup> bis U<sup>+27</sup> einen „stem-loop“, von dem zwei kleinere (U<sup>-101</sup> bis A<sup>-81</sup>, A<sup>-10</sup> bis U<sup>+13</sup>) abzweigen (Skouv et al., 1990). Die RBS (U<sup>-12</sup> bis C<sup>+11</sup>) ist in einer der kleinen Unterstrukturen enthalten. Bislang ist nicht klar welchen Einfluss die Sekundär- und Tertiärstruktur der TIR auf die Bindung von S1 und des Ribosoms an die RBS und die Translation von *rpsA* hat. Die Deletionen könnten jedoch die Ausbildung der für die Regulation eventuell notwendigen Strukturen beeinflussen.

S1 Domänen finden sich auch in anderen Proteinen. Viele davon sind an der Translationsinitiation oder dem RNA-Umsatz (turnover) beteiligt (Abb. 3; Bycroft et al., 1997). Der bakterielle und der Chloroplasten-Translationsinitiationsfaktor 1 (IF1) bestehen aus einer einzigen S1-Domäne. Ebenso findet sich das Motiv im eukaryontischen Translationsinitiationsfaktor eIF2 $\alpha$  (Gribskov, 1992). Die Polynukleotidphosphorylase (PNPase) enthält eine konservierte S1-Domäne an ihrem C-Terminus (Regnier et al., 1987) und als weiteres RNA-Bindemotiv eine KH-Domäne direkt davor (Gibson et al., 1993). Die KH-Domäne wurde erstmals im humanen heterogenen nukleären Ribonukleoprotein (hnRNP) K identifiziert und wird, wie die S1-Domäne vornehmlich mit unspezifischer Bindung von RNA in Beziehung gesetzt (Mah et al., 1999). Die PNPase hat 3'-5' Exonukleaseaktivität und ist eines der wichtigsten Enzyme für den mRNA-Umsatz und das Recycling von Nukleotiden in Bakterien (Danchin, 1997). Zwei weitere Familien von bakteriellen RNasen, die 3'-5' Exonuklease RNase II und die Endonuklease RNase E, enthalten ebenfalls S1-Motive, die in ihrer Primärstruktur jedoch weniger stark konserviert sind (Bycroft et al., 1997). VacB wurde als Virulenzfaktor in *Shigella flexneri* beschrieben und gehört mit zur RNase II Familie (Tobe et al., 1992). Die S1-D des Transkriptionsfaktors NusA ist ebenfalls nicht offensichtlich, entspricht aber dem von Bycroft und Koautoren (1997) entworfenen Schema konservierter Reste und vorhergesagter Sekundärstrukturen. Beispiele für eukaryontische Proteine mit der S1-D sind das RNA-Helikase-ähnliche Protein PRP22 aus Hefe, das für die Freigabe der mRNA aus Spleißosomen benötigt wird (Company et al., 1991) und die Untereinheit E der DNA-abhängigen RNA Polymerase (RPO E) aus Hefe und Pflanzen aber auch Archaeen (Langer et al., 1994).

**Abb. 3:** Schematische Darstellung einiger Proteine mit S1-Domänen. Die S1-D sind blau abgesetzt. PNPase und NusA enthalten KH-Domänen (KH) als zusätzliche RNA-Bindemotive. Wegen Erläuterungen zu den Proteinen s. Text.



(Bycroft et al., 1997, Sugita et al. 2000)

Besonders interessant sind jedoch zwei S1 ähnliche Proteine mit DNA-Bindeaktivität. Im einen Fall handelt es sich um ein *Leuconostoc lactis* Protein mit vier Wiederholungen des S1-Motivs, das zwei mal unabhängig als Verunreinigung aus kommerziellen Expressions-Genbanken humaner Granulocyten (Eklund *et al.*, 1995) und Ratten Muskelgewebe (Yamit-Hezi *et al.*, 1997) isoliert wurde. Das Protein wurde jeweils wegen seiner Affinität für ein CT-reiches Motiv in verschiedenen eukaryontischen Promotern gefunden. Im zweiten Fall handelt es sich um das Protein Nbp1 (nucleic acid binding protein 1) aus dem Cyanobakterium *Synechococcus* sp. PCC6301 (Sugita *et al.*, 2000). Nbp1 enthält wie das S1 Protein aus *Synechococcus* (SS1) drei S1-Domänen (Sugita *et al.*, 1995), unterscheidet sich von diesem aber deutlich im Molekulargewicht und vor allem in seinen Nukleinsäure-Bindeeigenschaften. In Bindestudien mit gereinigtem Protein konnte *in vitro* eindeutig eine Präferenz von Nbp1 für ds und vor allem ssDNA nachgewiesen werden (Sugita *et al.*, 2000).

Die S1-Domäne bildet in Lösung ein fünfsträngiges antiparalleles „ $\beta$  barrel“ (Bycroft *et al.*, 1997). Die zwischen verschiedenen S1-D am stärksten konservierten Reste sind dabei alle auf der selben Seite des Proteins angeordnet und bilden die vermutete Nukleinsäure-Bindestelle. Zwei konservierten aromatischen Resten (Phe) kurz vor und in der Mitte von Strang 2 wird eine besondere Bedeutung für die Bindung einzelsträngigen Nukleinsäuren zugesprochen, da sie sich zwischen die Basen der gebundenen Nukleinsäure schieben könnten während jew. zwei basische (His, Arg) und zwei hydrophile (Ser) Reste die Bindung stabilisieren (Bycroft *et al.*, 1997; Draper & Reynaldo, 1999). Die Vielfalt der Bindespezifitäten verschiedener S1-D spiegelt sich auch in den Aminosäuresequenzen wieder. So sind die Reste der vermuteten Nukleinsäurebindestelle in den beiden (proteinbindenden) N-terminalen Domänen von S1 weit weniger stark konserviert als in den anderen (nukleinsäurebindenden) S1-D (Bycroft *et al.*, 1997; Sugita *et al.*, 2000).

Die räumliche Struktur der S1-Domäne ist erstaunlich ähnlich zu der von bakteriellen Kälteschock-Proteinen (CSPs) und der Kälteschock-Domäne (CSD) eukaryontischer Y-box Proteine. CSPs und CSD-Proteine wirken als RNA-Chaperone und RNA-Histone und sind an der Regulation der Stabilität und translationellen Verfügbarkeit von mRNAs beteiligt (Graumann & Marahiel, 1998; Sommerville, 1999). Die Bindung von CSPs an bestimmte mRNAs erfolgt wahrscheinlich parallel zu deren Synthese und verhindert so die Ausprägung von Sekundärstrukturen. Diese Bindung stellt einen von Protein-Protein-Wechselwirkungen unabhängigen Weg der transkriptionellen Antitermination dar und ist vermutlich die Grundlage für die Induktion verschiedener Nicht-CSPs, z. B. NusA, IF2 und PNPase, unter Kälteschockbedingungen (Bae *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 1997). Wie schon für die S1-Domäne gibt es Hinweise, dass auch die Nukleinsäurebindung von CSPs und der CSD durch interkalierende Seitenketten erfolgt (Schröder *et al.*, 1995). CSPs wurden ursprünglich wegen ihrer Induktion unter Kälteschockbedingungen charakterisiert und benannt. Von den neun CSPs in *E. coli* (CspA-I) sind jedoch nur vier durch Kälte (CspA, CspB, CspG und CspI) induzierbar, andere werden in der frühen stationären Phase (CspD) oder konstitutiv bei 37 °C (CspC und CspE) exprimiert (Yamanaka *et al.*, 1998). Die Funktionen der einzelnen CSPs erscheinen zumindest teilweise redundant. In *Bacillus subtilis* wird die Deletion einzelner *csp* Gene durch stärkere Synthese der verbleibenden kompensiert. Die Deletion aller *csp* Gene ist hingegen lethal (Graumann & Marahiel, 1998).

Proteine mit S1-Domänen oder der strukturell verwandten Kälteschock-Domäne sind offenbar an einer großen Zahl grundlegender und essenzieller Regulationsprozesse in Lebewesen aller Entwicklungsstufen beteiligt. Tex aus *Bordetella pertussis* definiert eine neue Familie von Proteinen mit S1-Domänen mit bislang unbekannter Funktion. Das außergewöhnliche Ausmaß der Konservierung des Tex Proteins in vielen, nur entfernt verwandten Bakterien lässt jedoch eine grundlegende Bedeutung vermuten. Ziel dieser Arbeit war es einen weiteren Beitrag zum Verständnis dieser Proteinfamilie zu leisten.

## Ergebnisse

### Verbreitung von *Tex* in anderen Bakterien

*tex* ist bei den Eubakterien nahezu ubiquitär. Bei TBLAST-Suchen mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz (Altschul et al., 1997) von *tex* in der NCBI Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) finden sich bislang in fast 40 Arten aus unterschiedlichen Phyla (Stand: Sept. 2000) Leserahmen die für außerordentlich ähnliche putative Proteine kodieren (vgl. Tab. 1, Abb. 4). In der Mehrheit der aufgefundenen Sequenzen (Median) liegt die Anzahl der ähnlichen Positionen zu *Tex* aus *B. pertussis* bei über 69 %, die der identischen Positionen immerhin noch bei über 55 % (Mittelwerte: 66,7 %; 52,1 %). Der Anteil der Lücken in der direkten Gegenüberstellung ist bis auf einzelne Ausnahmen vernachlässigbar ( $\leq 1$  %). Die weite Verbreitung von *Tex* deutet darauf hin, dass es sich um ein phylogenetisch sehr altes Protein handeln könnte.

In Bakterien sind Gene für Proteine, die funktionell zusammengehören, oft in gemeinsamen Transkriptionseinheiten, sog. Operons, organisiert oder befinden sich auf dem Chromosom in räumlicher Nähe zueinander. Eine Analyse der im Genom oberhalb und unterhalb eines Gens liegenden Bereiche kann daher einen Anhaltspunkt für die Funktion des kodierten Proteins geben. Im Gegensatz zur Aminosäuresequenz von *Tex* ist jedoch die Lage des Gens innerhalb des Genoms zwischen verschiedenen Arten anscheinend nicht besonders konserviert. Verdeutlicht wird dies durch einen Vergleich der *tex* Loci einiger eng verwandter Arten deren Genomsequenz bereits bekannt und annotiert und frei zugänglich ist (Abb. 5).

Bei den  $\gamma$  Proteobakterien *Escherichia coli* (*E. c.*), *Vibrio cholerae* (*V. c.*), und *Haemophilus influenzae* (*H. i.*) befindet sich direkt stromaufwärts des *tex* Leserahmen das Gen *greB*. In *E. c.* liegt es in der selben Leserichtung wie *tex*, während das Gen in *V. c.* und *H. i.* in entgegengesetzter Richtung transkribiert wird. Die Proteine GreB und das an anderer Stelle kodierte GreA sind in *E. c.* als Transkript-Spaltungs-Faktoren (transcript cleavage factors) beschrieben. Die beiden Proteine interagieren jeweils unter unterschiedlichen Bedingungen mit der RNA Polymerase (RNAP) im ternären Komplex (mit DNA und neu synthetisierter mRNA). Die Anlagerung von GreA oder GreB bewirkt hier die Abspaltung kurzer RNA-Oligonukleotide. Damit wird verhindert, dass die Polymerase am bestimmten Stellen der DNA hängen bleibt und so die weitere Transkription, auch die durch die nachfolgenden RNAP, blockiert wird (Koulich et al., 1996; Polyakov et al., 1998). Weiter stromaufwärts, auf dem Gegenstrang zu *tex* liegen in *E. c.* und *V. c.* die Gene *ompR* und *envZ*. Sie kodieren für das OmpR/EnvZ Zweikomponentensystem, das an der Regulation der Porinexpression beteiligt ist (Perraud et al., 1999; Slauch et al., 1991). In *Pseudomonas aeruginosa* (*P. a.*), wie *E. c.* und *V. c.* aus der  $\gamma$  Gruppe der Proteobakterien, befinden sich *ompR* und *envZ* ebenfalls oberhalb und in der Gegenrichtung von *tex*, *greB* liegt in diesen Arten allerdings an einer anderen Stelle des Genoms. Unterhalb von *tex* liegen in den vier angesprochenen Arten jeweils unterschiedliche Gene, die sich auch nicht gemeinsamen Stoffwechselwegen zuordnen lassen.

**Tab. 1:** TBLAST mit der konzeptionellen Translation von *tex* aus *Bordetella pertussis*. Es wurden nur Sequenzen mit Ähnlichkeit über die gesamte Länge in die Liste aufgenommen. Die vergleichenden Angaben beziehen sich jeweils auf *Tex* von *B. pertussis*.

Art	Sequenz	Wahrsch.	Ident. (%)	Ähnl. (%)	Lücken (%)	Bereich
<i>Bordetella pertussis</i>	tex Gen	0.0	100	100	0	1-791
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	unf. gen.	0.0	57	71	0	23-791
<i>Bacillus anthracis</i>	unf. gen.	e-159	44	61	0	19-738
<i>Bacillus subtilis</i>	compl. gen.	e-110	34	51	8	22-738
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	unf. gen.	e-158	44	61	0	18-738
<i>Clostridium acetabutylicum</i>	unf. gen.	e-179	46	64	1	19-739
<i>Clostridium difficile</i>	unf. gen.	e-164	43	62	0	13-739
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	unf. gen.	0.0	56	69	0	19-788
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	unf. gen.	0.0	46	60	1	14-780
<i>Enterococcus faecalis</i>	unf. gen.	e-166	46	62	1	19-738
<i>Escherichia coli</i> K-12 MG1655	compl. gen.	0.0	61	72	0	23-787
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	unf. gen.	0.0	50	64	0	19-769
<i>Haemophilus ducreyi</i> Strain 35000HP	unf. gen.	0.0	55	69	0	23-790
<i>Haemophilus influenzae</i> RD	compl. gen.	0.0	57	71	0	23-741
<i>Legionella pneumophila</i>	unf. gen.	0.0	57	72	1	21-791
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	unf. gen.	0.0	58	71	0	2-791
<i>Neisseria meningitidis</i> (A) strain Z2491	compl. gen.	0.0	60	73	0	23-791
<i>Neisseria meningitidis</i> (B) strain MC58	compl. gen.	0.0	60	74		23-791
<i>Pasteurella multocida</i> PM70	unf. gen.	0.0	57	70	0	23-787
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	compl. gen.	0.0	63	75	1	12-791
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	unf. gen.	0.0	62	74	0	19-791
<i>Salmonella paratyphi</i> A	unf. gen.	0.0	50	61	3	23-779
<i>Salmonella typhi</i> CT18	unf. gen.	0.0	60	72	0	23-787
<i>Shewanella putrefaciens</i>	unf. gen.	0.0	58	72	1	17-791
<i>Staphylococcus aureus</i> COL	unf. gen.	e-149	41	61	0	33-738
<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 8325	unf. gen.	e-149	41	61	0	33-738
<i>Streptococcus equi</i>	unf. gen.	e-155	44	61	0	23-738
<i>Streptococcus mutans</i>	unf. gen.	e-157	43	61	0	19-750
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	unf. gen.	e-156	44	62	0	22-738
<i>Streptococcus pyogenes</i> Manfredo	unf. gen.	e-150	43	59	0	23-738
<i>Streptomyces coelicolor</i>	cosmid 5F2A	0.0	58	71	0	15-788
<i>Treponema denticola</i>	unf. gen.	e-136	38	56	1	14-771
<i>Treponema pallidum</i>	compl. gen.	e-135	38	55	1	11-777
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	compl. gen.	e-113	33	55	0	19-740
<i>Vibrio cholerae</i>	chromos. I	0.0	58	71	0	19-791
<i>Xylella fastidiosa</i>	compl. gen.	0.0	59	72	0	20-790
<i>Yersinia pestis</i>	unf. gen.	0.0	58	70	2	23-787

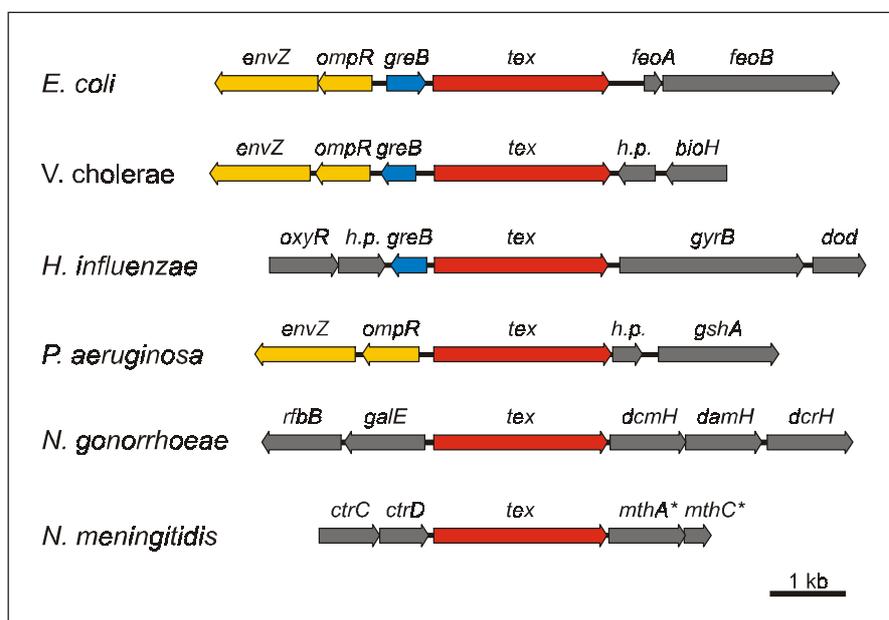
**Abb. 4:** Verbreitung von Tex-ähnlichen putativen Proteinen bei den Bakterien (vgl. Tab. 1). Die Anordnung der Arten erfolgte alphabetisch und entspricht der NCBI Taxonomie Datenbank. Solche Arten, deren Genom bereits vollständig sequenziert wurde und in denen ein Lese-rahmen für Tex nicht vorkommt sind rot angegeben.

<b>Bacteria</b>	
Aquificales	<b>Aquificaceae</b> <i>Aquifex aeolicus</i>
Chlamydiales	<b>Chlamydiaceae</b> <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>C. pneumoniae</i>
Cyanobacteria	<b>Chroococcales</b> <i>Synechocystis</i> PCC6803
Firmicutes	<b>Bacillus/Clostridium Gruppe (low G/C gram<sup>+</sup>)</b> <i>Bacillus/Lactobacillus/Streptococcus</i> Gruppe <i>Bacillus anthracis</i> , <i>B. halodurans</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. stearothermophilus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. equi</i>
	Mycoplasmataceae <i>Mycoplasma genitalium</i> , <i>M. pneumoniae</i> <i>Ureaplasma urealyticum</i>
	Clostridiaceae <i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>C. difficile</i>
	Enterococcaceae <i>Enterococcus faecalis</i>
	<b>Actinobacteria (high G/C gram<sup>+</sup>)</b>
	Corynebacterineae <i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
	Streptomycineae <i>Streptomyces coelicolor</i>
Proteobacteria	<b>α Gruppe</b>
	Rickettsiaceae <i>Rickettsia prowazekii</i>
	<b>β Gruppe</b>
	Alcaligenaceae <i>Bordetella bronchiseptica</i> , <i>B. pertussis</i>
	Neisseriaceae <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>N. meningitidis</i>
	<b>γ Gruppe</b>
	Enterobacteriaceae <i>Buchnera aphidicola</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella typhi</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. paratyphi A</i> <i>Yersinia pestis</i>
	Pasteurellaceae <i>Pasteurella multocida</i> <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>H. ducreyi</i> <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>
	Pseudomonaceae <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>P. putida</i>
	Alteromonadaceae <i>Shewanella putrefaciens</i>
	Vibrionaceae Gruppe <i>Vibrio cholerae</i>
	Xanthomonas Gruppe <i>Xylella fastidiosa</i>
	Legionellaceae <i>Legionella pneumophila</i>
	<b>δ Gruppe</b>
	<i>Geobacter sulfurreducens</i>
	Desulfuromonas Gruppe <i>Desulfovibrio vulgaris</i>
	<b>ε Gruppe</b>
	<i>Helicobacter pylori</i> <i>Campylobacter jejuni</i>
Spirochaetales	Spirochaetaceae <i>Treponema pallidum</i> , <i>T. denticola</i>
Thermotogales	<i>Thermotoga maritima</i>

In *Neisseria meningitidis* und *N. gonorrhoeae* ( $\beta$  Proteobakterien) liegt die *tex*-ähnliche Region E zwischen Genen des sogenannten Kapselkomplex, die direkte Umgebung des Gens ist in beiden Arten aber völlig unterschiedlich (Petering *et al.*, 1996). Im Vergleich mit dem *tex* Locus von *B. pertussis*, ebenfalls Teil der  $\beta$  Proteobakterien, sind gar keine Ähnlichkeiten in den benachbarten Genen festzustellen (Fuchs, 1996).

Außer den *tex* Genen von *B. pertussis* und *E. coli* und der Region E aus *N. meningitidis* ist noch bei keinem der ähnlichen Leserahmen eine funktionelle Charakterisierung unternommen worden.

**Abb. 5:** Schematische Darstellung der *tex*-Loci verschiedener Proteobakterien. Leserahmen, die in mehreren Arten in der Nähe von *tex* liegen, sind farbig hervorgehoben. Die Bezeichnungen der Gene entsprechen der „Genbank“-Annotation der entsprechenden Genomsequenzen (h. p. = hypothetisches Protein ohne weitere Angaben; \* = Pseudogen)



### Deletion von *tex* in *E. coli*

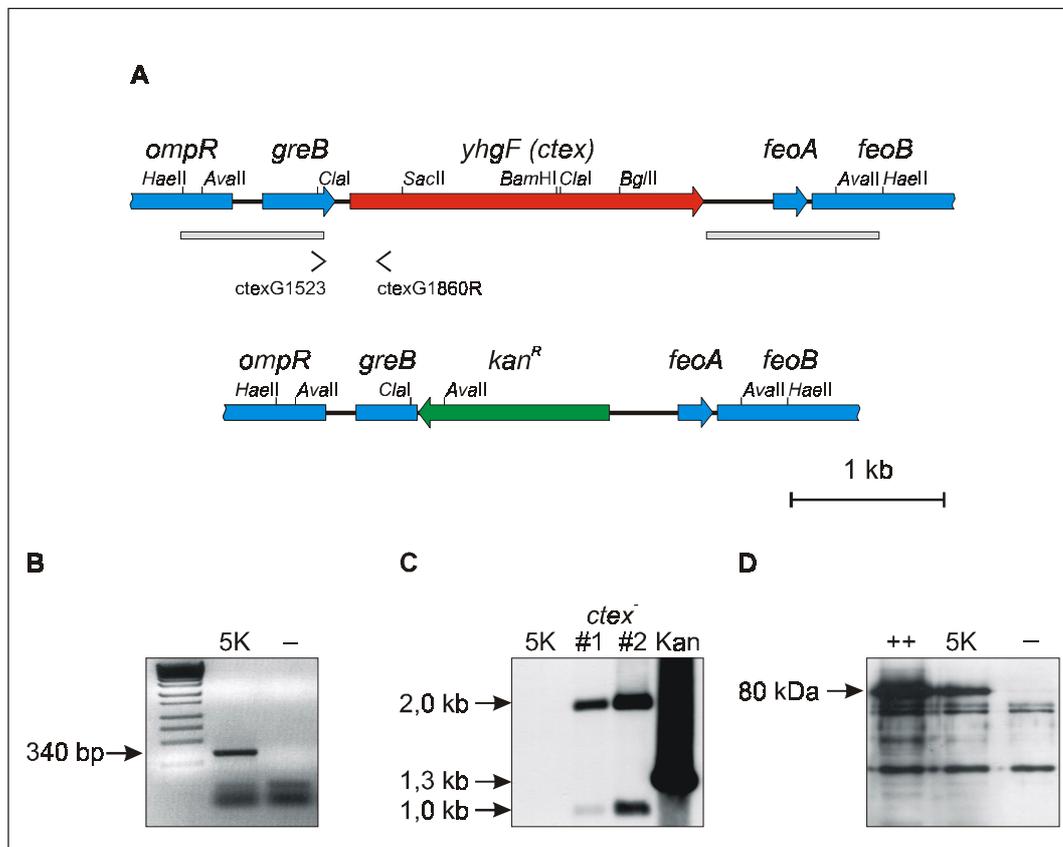
Da *tex* in *B. pertussis* weder deletiert, noch überexprimiert werden kann und weil die außerordentliche Ähnlichkeit zu putativen Proteinen in *E. coli* und anderen Eubakterien (Fuchs, 1996, diese Arbeit) auf besondere Konservierung des Proteins hindeutet, wurde untersucht, ob die Deletion des *tex*-Gens (*ctex*) in *E. coli* ebenfalls lethal wirkt. Das verwendete Selektionssystem für den chromosomalen Allelaustausch in Enterobakterien (Skorupski und Taylor, 1996) nutzt die phänotypische Dominanz des Streptomycin-sensitiven ( $Sm^s$ ) Allels von *rpsL* gegenüber der resistenten Variante. Der Allelaustausch erfolgte durch homologe Rekombination von Bereichen oberhalb und unterhalb des *ctex*-Gens auf dem Chromosom mit entsprechenden Sequenzen auf dem Plasmid pKASctexUKD. Dabei wurde *ctex* durch eine Kanamycin Resistenzkassette ersetzt. In Abbildung 6A ist der *ctex*-Locus von WT und *ctex*-Mutante schematisch dargestellt.

Nach der Selektion auf die Exzision und den Verlust des Vektors (s. Material und Methoden) wurden von einigen Klonen Lysate hergestellt und diese als Matrize für eine PCR mit den Primern *ctexG1523* und *ctexG1860R* verwendet. *ctexG1523* bindet

am 3' Ende der codierenden Sequenz von *greB*, oberhalb von *ctex*, *ctexG1860R* rund 340 bp entfernt, innerhalb von *ctex*. Nach einem Austausch von *ctex* gegen die Resistenzkassette sind die Bindestellen für beide Oligonukleotide nicht mehr vorhanden, somit kann kein Fragment mehr amplifiziert werden. Abb. 6B zeigt ein Agarosegel mit Produkten aus PCR-Reaktionen vom WT (5K) und der *ctex*<sup>-</sup> Mutante (-).

**Abb. 6:** Deletion des zu *ctex* aus *B. pertussis* homologen Leseramens *yhgF* aus *E. coli*.

**A)** Schematische Darstellung des *ctex*-Locus von WT und der *ctex*<sup>-</sup> Mutante. Die grauen Balken unterhalb des WT kennzeichnen die für die Deletion eingesetzten homologen Bereiche. Zusätzlich ist die Lage der Primer (> <) für die PCR in B) angegeben **B)** PCR mit den Primern *ctexG1523* und *ctexG1860R* mit chromosomaler DNA von *E. c.5K* (5K) und *E. c.5KΔctex* (-) **C)** Southernblot mit Km-Kassette aus pUC4KAN gegen je 15 μg chromosomale DNA aus *E. c.5K* (5K) und *E. c.5KΔctex* (*ctex*<sup>-</sup> #1, #2) oder 1 μg pUC4KAN (Kan). **D)** Westernblot mit polyklonalem anti-cTex(b)-Antikörper gegen Zelllysate von *E. c.5K*[pSKctexSE] (++) , *E. c.5K* (5K) und *E. c.5KΔctex* (-).



Zur Überprüfung wurde ein Southern-Blot mit Chromosomaler DNA aus dem WT und aus *ctex*<sup>-</sup>-Klonen durchgeführt (Abb. 6C). Dazu wurde die DNA vollständig mit *Ava*II verdaut und zusammen mit einer Präparation der Kanamycin -Kassette aus pUC4Kan (1,3 kb) als Positivkontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach der Auftrennung und der Übertagung auf eine Nylonmembran wurde der Blot mit der Kanamycin-Kassette hybridisiert. Da die Kassette selbst eine *Ava*II-Schnittstelle enthält sind in den Spuren mit Mutanten DNA zwei hybridisierende Banden von etwa 1 und 2 kb Größe, entsprechend den spezifischen Spaltprodukten zu sehen. Beim WT ist keine reagierende Bande zu beobachten. Die Hybridisierung ist also spezifisch und bestätigt des Ergebnis der PCR.

Auf Expressionsebene wurde die Deletion von *ctex* durch Western-Blot gezeigt. Für den in Abb. 6D gezeigten Blot wurden Ganzzelllysate von *E. c.5K*[pSKctexSE] (++) , *E. c. 5K* (5K) und *E. c.5KΔctex* (-) durch PAGE aufgetrennt, wie beschrieben geblottet und mit einem anti-cTex Antiserum hybridisiert. cTex läuft auf einer Höhe von ca. 80 kDa. Die entsprechende Bande fehlt in der Deletionsmutanten. Die weiteren Banden mit geringerem Molekulargewicht beruhen vermutlich auf kreuzreagierenden Antikörpern im Serum. In der Spur mit dem Lysat von *E. c. 5K*[pSKctexSE] ist die cTex Bande deutlich stärker ausgeprägt, als im gleichen Stamm ohne Plasmid. Auf pSKctexSE liegt die kodierende Sequenz von cTex(b) stromabwärts vom T7-Promoter des Plasmides und kann vermutlich von dort aus transkribiert werden. Der Translationsstart könnte dann an der von Blattner et al. (1997) angenommen Stelle erfolgen. Die cTex Überexpression beruht danach vornehmlich auf der großen Kopienzahl des Plasmides.

### Phänotypanalyse der *tex*-Mutanten in *E. coli*

Die Hinweise auf die tatsächliche Funktion von *tex* sind bisher sehr indirekt. Die Deletion des Gens oder eine starke Erhöhung der Gendosis durch eine Kopie des Gens auf einem „multi copy“ Plasmid wirken in *B. pertussis* lethal und erlauben daher keine Analyse eines Phänotyps. Werden nur zwei bis drei zusätzliche Kopien des Gens mit einem „low copy“ Plasmid eingebracht, sind die zu beobachteten Effekte sehr vom genetischen Hintergrund des verwendeten Stammes abhängig. Je nach Stamm kommt es zum Verlust der hämolytischen Eigenschaften auf Blutagar oder es ist kein verändertes Phänotyp feststellbar (Fuchs, 1996). Bisher konnte der Grund für die unterschiedliche Reaktion eng verwandter Stämme, z. B. TI (bleibt Hly<sup>+</sup>) im Gegensatz zu TIΔtox (wird Hly<sup>-</sup>) noch nicht aufgeklärt werden. Die beiden Stämme unterscheiden sich lediglich durch den Verlust von *ptx* in TIΔtox und sollten sich daher nicht in ihren regulatorischen Eigenschaften unterscheiden. Die Beteiligung von Tex an den regulatorischen Netzwerken der Bakterienzelle liegt damit zwar nahe, konnte aber noch nicht eindeutig belegt werden.

Bei Einzelausstrichen von *E. coli* auf LB- oder M9+Thiamin-Platten sind Kolonien von WT und Δ*tex*-Mutante makroskopisch nach Gestalt und Größe nicht unterscheidbar. Im Gegensatz zu *B. pertussis* ist *tex* für *E. coli* damit, zumindest unter Laborbedingungen nicht essentiell.

Die große Empfindlichkeit von *B. pertussis* gegenüber Veränderungen der Gendosis von *tex* scheint sogar eher einen Sonderfall im Vergleich mit andere Arten darzustellen. In *Neisseria meningitidis* und *Streptococcus pneumoniae* wurden von anderen Arbeitsgruppen ebenfalls Deletionsmutanten konstruiert, allerdings konnte in keinem der beiden Fälle ein veränderter Phänotyp der Mutanten gegenüber den Ausgangsstämmen festgestellt werden (Petering et al. 1996; de Saizieu, A., Hoffmann-La Roche AG, Basel, pers. Mitteilung).

### Wachstum unter Stress

Der Grad der Konservierung der Aminosäuresequenz von Tex in verschiedenen Bakterien legt die Vermutung nahe, dass während der Diversifikation der Arten ein Selektionsdruck auf den Erhalt von Tex bestand. Somit erscheint das Fehlen eines

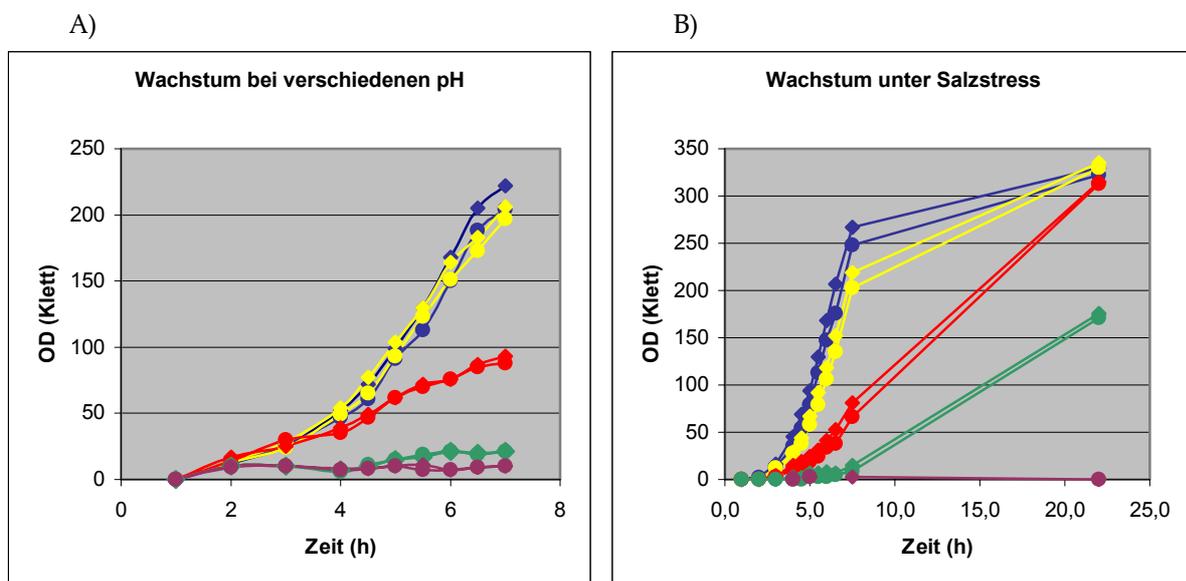
erkennbaren Phänotyps der *tex*- Deletionsmutanten ungewöhnlich. Das Wachstum von Bakterien in ihrer natürlichen Umwelt ist vermutlich meist durch verschiedene Faktoren limitiert und nur begrenzt mit dem logarithmischen Wachstum auf Vollmedien im Labor zu vergleichen. Es ist daher möglich, dass *Tex* vor allem unter bestimmten „suboptimalen“ Wachstumsbedingungen von besonderer Bedeutung ist. Für eine Analyse wurden deshalb Wachstumskurven unter verschiedenen Bedingungen aufgenommen.

Für die Wachstumskurven in verschiedenen Medien wurden ÜNK 1:200 in M9+TTS (Thiamin, Tryptophan, Serin) mit entsprechend eingestelltem pH (**Abb. 7A**) oder bestimmten Kochsalz-Konzentrationen (**Abb. 7B**) verdünnt, und in regelmäßigen Abständen die optische Dichte im Klett-Photometer bestimmt.

In den Experimenten mit verschiedenen pH Werten und Salzkonzentrationen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen  $\Delta ctex$  Mutante und WT festgestellt werden. Sowohl das Wachstum in M9 Medium als auch die Verlängerung der Generationszeit unter Salz- oder Säurestress sind für beide Stämme identisch. Bei einem pH von weniger als 5,3 ist das Wachstum drastisch verlangsamt und ab pH 4,3 innerhalb der untersuchten Zeiträume nicht mehr feststellbar.

**Abb. 7:** Wachstum von *E. coli* 5K und der  $\Delta ctex$ -Mutante unter Stress.

Wachstumskurven von *E. coli* 5K (♦) und  $\Delta ctex$ -Mutante (●) in M9+TTS **A)** bei verschiedenen pH: blau, 7,3; gelb, 6,3; rot, 5,3; grün, 4,3; violett, 3,3; **B)** mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen: blau, 0 M; gelb, 0,1 M; rot, 0,25 M; grün, 0,5 M; violett, 1,0 M



Für Kochsalz-Konzentrationen von 250 mM und höher ergibt sich ein ähnliches Bild. Ein Vergleich der optischen Dichten nach 22 h in salzhaltigen Medien zeigt zudem, dass die Verlangsamung des Wachstums, zumindest bei 250 und 500 mM Kochsalz anscheinend keinen Einfluss auf die Vitalität der Kulturen hat, da nach längerer Inkubation doch größere Zelldichten erreicht werden. Bei 250 mM NaCl im Medium zeigen die Kulturen nach 22 h sogar die gleiche OD wie nach der Inkubation in unkomplementiertem M9+TTS.

Neben den Versuchen zum Verhalten in flüssigem Medium wurde noch eine Wachstumsbestimmung auf M9+TTS-Agar mit 10–100  $\mu$ M Methyl-Viologen (Paraquat) durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Verdünnungsstufen einer logarithmischen Kultur ( $OD_{600}=0,6$ ) auf Agarplatten mit und ohne Me-Viologen ausplattiert und nach Bebrütung ÜN bei 37 ° C die gewachsenen Kolonien ausgezählt.

Me-Viologen bewirkt in Bakterien eine Erhöhung der Konzentration an freien Sauerstoffradikalen, die i. d. R. durch Superoxyddismutasen (Sod) und Katalase unschädlich gemacht werden. Wenn das nicht mehr im notwendigen Ausmaß geschieht, kommt es zum Tod der Zelle durch die Inhibition von essentiellen Enzymen und die Akkumulation von Erbgutschäden. Wie schon bei den Wachstumskurven konnte ebenfalls kein Unterschied in der Reaktion von WT und Mutante auf Me-Viologen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

## Kälteschock

Die Aminosäuresequenz des C-Terminus von *tex* zeigt eine starke Ähnlichkeit mit der S1-Domäne. Bycroft et al. (1997) haben ihrerseits eine stark ausgeprägte Übereinstimmung der Tertiärstruktur der S1 Domäne mit der des Kälteschock-Proteins CspA aus *E. coli* festgestellt. Außerdem ist die Polynukleotidphosphorylase (PNPase), die wie Tex eine S1-Domäne enthält, eines der wichtigsten Enzyme während der Adaptation an tiefe Wachstumstemperaturen. Da unter allen bis dahin gewählten Kulturbedingungen keine phänotypischen Unterschiede zwischen  $\Delta$ *ctex* Mutante und WT gefunden werden konnten, wurde zusätzlich die Kälteschock-Antwort mit Hilfe von 2D-PAGE untersucht.

Dazu wurden ÜNK von *E. c.* 5K und der Mutante 1:50 in LB verdünnt und bei einer  $OD_{600}$  von 0,7 auf zwei Aliquots aufgeteilt. Die eine Portion wurde sofort bei Raumtemperatur abzentrifugiert und der Niederschlag in 7 M Harnstoff aufgenommen. Die andere Hälfte wurde auf Eis schnell abgekühlt und anschließend 45 min bei 10 ° C weiter inkubiert. Danach wurde auch dieser Teil der Kultur für die Elektrophorese vorbereitet. Pro Gel wurden 50  $\mu$ g Protein aufgetragen. Proben, die verglichen werden sollten, wurden parallel verarbeitet. Zwar wurden zahlreiche Unterschiede zwischen den Proteinmustern der Lysate von Kälte-geschockten und ausschließlich bei 37 ° C angezogenen Kulturen gefunden, die für die Kälteschockantwort typischen Veränderungen, insbesondere die Induktion von CspA, konnten jedoch nicht nachvollzogen werden. Dies gelang auch nicht mit Westernblots, die mit einem gegen CspA von *Bacillus cereus* gerichteten polyklonalen Antikörper (freundliche Gabe von Prof. S. Scherer, TU München (Mayr, 1996)) entwickelt wurden. Allerdings zeigte der  $\alpha$ -CspA Antikörper nur eine recht geringe Spezifität, die auch schon bei den Untersuchungen an *B. cereus* Probleme aufgeworfen hatte (AG Scherer, pers. Mitteilung).

Tex konnte in den Lysaten nur durch Immunoblots mit einem  $\alpha$ -cTex Antikörper (s. o.) sichtbar gemacht werden. Es konnte jedoch keine Veränderung der cTex-Menge in den verschiedenen WT-Lysaten festgestellt werden. Gleichmaßen wurden auch keine Unterschiede in den Proteinmustern silbergefärbter Gele zwischen Mutante und WT ausfindig gemacht werden. Daher wird hier auf eine Darstellung der Gele verzichtet.

## Transkription von *tex* in *E. coli*

In *B. pertussis*, *V. cholerae*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa* und *N. meningitidis* wird *tex* offenbar von einem eigenen Promoter aus transkribiert, da die direkt stromaufwärts gelegenen Leserahmen in der gegenläufigen Richtung kodiert sind. In *B. pertussis* und *V. cholerae* kann man aufgrund der Orientierung der stromabwärts von *tex* gelegenen Leserahmen sogar von einer monocistronischen *tex*-mRNA ausgehen (s. o., Fuchs, 1996). *tex* und das oberhalb gelegene Gen *greB* werden in *E. coli* zwar in der selben Richtung transkribiert, im Bereich von 20-30 Nukleotiden nach dem *greB* Stop-Codon gibt es allerdings einen möglichen, Rho-unabhängigen Terminator. 5-28 bzw. 90-120 Nukleotide unterhalb der kodierenden Sequenz von *tex* können sich in der mRNA ebenfalls Terminatorstrukturen ausbilden (s. *tex*-Sequenz im Anhang). Die möglichen Transkriptions-Terminatoren wurden mit dem Programm „terminator“ aus dem GCG Sequenzanalyse Paket ermittelt. Somit wird *tex* in *E. coli* wahrscheinlich, wie in *B. pertussis* und *V. cholerae* als monocistronische mRNA abgelesen.

Für die experimentelle Bestimmung des Transkriptionsstartes und die Ermittlung des Promoters von *tex* in *E. coli* wurde das Verfahren der „Primer Extension“ angewendet. Dazu wurden je 20 µg RNA aus *E. coli* 5K und *E. coli* DH5α[pSKctexHE] und zur Kontrolle der Spezifität *E. c.* 5K *ctex*<sup>-</sup> mit dem zuvor <sup>32</sup>P-markierten Primer *ctex*1860R einer reversen Transkription unterzogen. Anschließend wurden die Ansätze zusammen mit einer Sequenzierungsreaktion von pSKctexHE mit dem selben Primer auf einem PAA-Harnstoff-Gel aufgetrennt. Dem getrockneten Gel wurde übernacht und für eine Woche ein Röntgenfilm aufgelegt und das Autoradiogramm analysiert.

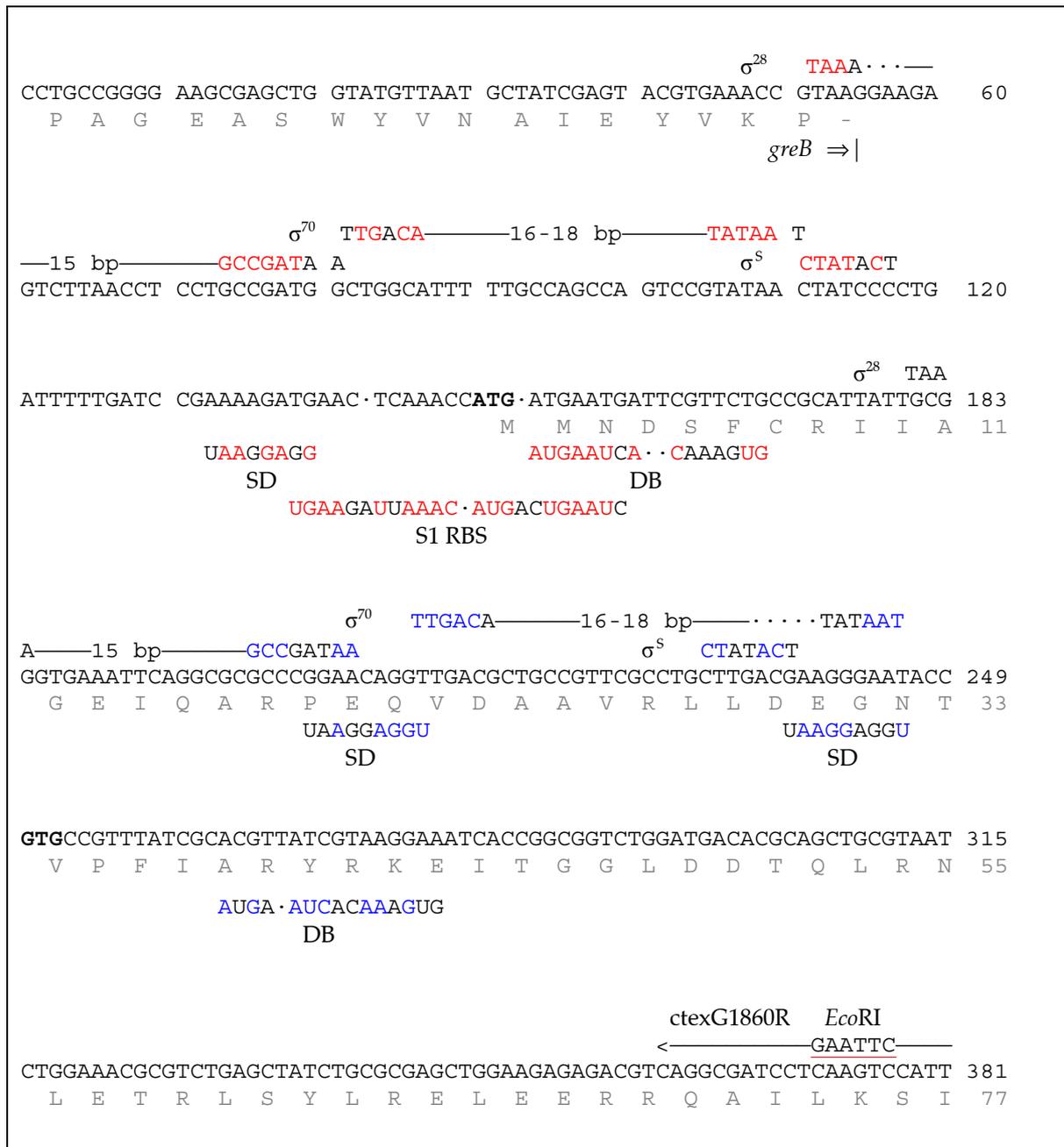
*ctex*1860R bindet die *ctex*-mRNA im Bereich der Codons 71-77 (vgl. Abb. 8). Das Plasmid pSKctexHE ist ein Derivat von pBluescriptSK. Es enthält das *tex*-Gen aus *E. coli* zusammen mit rd. 240 bp des Bereiches oberhalb der codierenden Sequenz. Das 2,7 kb große Fragment wurde durch PCR von DNA aus λ 2F6 (Kohara et al., 1987) mit den Primern *ctex*5.1.2 und *ctex*3.2 und anschließenden Restriktionsverdau mit *Hind*III und *Eco*RI, gewonnen. Durch den Einsatz des multi-copy-Vektors wurde eine deutliche Steigerung der *tex*-Transkriptmenge erwartet. Es konnten jedoch keine reversen Transkripte gefunden werden. Der Transkriptionsstart von *ctex* konnte somit nicht experimentell bestimmt werden.

Auch eine Untersuchung der DNA Sequenz im Bereich der beiden alternativen Translationsstarts auf mögliche Promotoren und Ribosomenbindestellen (RBS) hin gibt keine eindeutigen Hinweise. Für den weiter 5'-gelegenen Translationsstart finden sich jedoch die besseren Übereinstimmungen zu verschiedenen Promoter-Konsensussequenzen (vgl. Wösten, 1998; Abb.: 8). Insbesondere lässt sich ein überzeugendes Alignment mit dem  $\sigma^{70}$ -Konsensus herstellen: Die ersten 5 Basen der -10-Box (TATAA) entsprechen dem Konsensus und 10 Basen unterhalb der ausgerichteten Sequenz („aligned sequence“, vgl., Chen, 1994) bietet sich ein Adeninrest als Transkriptionsstart an. Die -35-Box ist mit 4 von 6 Positionen, dabei die beiden G und C, ebenfalls gut konserviert und befindet sich in einem Abstand von 18 bp von der -10 Box. Alternativ besteht auch eine gute RpoS ( $\sigma^S$ )-Bindestelle (5 von 7 Positionen, beide C), ebenfalls mit einem möglichen Transkriptionsstart 11 Basen stromabwärts. Außerdem findet sich eine fast perfekte  $\sigma^{28}$ -Bindestelle (9 von 12 Positionen, alle 4 G/C).

Allerdings ist hier der Abstand zwischen  $-10$  und  $-35$  Box mit 18 bp um 3 bp länger als es dem relativ strengen Konsensus für diesen Promoter entspricht.

**Abb. 8:** 5'-Bereich von *tex* aus *E. coli*:

Oberhalb der Nukleotidsequenz sind Konsensus-Sequenzen verschiedener *E. coli* Promotoren aufgetragen (Wösten, 1998), unterhalb sind Ribosomenbindesequenzen (SD und DB) (de Smit, 1994, Etchegaray, 1998) und die RBS *rpsA* mRNA (S1 RBS) aus *E. coli* (Ringquist, 1995) angegeben. Übereinstimmende Nukleotide sind für den oberen Translationsstart rot, für den unteren blau hervorgehoben. In grau ist die konzeptionell translatierte Aminosäuresequenz aufgeführt, die putativen Translations-Start-Codons sind in Fettdruck. Am 3'-Ende der dargestellten Sequenz ist das Oligonukleotid für die Primer Extension (ctexG1860R) angegeben.



In der Nähe des von Blattner et al. (1997) vorgeschlagenen Translationsstart finden sich hingegen keine überzeugenden Übereinstimmungen mit bekannten Promotersequenzen.

Für mögliche RBS (vgl. Chen, 1994, Etchegaray, 1999) ergibt sich ein sehr ähnliches Bild. 10 bp (9 bp „aligned distance“) oberhalb des oberen (ATG) Start-Codons befindet sich eine Shine-Dalgarno Sequenz (5/9 Übereinstimmungen). Außerdem liegt direkt im Anschluss an das Start-Codon eine Downstream-box (10/15 Übereinstimmungen, davon 3 G/C). Besonders interessant erscheint die ausgeprägte Ähnlichkeit dieser möglichen Ribosomenbindestelle mit der von *rpsA* (17/23). Dem unteren Translationsstart fehlt eine passende RBS. Zwar befinden sich bei -4 und -38, relativ zum von Blattner postulierten (GTG) Start-Codon, zwei Bereiche mit Ähnlichkeit zur Shine-Dalgarno Sequenz und bei +12 eine mögliche Downstream-box, doch passt für keines dieser Elemente der Abstand zum Start-Codon (Chen, 1994). Hinzu kommt noch, dass gewöhnlich ATG gegenüber GTG als Start-Codon bevorzugt ist und zu einer erhöhten Translationsrate beiträgt (de Smit, 1994, Rinquist, 1992).

## Reinigung von Tex aus *E. coli*

Für die biochemische Analyse der Funktion von Tex wurden verschiedene Derivate des Proteins aus *E. coli* überexprimiert und gereinigt.

Die Überexpression der unterschiedlichen rekombinanten Proteine erfolgte mit Hilfe des QIAexpress Systems von QIAGEN. Auf den Expressions-Vektoren pQE30, 31 und 32 befindet sich die „multiple cloning site“, jeweils um ein Basenpaar verschoben, hinter sechs Histidin-spezifischen Codons und einer synthetischen Ribosomenbindestelle. Die Überexpression des Fusionsproteins erfolgt unter der Kontrolle eines optimierten Lac-Promoters. Der „His-tag“ ermöglicht die Reinigung des rekombinanten Proteins durch Affinitätschromatographie über eine Ni-NTA-Agarose Matrix.

Für die Klonierung der Sequenzen für die Fusionsproteine wurden PCR-Produkte zunächst mit QIAquick Säulchen (QIAGEN) gereinigt und ankonzentriert. Im Anschluss an Restriktionsverdauung wurden die abgespaltenen Enden, bis ca. 50 bp Größe, ebenfalls über Säulchen abgetrennt. Aus Plasmiden ausgeschnittene Fragmente wurden im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit dem QIAquick Gelextraktionskit (QIAGEN) gereinigt bevor sie in weitere enzymatische Reaktionen eingesetzt wurden. Soweit nicht anders angegeben, wurden Inserts und Vektoren jeweils mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten und über ihre passenden überhängenden Enden ligiert. *E. coli* DH5 $\alpha$  diente als Wirt für die Plasmide aus allen Zwischenschritten. Die fertigen Überexpressionskonstrukte wurden in *E. coli* M15[pREP4] (QIAGEN) transformiert.

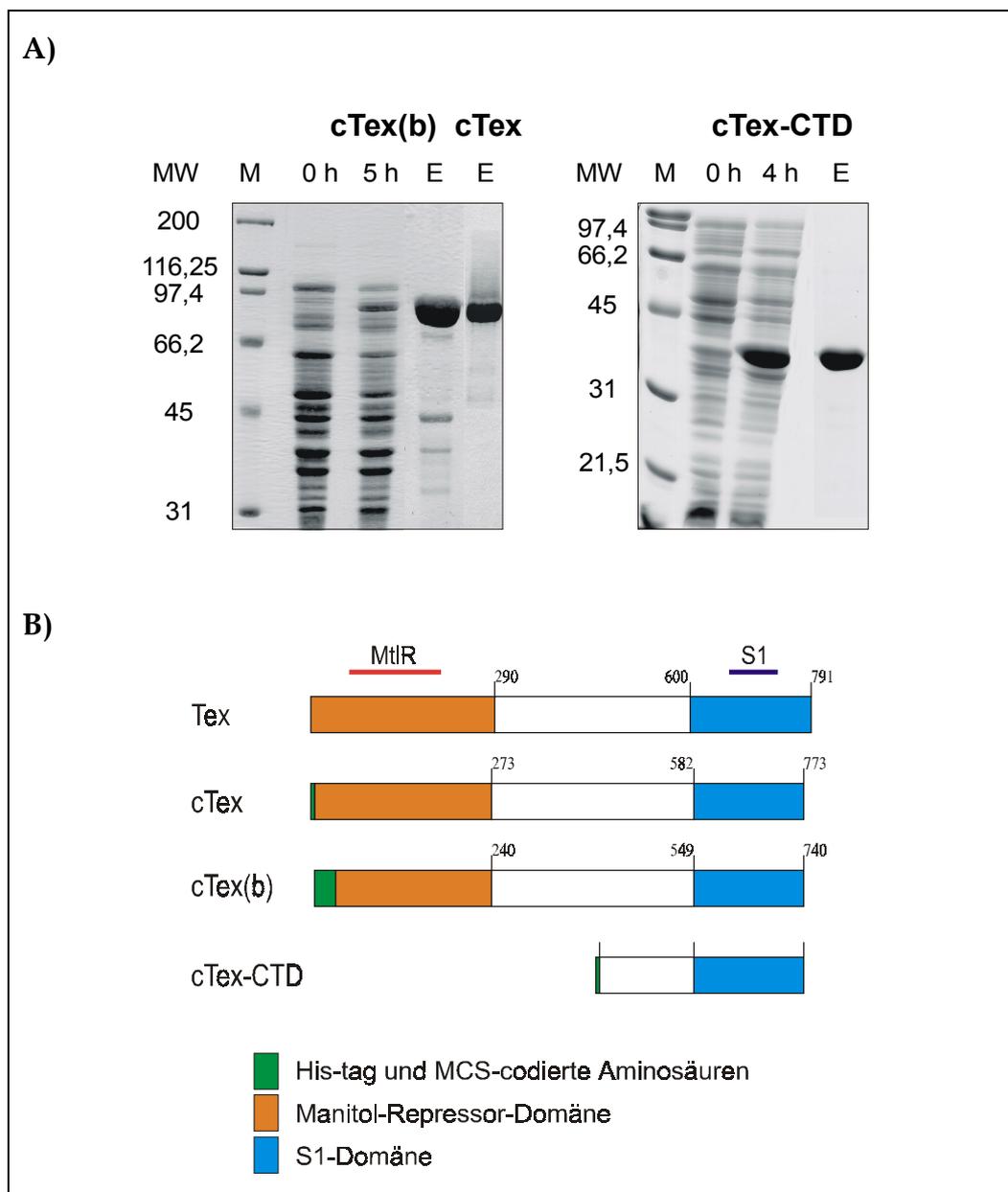
Der offene Leseramen *yhgF* kodiert für das Tex-Homologe von *E. coli*. In dieser Arbeit wird das Gen daher *ctex* genannt. Es befindet sich auf dem *E. coli* Chromosom bei 76,2 min. und ist auf dem Insert des  $\lambda$  Phagen 2F6 der Genbank von Kohara et al. (1987) enthalten. Das Phageninsert umfasst den Bereich von 75,95–76,35 min des *E. coli* Chromosoms (ca. 19 kb). Zur Klonierung von *ctex* wurde von der gereinigten Phagen-DNA mit den Primern *ctex*5.10 und *ctex*3.2 ein 2,43 kb großes Fragment amplifiziert und anschließend über die an den Enden eingefügten *SphI* bzw. *EcoRI* Schnittstellen in pUC18 kloniert. Das Insert wurde mit *HindIII* und *EcoRI* wieder

ausgeschnitten und in den entsprechend präparierten Vektor pBluescriptSK ligiert. Das resultierende Plasmid pSKctexSE enthält den offenen Leseramen *yhgF*, gemäß der Annotation der *E. coli* Genomsequenz (Blattner et al., 1997). Das entsprechende Protein mit einer Länge von 740 Aminosäuren wird im Weiteren als cTex(b) bezeichnet.

**Abb. 9:** Die in dieser Arbeit verwendeten cTex-Derivate

**A)** Überexpression und Reinigung von cTex(b), cTex und cTex-CTD. Links: 10 % PAA-Gel mit Zellysaten von *E. c.*M15[pQEctexSE] vor (0 h) und nach 5 Stunden (5 h) Induktion mit 1 mM IPTG. Daneben gereinigtes cTex(b) und cTex. Rechts: 12 % PAA-Gel mit Zellysaten von *E. c.* M15[pQEctexCTD] vor (0 h) und nach 4 Stunden (4 h) Induktion mit 1 mM IPTG. Daneben die gereinigte cTex-CTD (E).

**B)** Schematische Darstellung von Tex aus *B. pertussis* (vgl. Abb. 2) und der cTex Konstrukte: cTex(b), cTex, cTex-CTD. Die Zahlen an den Domängengrenzen geben die Position in der Aminosäuresequenz an, der angehängte Affinitätsmarker wurde dabei nicht berücksichtigt.



Für die Überexpression wurde der Leseramen als 2,45 kb *Sall/PstI* Fragment in pQE30 übertragen. Das 5'-Ende des rekombinanten Leserahmens in dem neuen Plasmid

pQEctexSE ist wegen der Sequenz für den „His-tag“ und der Reste der „multiple cloning sites“ aus den Zwischenklonierungen gegenüber der Ausgangssequenz um 30 Codons verlängert.

Nach der Überexpression in LB-Medium lag das Protein in Einschlusskörperchen vor und wurde unter denaturierenden Bedingungen (6M GuHCl) gereinigt und vor der Elution auf der Säule zurückgefaltet. Rekombinantes cTex(b) wurde auch für die Immunisierung eines Kaninchens zur Gewinnung eines Antiserums verwendet. Die Immunisierung wurde von der Firma Charles River in Kisslegg vorgenommen.

Neben dem von Blattner et al. (1997) angenommenen Beginn des *tex*-Leserahmens in *E. coli* kann ein anderer Startpunkt, 34 Codons weiter in 5'-Richtung vorgeschlagen werden. Dieser alternative N-Terminus wird durch den Vergleich mit der Tex-Sequenz aus *B. pertussis* und den Vergleich der entsprechenden Transkriptions- und Translationsstarts unterstützt (s. o.). Daher wurde ein weiterer Überexpressionsklon für ein Histidin-markiertes Fusionsprotein mit diesem Aminoende konstruiert.

Die entsprechende DNA-Sequenz wurde mit den Primern ctexNSph und ctexCKpn als 2,36 kb Fragment von gereinigter  $\lambda$  2F6 DNA amplifiziert und nach *SphI/KpnI* Verdau in pQE32 kloniert. Die Induktion der Überexpression von dem resultierenden Plasmid pQEctexSK aus in 2xYT lieferte cTex als lösliches Protein. Die Reinigung erfolgte daher unter nativen Bedingungen.

Ein aktueller Sequenzvergleich von Tex aus *B. pertussis* gegen die SwissProt Datenbank und die konzeptionell translatierten Sequenzen aus verschiedenen Genomprojekten verstärkt den bereits von Fuchs et al. (1996) geäußerten Eindruck von einem modulartigen Aufbau des Proteins. Insbesondere der C-terminal gelegene Bereich, entsprechend den Aminosäuren 600–791 des Proteins aus *Bordetella pertussis*, erscheint besonders konserviert. Zudem zeigt der Abschnitt von E662-R739 große Ähnlichkeit mit der S1-Domäne vieler RNA-bindender Proteine. Beim Tex-Protein aus *E. coli* entspricht diese putative Domäne den Aminosäuren A582-R773 (A549-E740 nach Blattner).

Für eine gezielte Analyse der Eigenschaften der carboxyterminalen Domäne von Tex (Tex-CTD) wurden die letzten 322 Codons von *tex* aus *E. coli* auf einem 1,18 kb großen *BamHI/PstI*-Fragment aus pSKctexSE isoliert und in pQE31 übertragen ( $\Rightarrow$  pQEctexCTD). Der Bereich für die Überexpression wurde großzügig ausgewählt um die Faltung der CTD nicht durch den geladenen Affinitätsmarker zu beeinflussen. Außerdem sollte so eine sterische Hemmung von Interaktionen des Proteins mit möglichen Bindepartnern (s. u.) vermieden werden. Bei der Überexpression der cTex-CTD in LB-Medium wird das Protein in Einschlusskörperchen verpackt, durch Anzucht der Bakterien und Induktion in 2xYT konnte die cTex-CTD hingegen als lösliches Protein überexprimiert werden. In der löslichen Form des Protein wurde der „His-tag“ aber anscheinend nicht mehr nach außen präsentiert und es war keine Bindung des Proteins an Ni-NTA-Agarose mehr zu beobachten. Das Protein wurde daher denaturiert gereinigt und anschließend auf der Säule renaturiert. Durch die Immobilisierung wird der N-Terminus mit dem „His-tag“ offenbar auf die Oberfläche des Proteins gezwungen und bleibt so auch nach der Renaturierung als Affinitätsmarker erhalten. Wegen des Domänenaufbaus von Tex und dem ausreichenden Abstand des neuen N-Terminus von der S1-Domäne ist ein Einfluss dieser

veränderten Konformation des N-Terminus von cTex-CTD auf das Verhalten der S1-Domäne vermutlich nicht zu erwarten.

In Abb. 10 sind die verschiedenen cTex Konstrukte nach PAGE gezeigt. Zusätzlich werden die Konstrukte und die enthaltenen Domänen schematisch dargestellt.

## Die Bindung von Tex an Nukleinsäuren

### Gelretardationsexperimente

Der hohe Konservierungsgrad der S1-Domäne in allen Tex-Proteinen legt die Vermutung nahe, dass es sich um Nukleinsäure-bindende Proteine handelt. Da S1-Domänen in verschiedenen Proteinen DNA- oder RNA-Wechselwirkungen vermitteln können und in Einzelfällen sogar mit Proteinen oder bestimmten Zuckern interagieren (Bycroft, 1997) ist eine weitergehende Vorhersage jedoch nicht möglich. Nachdem in einem Vorversuch bereits die Bindung von cTex(b) an Heparin-Sepharose gezeigt werden konnte, wurde in Gelretardationsexperimenten („band shift“, EMSA) zunächst die Bindung von cTex(b) an doppelsträngige DNA untersucht. Die verwendete Sonde hat eine Größe von 331 bp und umfasst den gesamten intergenischen Bereich zwischen *greB* und *tex* sowie die ersten 226 bp der für das Tex Protein codierenden Sequenz.

Das Fragment wurde durch PCR mit dem Primern *ctex1523* und *ctex1860R* und dem Plasmid *pSKctexHE* als Matrize gewonnen und anschließend mit *EcoRI* verdaut. Für die radioaktive Markierung wurde 1 µg der verdauten Sonden-DNA in eine Auffüllreaktion mit Klenow-Polymerase und  $^{32}\text{P-}\alpha\text{-dATP}$  sowie  $^{32}\text{P-}\alpha\text{-dTTP}$  eingesetzt und anschließend über eine NucTrap-Säule (Stratagene) gereinigt. Von den ca. 120 µl Eluat wurden später pro Bindeansatz 1,5 µl mit einer Aktivität von rund  $1,0 \times 10^5$  cpm/µl eingesetzt, das entspricht ca. 12,5 ng Sonden-DNA pro Ansatz.

**Abb. 11:** Bindung unterschiedlicher Mengen cTex(b) an seinen eigenen Promoterbereich und Konkurrenz der Bindung mit unmarkierter Heringssperma DNA

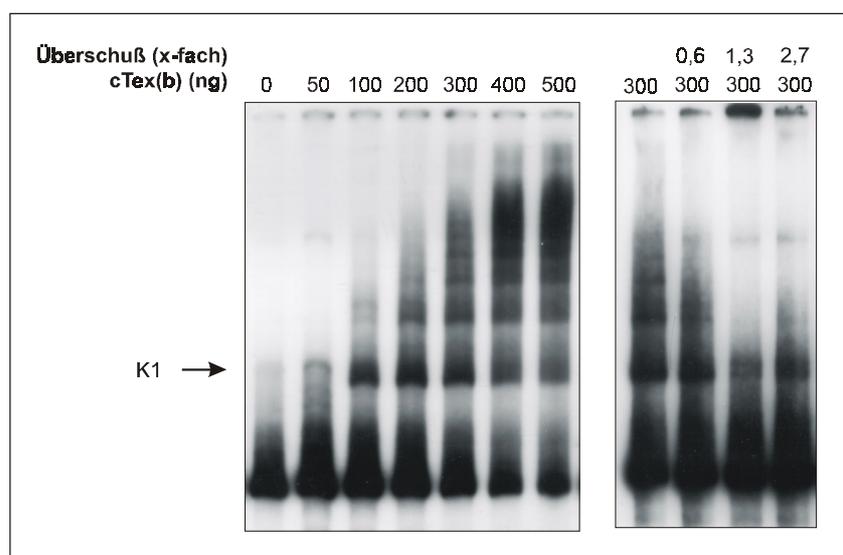


Abbildung 11 zeigt die Autoradiographien zweier repräsentativer Experimente. Bei einer Proteinmenge von 50 ng im Bindeansatz ist deutlich die Bildung eines

Komplexes (K1) von relativ hoher elektrophoretischer Mobilität zu beobachten. Dieser Komplex befindet sich am oberen Rand des „Schmiers“ der freien Sonde. Bei Erhöhung der cTex(b)-Menge kommt es bis 300 ng cTex(b) zunächst zur Steigerung der Intensität dieses ersten Komplexes und gleichzeitig zur Ausbildung weiterer Komplexe mit verringerter Mobilität. Der Abstand der aufeinander folgenden Komplexe zueinander nimmt zum oberen Teil der Spur hin anscheinend exponentiell ab. Das weist auf eine gleichmäßige Erhöhung des Molekulargewichts der Komplexe hin, was durch die Bindung mehrerer cTex(b)-Moleküle pro Sondenmolekül erklärt werden könnte. Bei noch höheren Mengen an cTex(b) (400 ng, 500 ng) ist eine Abnahme von K1 zugunsten der größeren Komplexe zu beobachten. Außerdem nimmt jetzt auch die Menge an ungebundener Sonde deutlich ab.

Bei der Konkurrenz mit unmarkierter Heringssperma-DNA wurde den Bindeansätzen eine konstante Menge von 300 ng cTex(b), 12,5 ng Sonde und zunehmende Mengen an Kompetitor-DNA zugegeben. Hier kommt es bereits bei einem Gewichtsverhältnis von Sonde zu Kompetitor von 3:4 zu einem vollständigen Verlust der höheren Komplexe. Es scheint also keine Präferenz von cTex(b) für DNA aus dem eigenen Promoterbereich im Vergleich zu beliebigen DNA-Sequenzen zu geben. Das Gewichtsverhältnis von Sonde und Kompetitor unterschätzt allerdings wahrscheinlich den Kompetitor-Überschuss, da die Größe der Sonde im oberen Bereich des Größenspektrums der Heringssperma DNA-Fragmente liegt.

Zum Zeitpunkt dieser Versuche standen die Proteine cTex und cTex-CTD noch nicht zu Verfügung.

### **Festphasen-Bindeassays**

Nach den ersten Hinweisen auf eine DNA-Bindeaktivität von Tex aus den Gelretardationsexperimenten (EMSA) wurden in Vergleichsexperimenten die Bindeeigenschaften genauer charakterisiert. Festphasen-Bindeassays bieten im Gegensatz zu Gelretardationsexperimenten und Filter-Bindestudien die Möglichkeit auch die Interaktion zwischen einem Protein und undefinierten Liganden zu untersuchen. Zur Immobilisierung des Proteins und der Protein-Ligand-Komplexe nutzt man, wie schon für die Reinigung, die Bindung zwischen terminal angehängten Histidin-Resten und Ni-NTA-Agarose. Die Ni-NTA-Agarose ist in diesem Fall an magnetische Kügelchen gekoppelt, die, z. B. bei Pufferwechseln, leicht mit einem Magneten vom übrigen Ansatz abgetrennt werden können. Als Bindepartner wurden Präparationen von <sup>3</sup>H-markierter chromosomaler, mit *MspI* gespaltener DNA und gesamt-RNA aus *E. coli* W3110 verwendet.

Für die Bindeansätze wurden jeweils 20 µl Ni-NTA Agarose Magnetkügelchen (Qiagen) nach der Äquilibrierung in Protein-Bindepuffer (PBP) mit 20 µg Protein in 500 µl in PBP abgesättigt und überschüssiges Protein mit 500 µl Bindepuffer (BP) abgewaschen. Anschließend wurden unterschiedliche Mengen an markierter Nukleinsäure in 500 µl BP hinzugegeben. Nach einer halben Stunde Inkubation bei RT auf einem Rollinkubator wurde erneut dreimal mit je 500 µl BP gewaschen und dann mit 100 µl EP eluiert. Die im Eluat enthaltene Radioaktivität wurde im Szintillationszähler gemessen und in die entsprechende Menge markierter DNA oder RNA umgerechnet. Die verwendeten Konzentrationen und die korrespondierenden

Mengen der an die Proteine gebundenen Nukleinsäuren sind im Anhang in Tabellenform aufgeführt.

Beim Auftrag des Verhältnis der Nukleinsäurekonzentration im Ansatz zur gebundenen Nukleinsäuremenge ( $[L]/B$ ) gegen die eingesetzte Ligandenkonzentration ( $[L]$ ) liegen die Werte auf einer Geraden (1), die die Parameter der Langmuirschen Adsorptionsisotherme (2) liefert (Atkins, 1990).

$$\frac{[L]}{B} = [L] \cdot \frac{1}{B_{\max}} + \frac{1}{KB_{\max}} \quad (1)$$

Die Steigung der Geraden entspricht dabei dem Kehrwert der maximal gebundenen Ligandenmenge ( $B_{\max}$ ) und der Y-Achsenabschnitt ist gleich dem Reziproken des Produktes der maximalen Bindung ( $B_{\max}$ ) und der Bindekonstanten ( $K$ ). Der Kehrwert von  $K$  wiederum ist gleich der Konzentration, bei der die halbe maximale Bindung erreicht wird ( $[L]_{50}$ ).

$$\vartheta = \frac{B}{B_{\max}} = \frac{K[L]}{1 + K[L]} \quad (2)$$

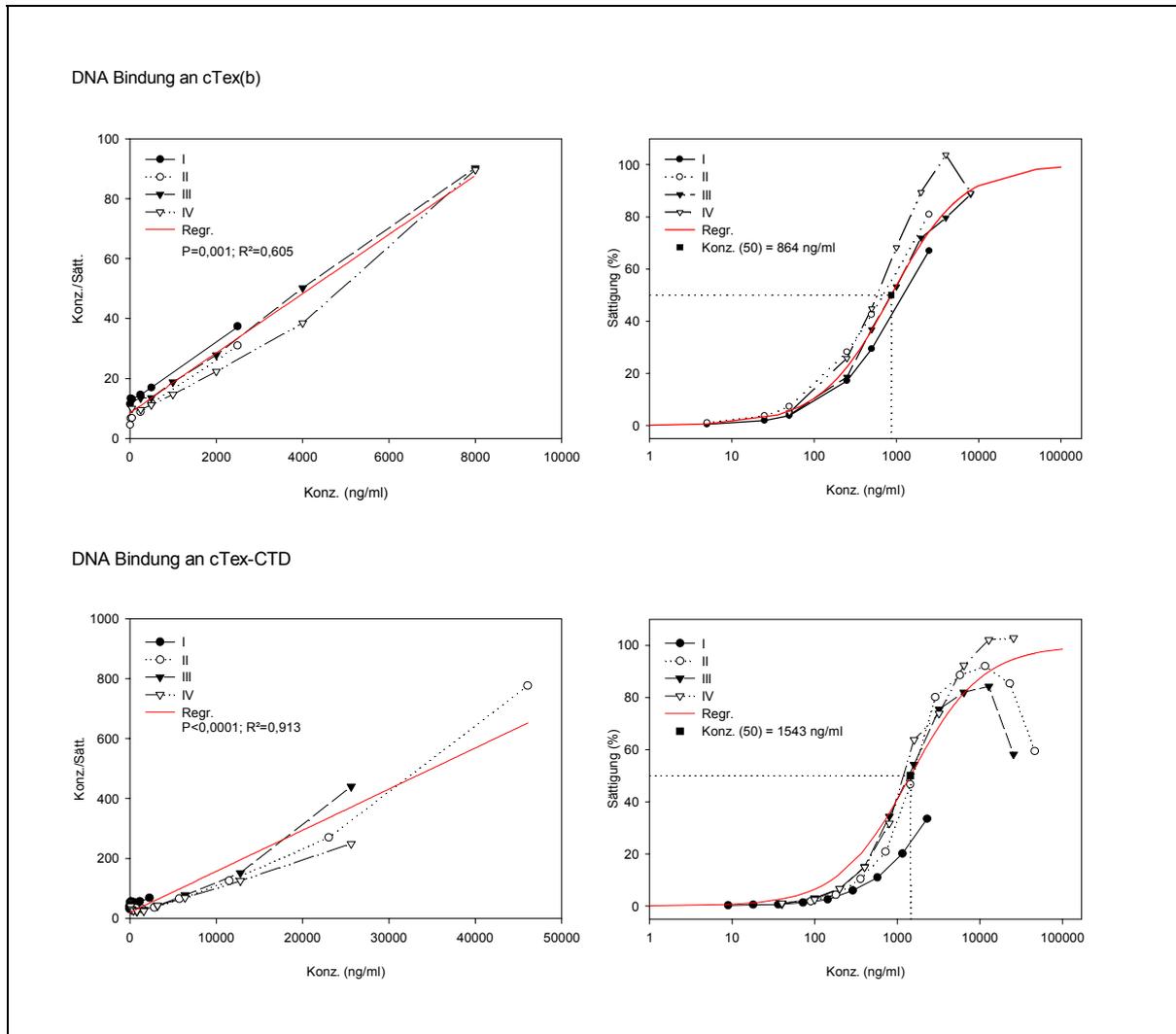
Adsorptionsisothermen beschreiben die Belegung oder Sättigung ( $\vartheta$ , „Theta“) einer bindenden Oberfläche in Abhängigkeit der Ligandenkonzentration  $[L]$ . Die Langmuirsche Adsorptionsisotherme (2) beruht auf der Annahme, dass alle Bindestellen äquivalent sind und die Bindewahrscheinlichkeit nicht von der Belegung der benachbarten Bindestellen abhängt. Es handelt sich also um das einfachste Modell für eine Bindestellen-Liganden-Interaktion.

Die ermittelten Datenreihen wurden einzeln einer Regression gegen die Langmuir-Isotherme unterzogen und anhand des errechneten Bindemaximums ( $B_{\max}$ ) in Sättigungsgrade ( $\vartheta$  in %) umgerechnet. Die so normalisierten Kurven wurden für die jeweilige Kombination von Protein und Nukleinsäure zusammengestellt und einer weiteren Regression gegen die Isotherme unterzogen. Die Parameter der resultierenden Gerade beschreiben das jeweilige System.

Die Konstante  $K$  ist von der Proteinkonzentration in den Bindeansätzen unabhängig, solange die Menge an gebundenem Liganden im Vergleich zu der Gesamtmenge klein ist und somit die Konzentration an freiem Liganden im Ansatz durch die Bindung nicht verändert wird. In der Mehrheit der Ansätze (Median) betrug dieses Verhältnis  $6,2 \times 10^{-4}$ , die Voraussetzung kann somit als erfüllt gelten.

**Abb. 12:** Bindung von *MspI*-gespaltener, chromosomaler DNA aus *E. c.* W3110 an cTex(b) und cTex-CTD.

Dargestellt sind jeweils der Auftrag der normalisierten Messreihen nach Langmuir (links) und die Sättigungskurve. Die Regression wurde anhand des Auftrags nach Langmuir gewonnen.

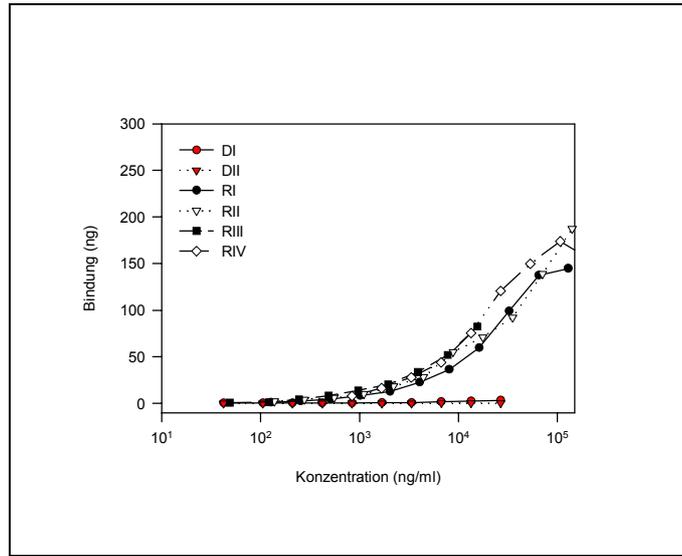


## Bindung der cTex-Konstrukte an DNA

Aufgrund der Befunde aus den Retardationsexperimenten wurden die verschiedenen cTex-Derivate zunächst auf ihre Bindung an DNA untersucht. In Abb. 12 sind für cTex(b) und cTex-CTD die Bindekurven und der Auftrag nach Langmuir dargestellt. Die Unterschiede im Aminoterminus scheinen einen großen Einfluss auf das Bindeverhalten der Proteine zu haben. Die Halbmaximale Bindung von DNA erfolgt bei den beiden Proteine bei 864 ng/ml bzw. 1543 ng/ml und zeigt damit einen deutlichen Unterschied. Für cTex konnte im Vergleich dazu selbst bei rd. 20fach höheren Konzentrationen keine Bindung von DNA über dem Hintergrundniveau festgestellt werden, während vergleichbare RNA Konzentrationen bereits zur Halbsättigung von cTex ausreichen (Abb.13, s. u.)

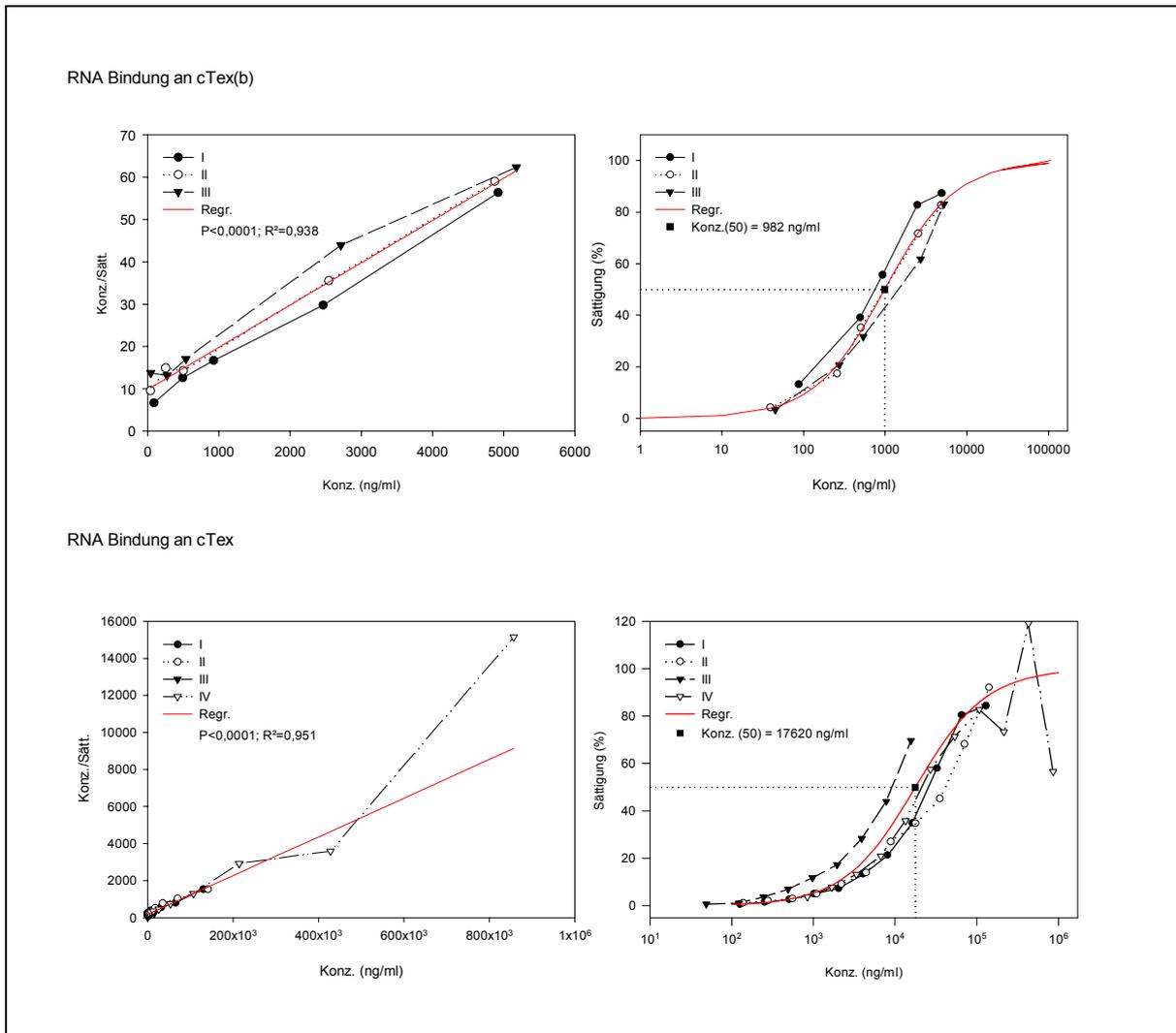
**Abb. 13:** Vergleich der Bindung von RNA und DNA an cTex.

Die Messreihen sind nicht normalisiert, da für DNA keine Bindung an cTex gezeigt werden konnte.



**Abb. 14:** Bindung von gesamt RNA aus *E. c.* W3110 an cTex(b) und cTex-CTD.

Dargestellt sind jeweils der Auftrag der normalisierten Messreihen nach Langmuir (links) und die Sättigungskurve. Die Regression wurde anhand des Auftrags nach Langmuir gewonnen.

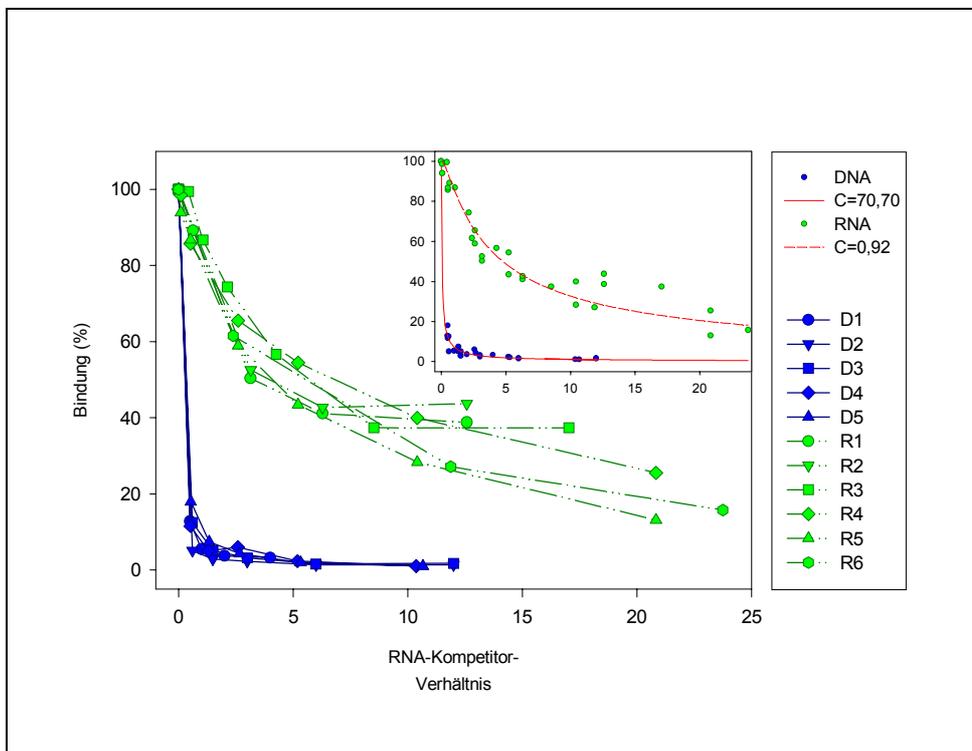


## RNA-Bindung an cTex(b) und cTex

Wegen der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz der C-terminalen Domäne von Tex zur S1-Domäne wurden zusätzlich Bindestudien mit cTex und cTex(b) mit RNA als Bindepartner durchgeführt. Die Abb. 13 und 14 zeigen das Ergebnis dieser Versuche. Anders als bei der Bindung an DNA konnte eine Interaktion von cTex mit RNA eindeutig gezeigt werden. Die Halbmaximale Bindung erfolgt allerdings erst bei 17620 ng/ml, d. h. etwa 18 mal so hohen Ligandenkonzentrationen, wie bei cTex(b) (982 ng/ml).

Die Halbsättigungskonzentrationen von cTex(b) für DNA und RNA sind statistisch (Student's t-Test mit den  $[L]_{50}$  der Einzelexperimente) nicht unterscheidbar. Dieser Spezialfall wurde daher noch gesondert in Konkurrenzexperimenten untersucht.

**Abb. 15:** Konkurrenz der Bindung von gesamt RNA aus *E. c.* W3110 an cTex(b) mit unmarkierter gesamt RNA und *MspI*-gespaltener chromosomaler DNA aus dem selben Stamm. Der eingesetzte Graph zeigt neben der Gesamtheit der Messpunkte die Regressionen wie in der Diskussion erläutert.



### Kompetition der RNA-Bindung an cTex(b)

Neben der Bestimmung von Sättigungskurven bieten Konkurrenzexperimente eine weitere Möglichkeit die Interaktion von Proteinen und Nukleinsäuren zu untersuchen. Dazu wurde den Bindeansätzen neben ca. 500 ng  $^3\text{H}$ -markierter RNA unterschiedliche Mengen an unmarkierter gesamt-RNA oder *MspI* gespaltener, chromosomaler DNA aus *E. c.* W3110 zugegeben. Nach einer halben Stunde Inkubation wurde, wie für die Bindeexperimente beschrieben, dreimal gewaschen und die zurückgehaltene Radioaktivität nach der Elution im Szintillationszähler gemessen. Die messbare Bindung ohne Zugabe von Kompetitor wurde als der Vergleichswert (=100 %) definiert. Abb. 15 zeigt die Ergebnisse mehrerer Experimente. Dass die

Werte der DNA-Kompetitionskurven weniger stark streuen liegt daran, dass die meisten Werte dieser Kurven nur knapp über dem Hintergrund liegen.

Als Kenngröße für die Konkurrenz wurde die Menge an Konkurrent ermittelt, die im Vergleich zu der markierten RNA den Ansätzen zugegeben werden muss um die Menge an messbar gebundener RNA im Vergleich zum nicht kompetierten Ansatz auf die Hälfte zu reduzieren. Bei der Konkurrenz mit unmarkierter RNA wird die Halbierung der messbaren Bindung bei der Zugabe des etwa 4-5fachen an Konkurrent erreicht. Für die Konkurrenz mit DNA kann der Wert jedoch nicht aus den Rohdaten abgelesen werden, da schon die Zugabe des 0,5fachen der <sup>3</sup>H-RNA Menge eine Reduktion der messbaren Bindung auf ca. 12% des Ausgangswertes bewirkt und in den Experimenten keine Bindung bei geringeren Ligand-Konkurrent-Verhältnissen gemessen wurden. Die lineare Interpolation zwischen dem nicht kompetierten Ansatz und der Konkurrenz mit dem 0,5fachen Menge unmarkierter DNA ergibt für die 50 %ige Konkurrenz einen Wert von 0,28. Das entspricht etwa einem 16tel der benötigten RNA-Menge.

### **Anreicherung und Klonierung von Bindesequenzen**

Neben der biochemischen Charakterisierung der Bindeeigenschaften von Tex wurde noch versucht den natürlichen Bindepartner des Proteins zu ermitteln.

Dazu wurden Bindeversuche wie beschrieben jedoch mit 50 µl der Ni-NTA-Magnetkügelchen und 50 µg cTex(b) und 50 µg gesamt-RNA aus *E. c.* W3110 in 1 ml Ansatzvolumen durchgeführt. Die gebundene RNA in 200 µl EP eluiert, durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt und mit EtOH gefällt. Die gesamte so isolierte RNA wurde mithilfe des RT-PCR Kit von Stratagene und dem Primer OL32N6 in cDNA umgeschrieben (Ansatz 1). Zusätzlich wurde zur Kontrolle je ein Ansatz mit 5 µg *E. c.* W3110 RNA (Ansatz 2) und mit der im Kit enthaltenen RNA (Ansatz 3) durchgeführt. 10 µl der 50 µl jedes RT-PCR Ansatzes wurden im Agarosegel betrachtet. Allerdings war außer in den Kontrollansätzen keine cDNA feststellbar. Vom verbliebenen Teil jedes Ansatzes wurde daraufhin 10 µl einer weiteren PCR mit dem Primer OL32 unterzogen, der den konstanten Teil von OL32N6 enthält. Die Reaktionen wurden dann komplett im Agarosegel aufgetrennt.

Dabei ergab sich in allen Ansätzen ein Schmier in einem Laufbereich von ca. 1 kb bis >100 bp. Aus dem Schmier der Ansätze 1 und 2 wurden jeweils zwei Bereiche, von 1 kb bis 350 bp (g) und >350 bp (k), ausgeschnitten und die enthaltene cDNA aus dem Gel eluiert. Die Eluate wurden komplett einer „blunting and kinasing“ Reaktion unterzogen und mit dem „Ready-To-Go™ pUC18 *Sma*I/BAP + Ligase“ Kit von Amersham Pharmacia in pUC18 kloniert und in kompetente *E. c.* DH5α transformiert. Aus 90 der erhaltenen Klone (80 vom Ansatz 1, 10 von Ansatz 2) wurden die Plasmide im kleinen Maßstab präpariert und diese durch Restriktionsverdau mit *Sal*I auf ein Insert hin analysiert. 14 positive Klone enthielten Plasmide mit Inserts von ca. 250-350 bp und das unabhängig davon, mit welchem der unterschiedlichen Ligationsansätze (große oder kleine Fragmente) sie transformiert worden waren. Plasmide mit größeren Inserts konnten bei den isolierten Klonen nicht gefunden werden. Die Inserts aller 14 Plasmide wurden ausgehend vom M13 universal Primer ansequenziert.

Durch eine blast-Analyse der Sequenzen gegen die *E. coli* Genomsequenz ließen sich die Klone in vier Gruppen einordnen: Fünf der Plasmide – 1k1, 1k2, 1k5, 1g1, 1g2 – enthalten cDNA der *csrB* RNA (Accession: AF031251), sechs Plasmide – 1k4, 1k6, 1k7, 1k8, 1k9, 1k10 – enthalten cDNA der 16S rRNA, kodiert von *rrnE* (Accession number: AE000474). Ein Plasmid aus dem Kontrollansatz, 2k1, enthält ein Insert mit Übereinstimmung zum Leseramen eines putativen Proteins der äußeren Membran unterschiedlicher Bakterien, dem jedoch bislang keine Funktion zugeordnet werden konnte. Die übrigen zwei Plasmide – 1k6, 2g3 – enthielten cDNA ohne Entsprechung im *E. coli* Genom.

CsrB ist eine ca. 360 Nukleotide große, nicht-kodierende RNA, die inhibierend an den globalen Regulator CsrB (carbon storage regulator B) bindet und auf diese Weise an der Regulation des Kohlehydratstoffwechsels in *E. coli* beteiligt (Romeo, 1998).

Die Inserts von 1k4, 1k5 und 1k7 enthalten neben den genannten cDNAs auch noch verschiedene zusätzliche Sequenzen, von denen sich jedoch in der blast-Analyse nur Abschnitte von jeweils maximal 20 bp einem Gen zuordnen lassen. Diese kurzen Stücke könnten von kurzen reversen Transkripten stammen, die sich im weiteren Verlauf zufällig komplementär aneinandergelagert haben. In der anschließenden PCR wurden die Lücken dann aufgefüllt, Die Stücke waren dann aber immer noch klein genug um auch selbst als Primer in weiteren Zyklen zu dienen.

Die von *csrB* abgeleiteten Inserts haben auffälligerweise auf beiden Seiten die gleichen Enden. Auf der einen Seite ist es das 5'-Ende der *csrB* RNA. Da sich an diesem Ende keine zum konstanten Teil des Primers OI32N6 komplementären Basenfolgen befinden, kann der Primer hier nur über seinen N<sub>6</sub>-Abschnitt gebunden haben. Am anderen Ende des Inserts folgen dem konstanten Teil des Primers (in 5'-3' Richtung) fünf G/C-Paare. Außerdem lässt sich auch der konstante Teil des Primers selbst mit der *csrB*-Sequenz an 7 der 17 Positionen zur Deckung bringen, davon sind 4 G/C. Drei der Übereinstimmungen (2 G/C) liegen direkt am 3'-Ende des konstanten Teils. Damit ist hier eine vergleichsweise gute Ausgangsposition für die initiale Bindung des Primers an die RNA und damit eine effiziente reverse Transkription gegeben.

Bei den *rrnE*-cDNAs haben in Leserichtung des Gens nur vier der sechs Inserts das gleiche 3'-Ende. Der zum Zufallsteil (N<sub>6</sub>) komplementäre Bereich besteht bei diesen vier Enden aus der Folge <sup>5'</sup>CTGGGG<sup>3'</sup>. Die 3'-Enden der beiden anderen *rrnE*-cDNAs liegen in Leserichtung des Gens 104 bzw. 107 bp weiter stromaufwärts mit sechs (<sup>5'</sup>GGGCCC<sup>3'</sup>) bzw. vier (<sup>5'</sup>CCCTTG<sup>3'</sup>) G/C-Paaren im Bereich des Zufallsteils des Primers. Anders als bei den 3'-Enden der *csrB*-cDNA-Inserts bestehen aber bei keinem der *rrnE*-cDNA 3'-Enden zusätzliche, wesentliche Entsprechungen mit dem konstanten Teil des Primers. Am entgegengesetzten Ende der klonierten *rrnE*-cDNAs sind fünf der sechs Inserts hingegen, bis auf eine Verschiebung von ein oder zwei Nukleotiden, gleich. An der entsprechenden Stelle stimmt die *rrnE*-Sequenz an sechs aufeinander folgenden Basen (4 G/C) mit dem konstanten Teil des Primers überein.

Die Plasmide aus den Kontrollansätzen, 2k1 und 2g3, enthielten keine Inserts, die auch in dem experimentellen Ansatz gefunden wurden. Allerdings konnten leider nur sehr wenige Klone mit Inserts aus dem Kontrollansatz analysiert werden. Somit kann hier keine abschließende Aussage getroffen werden.

## Diskussion

### Verbreitung von *Tex* in anderen Bakterien

Bei den Gram<sup>+</sup> Bakterien (Firmicutes) und den Proteobakterien ist das *Tex* Protein nahezu ubiquitär. Aus den anderen großen Phyla sind bislang noch zu wenige Genome sequenziert, um eine gut gestützte Aussage über die Verbreitung von *Tex* machen zu können. Die weite Verbreitung von *Tex*, auch in nur sehr entfernt verwandten Arten, spricht für einen phylogenetisch frühen Ursprung des Gens. Andererseits konnte es in den Thermotogales, die als stammesgeschichtlich sehr ursprünglich gelten, bislang nicht gefunden werden. Das *tex* Gen könnte dort aber sekundär verloren gegangen sein, wie dies in anderen Phyla anscheinend auch passiert ist. Dass *Tex* in Corynebakterien vorkommt, in den nahe verwandten Mycobacterien jedoch fehlt, spricht für eine solche Möglichkeit. *Tex* fehlt außerdem in den bekanntermaßen reduzierten Genomen einiger Arten aus Gattungen obligater Pathogene und Symbionten (*Campylobacter*, *Helicobacter*, *Mycoplasma*, *Rickettsia*, *Buchnera*). Diese Bakterien sind nur einem sehr begrenzten Spektrum an Umwelteinflüssen ausgesetzt und verfügen im allgemeinen über weniger ausgeprägte regulatorische Netzwerke als z. B. Bakterien der oberen Bodenschichten. Interessanterweise ist *Tex* jedoch in *Ureaplasma urealyticum* aus der Familie der Mycoplasmen konserviert vorhanden. Das legt nahe, dass der Verlust von *tex*, zumindest bei den Mycoplasmen ein vergleichsweise rezentes Ereignis ist. Damit ist zwar ein Trend zum Verlust von *Tex* bei Arten mit reduzierten Genomen zu beobachten, ohne weitere Kenntnisse zur Funktion von *Tex* bleibt die Relevanz dieses Befundes jedoch unklar.

Die *Tex* Proteine sind in Ihrer Aminosäuresequenz bemerkenswert konserviert und in dieser Hinsicht mit essenziellen Proteinen des Grundstoffwechsels vergleichbar. Die besten 25 Treffer einer BLAST Suche (Altschul et al., 1997) mit den Aminosäuresequenzen der RNA-Polymerase  $\alpha$  Untereinheit (RpoA) oder der Polynukleotidphosphorylase (PNPase) aus *E. coli* gegen die NCBI Protein-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) weisen mehrheitlich deutlich weniger identische Positionen auf (RpoA 47 %, PNPase 51 %) als die Mehrheit der bislang gefundenen 37 *Tex* Proteine (55,5 %). Nimmt man die konservativen Austauschungen noch mit hinzu, sind die Werte für die drei Gruppen jedoch ungefähr gleich (*Tex* 69 %, RpoA 67 %, PNPase 68%). Man kann daher vermuten, dass *Tex* in den verschiedenen Organismen auch funktionell konserviert ist.

Die Umgebung von *tex* in den verschiedenen Genomen ist sehr unterschiedlich. Zwar liegt *tex* bei einigen  $\gamma$  Proteobakterien in enger Nachbarschaft zu *greB* und/oder *ompR-envZ*, doch ist die Anordnung im Detail deutlich verschieden und in dieser Form auch nicht allgemein in dieser Gruppe anzutreffen. In *Neisseria meningitidis* und *N. gonorrhoeae* findet sich *tex* als sog. Region E innerhalb des Kapsellocus, allerdings jeweils in der Nachbarschaft unterschiedlicher Gene. Die Organisation des Kapsellocus in Neisserien wurde von Petering und Koautoren (1996) genauer untersucht. Sie stellten dabei einerseits den Verlust und andererseits die Umordnung verschiedener Gruppen von Genen im Verlauf der Phylogenie der beiden Arten fest. Währenddessen blieb die Region E jedoch an ihrer relativen Position erhalten. Das könnte auf

einen besonderen Selektionsdruck für den Erhalt der Region E in Neisserien hindeuten. Deletionsmutanten in *N. meningitidis* zeigten in Kultur jedoch keinen vom WT abweichenden Phänotyp (Petering et al., 1996). Für eine Beteiligung der Region E z. B. an der Regulation der Kapselexpression in Neisserien gibt es ebenfalls keine eindeutigen Hinweise. Bei der heterologen Expression der Neisserien-Kapsel in *E. coli* hingegen, war die Kapselproduktion reduziert, wenn mit den verschiedenen Kapselgenen nicht auch die Region E übertragen wurde. *tex* scheint also, zumindest innerhalb der Proteobakterien, keine konservierten Nachbarn zu haben, die den Verdacht einer gemeinsamen Regulation und Funktion nahe legen würden.

In *Bacillus subtilis* und *Treponema pallidum* wiederum liegt *tex* am Rande bzw. zwischen den Genen für verschiedene tRNAs. Eine solche Position konnte verschiedentlich mit dem Erwerb der entsprechenden Sequenzen durch horizontalen Gentransfer in Verbindung gebracht werden (vgl. Pathogenitätsinseln in *E. coli* oder *Salmonella*), für *tex* gibt es dazu aber bislang keine Erkenntnisse.

Bei Archaeen und Eukaryonten sind bisher keine Proteine gefunden worden, die in vergleichbarem Ausmaß wie bei den Eubakterien über ihre gesamte Sequenz zu *Tex* verwandt erscheinen. *Tex* könnte somit eventuell als Angriffspunkt für neue Antibiotika dienen. Erkenntnisse über die Bedeutung und Funktion von *Tex* innerhalb der Bakterienzelle und damit zum Grund für die Konservierung des Proteins könnten dafür die Grundlage liefern.

### **Deletion von *tex* in *E. coli***

Das Ausmaß der Konservierung der Aminosäuresequenz von *Tex* und seine weite Verbreitung deuten auf eine wichtige Funktion des Proteins hin. In *Bordetella pertussis* ist *tex* unter Laborbedingungen essenziell und kann auch nicht überexprimiert werden (Fuchs, 1996). Andererseits konnte für Deletionsmutanten in *Neisseria meningitidis* und *Streptococcus pneumoniae* kein vom WT abweichender Phänotyp beschrieben werden (Petering et al. 1996; A. de Saizieu, Hoffmann-La Roche AG, Basel, pers. Mitteilung). Auch in *E. coli* wurden im Rahmen dieser Arbeit keine Unterschiede zwischen dem Ausgangsstamm und der *tex* Mutante gefunden. Die Fitness, d. h. die Überlebensfähigkeit und Wachstumsgeschwindigkeit von *E. coli* in Voll- und Minimalmedium oder unter verschiedenen Stressbedingungen (Säure, Salz, Sauerstoffradikale) wird anscheinend nicht von *Tex* beeinflusst.

Während des Wachstums in Vollmedium bei 37 ° C oder nach Kälteschock wird *Tex* in *E. coli* anscheinend nur in geringen Mengen exprimiert und konnte in Proteinextrakten aus Zellen aus verschiedenen Wachstumsphasen ausschließlich mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht werden. Das steht in Einklang mit einer kürzlich veröffentlichten Analyse des löslichen Anteils des Proteoms exponentiell wachsender *E. coli* Zellen. Fountoulakis und Koautoren (1999) beschreiben darin die Anreicherung verschiedener gering exprimierter Proteine durch Hydroxyapatit-Chromatographie und die anschließende Auftrennung und Identifizierung durch 2D-PAGE und MALDI-MS (matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry). *Tex* konnte hier nur nach der chromatographischen Anreicherung im 2D-PAGE sichtbar gemacht werden, obwohl als Vergleich auch 1,5 mg der gesamten löslichen Proteine aufgetrennt wurden. Das entspricht der 30fachen Menge, die für diese Arbeit in

2D-Gelelektrophoresen, gemäß üblicher Protokolle, eingesetzt wurde. Die geringe Expression von Tex steht im Einklang mit einer möglichen Funktion innerhalb regulatorischer Netzwerke, wie sie für das Protein in *Bordetella pertussis* angenommen wurde (Fuchs, 1996). Der Lac-Repressor liegt, zum Vergleich, bloß in ca. 10 Exemplaren pro Zelle vor (Müller-Hill, 1998). Wegen dieser technischen Limitierung kann eine Induktion von Tex während der Kälteschockantwort bislang nicht ausgeschlossen werden. Die Möglichkeit ist besonders deshalb interessant, weil ein anderes Gen, das im Rahmen der selben Studie wie *tex* gefunden wurde, für das Kälteschockprotein A (CspA) von *Bordetella pertussis* kodiert (Accession number: AJ009835; T. M. Fuchs, unveröffentlicht). Im Gegensatz zu *tex* bewirkt eine geringe Erhöhung der Gendosis von *cspA* in *B. pertussis* den Verlust der Toxinexpression nicht nur in verschiedenen Suppressor-Stämmen für die Effekte der Überexpression von RpoA sondern auch im Wildtyp Tohama I (Fuchs, 1996). Es ist jedoch nicht bekannt, ob *B. pertussis* in der Lage ist, eine Kälteschockantwort, die der von *E. coli* entspräche, zu exprimieren. Andererseits sind Kälteschockproteine, wie in der Einleitung erwähnt, nicht zwangsläufig an der Kälteschockantwort beteiligt, sondern übernehmen auch Aufgaben bei der Adaptation an andere Stressfaktoren wie z. B. Nährstoffmangel (Yamanaka et al., 1998). Auch die Funktion von CspA selbst ist anscheinend nicht auf die Phase nach dem Wechsel zu tiefen Temperaturen beschränkt. Insbesondere in der frühen exponentiellen Wachstumsphase wird *cspA* in *E. coli* fast ebenso stark exprimiert und bleibt als Protein auch später nachweisbar (Brandi et al., 1999).

### Transkription von *tex* in *E. coli*

Wie schon für *Bordetella pertussis* beschrieben (Fuchs, 1996), wird *tex* in *E. coli* offenbar als monocistronische mRNA transkribiert. Das oberhalb gelegene Gen *greB* und auch *tex* selbst verfügen, laut der Computeranalyse, über eigene  $\rho$ - (Rho-) unabhängigen Terminatoren (s. Sequenz im Anhang). Oberhalb der kodierenden Sequenz von *tex* finden sich ausgeprägte Übereinstimmungen zu verschiedenen Promoter Konsensussequenzen. Die Anordnung der Gene des *tex*-Locus anderer Proteobakterien (s. o., Abb. 5) unterstützt die Annahme einer von den umgebenden Genen unabhängigen Transkription zusätzlich. Anhand der Ähnlichkeit des Bereichs oberhalb der kodierenden Sequenz von *tex* zu bekannten Promotoren lässt sich jedoch nicht vorhersagen, unter welchen Wachstumsbedingungen *tex* transkribiert wird. Der  $\sigma^{70}$  Konsensus deutet auf eine konstitutive Expression hin. Dennoch war es, wie zuvor schon in *B. pertussis* (T. M. Fuchs, unveröffentlicht), nicht möglich mit Hilfe einer „primer extension“ mit RNA exponentiell wachsender Zellen experimentell den Transkriptionsstart zu bestimmen. Damit bleibt zunächst auch unklar, welcher der beiden postulierten Translationsstarts authentisch ist. Diese Frage konnte kürzlich durch massenspektrometrische Analyse des Proteins geklärt werden. Im Rahmen einer Untersuchung der löslichen Proteine von exponentiell wachsenden *E. coli* Zellen, wurde Tex durch MALDI-MS identifiziert und dem oberen der möglichen Translationsstartpunkte zugeordnet (YhgF, AC: P46837) (Fountoulakis et al., 1999). Das Protein konnte jedoch erst nach starker chromatographischer Anreicherung in 2D-PAGE Gelen sichtbar gemacht werden.

Die sehr geringen Expression von *tex* in der exponentiellen Wachstumsphase ist vermutlich auch der Grund für das negative Ergebnis der „primer extension“. Wegen

der Übereinstimmungen mit dem  $\sigma^S$ - ( $\sigma^{38}$ -) Konsensus könnte es sein, dass *tex* in der späten Wachstumsphase oder unter Stress von Bedeutung ist und dann stärker exprimiert wird. Die Wachstumsexperimente mit der Deletionsmutanten ergaben dafür jedoch keinen Hinweis.

Die geringe Transkriptionsrate von *tex* steht scheinbar im Gegensatz zum Ausmaß der Übereinstimmung des Bereichs oberhalb der kodierenden Sequenz mit den Promoter Konsensussequenzen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Transkription von *tex* zusätzlich durch weitere Elemente, wie Repressoren, beeinflusst wird. Außerdem könnte auch eine geringe Stabilität der *tex* mRNA eine erfolgreiche Detektion und Analyse der Transkripte verhindern. In diesem Fall wäre es denkbar, dass sich, nach dem Wechsel zu Wachstumsbedingungen, bei denen Tex vermehrt benötigt wird, die Halbwertszeit der mRNA deutlich verlängert. Für das Kälteschockprotein CspA von *E. coli* ist diese Form der Regulation der Expression beschrieben: Bei 37 ° C hat die *csp* mRNA eine Halbwertszeit von weniger als 10 Sekunden, ist unter Kälteschockbedingungen aber stabil. Die Aktivität des Promoters hingegen ändert sich dabei im Vergleich nur unwesentlich (Goldenberg *et al.*, 1996; Goldenberg *et al.*, 1997).

## Bindung von Tex aus *E. coli* an Nukleinsäuren

Tex hat in beiden terminalen Domänen Ähnlichkeit zu Nukleinsäure-bindenden Proteinen. Insbesondere die Interaktion von S1-Proteinen mit RNA und DNA ist bereits vielfach untersucht worden (Boni *et al.*, 1991; Kalapos *et al.*, 1997; Mogridge & Greenblatt, 1998; Moll *et al.*, 1998; Ravi & Suryanarayana, 1994; Ringquist *et al.*, 1995; Shteyman-Kotler & Schuster, 2000; Sugita *et al.*, 2000; Yamit-Hezi *et al.*, 1997), die Bindung des Mannitol-Repressor an DNA hingegen wurde lediglich indirekt gezeigt (Figge *et al.*, 1994). Es erschien daher wahrscheinlich dass Tex ein Nukleinsäure-bindendes Protein ist und die Bindeaktivität in der C-terminalen Domäne lokalisiert ist. Die C-terminale Domäne von Tex ist bei neutralem pH stark positiv geladen (pI=10,67, s. Abb. 2) und unterscheidet sich damit deutlich von anderen, RNA-bindenden S1-Domänen, die meist einen isoelektrischen Punkt im sauren Bereich (pH<6) aufweisen. Die beiden Kälteschockproteine CspF und CspH wurden hingegen, wegen ihrer im basischen Bereich liegenden Isoelektrischen Punkte (pI=9,51 bzw. 10,28), mit der Bindung von DNA in Verbindung gebracht (Yamanaka *et al.*, 1998).

Die meisten methodischen Ansätze, mit denen solche Interaktionen sensitiv betrachtet werden können, sind jedoch daraufhin ausgelegt, dass eine DNA- oder RNA Zielsequenz bekannt ist und gegebenenfalls unbekannte Bindeproteine aufgefunden werden können.

In Gelretardationsexperimenten ist cTex(b) offensichtlich in der Lage an doppelsträngige DNA aus dem Promoterbereich des *tex* Gens zu binden. Je nach Ansatz sind 5-6 verschiedene Komplexe mit unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität sichtbar. Die Bindung erfolgt anscheinend weitgehend unspezifisch, denn in der Sequenz der Sonde ist eine der Anzahl der Komplexe entsprechende Anzahl an Wiederholungen eines DNA-Motivs nicht zu finden. Die deutliche Kompetition der Komplexe mit geringerer elektrophoretischer Mobilität, schon durch einen minimalen Überschuss an Heringssperma DNA, deutet ebenfalls auf eine unspezifische Bindung

der Proteine hin. Dies Ergebnis stimmt einerseits mit der geringen Sequenzspezifität von S1-Proteinen überein (Boni et al., 1991; Zhang & Deutscher, 1992). Die geringe Spezifität könnte andererseits aber auch daran liegen, dass die verwendete Sonde keine natürliche Bindestelle für Tex enthält. Diese Frage könnte eventuell durch den Vergleich der Bindung von Tex an verschiedene Sonden beantwortet werden. Die Chance, dabei zufällig eine spezifische Bindestelle zu finden, ist jedoch gering. Daher wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

Die Bindung von cTex(b) an DNA konnte ebenso in Festphasen-Bindeassays gezeigt werden. Festphasen-Bindeassays bieten im Vergleich zu Gelretardationsexperimenten den Vorteil, dass neben spezifischen Wechselwirkungen auch die Interaktion eines Proteins mit einem komplexen Gemisch von markierten Nukleinsäuren betrachtet werden kann. Die Bindung von cTex(b) an chromosomale DNA und gesamt-RNA erreicht ihre Halbsättigung etwa bei der gleichen Konzentration der jeweiligen Nukleinsäure (864 ng DNA/ml, 982 ng RNA/ml). Das deutet wegen des unterschiedlichen Molekulargewichts der Fragmente (dsDNA vs. RNA) auf eine ungefähr doppelt so große Affinität von cTex(b) für DNA als für RNA hin. Die Bindung von cTex(b) an DNA scheint vollständig promiskuitiv zu sein. Beim Erreichen der halbmaximalen Bindung werden fast 40 % der im Ansatz vorhandenen DNA gebunden. Im Vergleich dazu sind es nur etwa 12 % der vorhandenen RNA. Falls diese Bindung spezifisch wäre, müsste es sich bei dem RNA-Liganden um eine der ribosomalen RNAs handeln, da nur diese in ausreichender Abundanz vorhanden sind. Das Ergebnis entspricht somit denen der Gelretardationsexperimente.

Zur Konkurrenz der RNA-Bindung an cTex(b) auf 50 % des Ausgangswertes ist entsprechend der graphischen Auswertung der Rohdaten rund 16 mal mehr RNA als DNA notwendig. Der Faktor unterschätzt wahrscheinlich den tatsächlichen Unterschied, da die lineare Interpolation zwischen den Messpunkten ignoriert, dass der markierte Bindepartner nicht nur ausverdünnt wird, sondern mit der gesteigerten Menge an Nukleinsäure im Ansatz auch der Sättigungsgrad des Proteins zunimmt.

In einfacher Annäherung lässt sich die Bindung von RNA oder DNA an Tex als exponentielle Sättigung beschreiben. Daraus ergibt sich dann, dass die Bindung proportional zum Logarithmus der Gesamtmenge an Bindepartnern zunimmt. Gleichzeitig ist aber bei der Konkurrenz nur der markierte Anteil der Nukleinsäuren im Eluat messbar. Daraus ergibt sich für die Beschreibung der Konkurrenzkurven:

$$\frac{B}{B_0} = \left( 1 + \ln \left( 1 + \frac{U}{M} \right) \right) \cdot \frac{1}{1 + \frac{U}{M}}$$

Dabei ist  $B_0$  die ohne Konkurrenz gebundene Menge des Liganden und  $B$  der jeweilige, nach der Konkurrenz bestimmte Wert.  $U$  und  $M$  sind die Mengen an unmarkiertem bzw. markiertem Bindepartner. Der Term  $(1+U/M)$  entspricht der im Ansatz enthaltene Menge an Nukleinsäuren im Vergleich zum Ansatz ohne Konkurrent.

Hat das Protein unterschiedliche Affinität für die beiden Anteile ( $M$  und  $U$ ) wird eine weitere Konstante  $C$  notwendig, die das Verhältnis der Affinitäten beschreibt.

$$C = \frac{c_U}{c_M}$$

Bei  $C=1$  binden der markierte Ligand und der Kompetitor gleich gut. Das sollte bei der Konkurrenz der Bindung mit dem gleichen Bindepartner in seiner unmarkierten Form gelten. Ersetzt man zusätzlich das Verhältnis von markiertem und unmarkiertem Bindepartner durch den Überschuss an Kompetitor  $\bar{U}$ , ergibt sich:

$$\frac{B}{B_0} = (1 + \ln(1 + C\bar{U})) \cdot \frac{1}{1 + C\bar{U}}$$

In Abb. 15 sind in dem eingesetzten Graphen die Kurven für  $C=70,70$  und  $C=0,92$  dargestellt, die sich aus der Regression der experimentellen Werte gegen das beschriebene Modell ergeben. Die Kurven ergeben als Halbhemmungskonzentrationen den 0,06- und 4,74fachen Überschuss an unmarkierter DNA bzw. RNA. Dies bedeutete eine ungefähr um den Faktor 80 effizientere Konkurrenz der RNA-Bindung mit DNA als mit RNA. Demnach sollte die Bindung von DNA an cTex(b) ebenfalls deutlich effizienter sein, als die an RNA. Die Ursache für die, in dieser Hinsicht widersprüchlichen Ergebnisse aus den Bindeassays und den Konkurrenzexperimenten, konnte jedoch nicht gefunden werden. Ein Problem bei der Interpretation der Daten beruht darauf, dass nicht bekannt ist welche Anteile der jeweiligen unmarkierten Nukleinsäuren tatsächlich zur Konkurrenz beitragen. Es wäre daher wichtig den oder die natürlichen Liganden der Tex Proteine zu identifizieren um Affinität und Spezifität der Bindung umfassend bestimmen zu können.

Die Unterschiede des Bindeverhaltens zwischen cTex(b) und cTex sind erstaunlich. Die Aminosäuresequenzen der beiden Proteine sind bis auf den verkürzten Aminoterminus von cTex(b) identisch. Dennoch konnte für cTex keine Bindung an DNA festgestellt werden. Gleichzeitig ist die Halbsättigungskonzentration für die Bindung von RNA an cTex etwa 18 mal so hoch wie für die kürzere Form des Proteins. Damit einher geht, dass cTex bei seiner Halbsättigung einen etwa um den Faktor 30 geringeren Anteil der im Ansatz insgesamt vorhandenen RNA gebunden hat als cTex(b). Somit könnte die scheinbar geringe Affinität auch durch eine höhere Spezifität von cTex hervorgerufen sein. Wie schon in Bezug auf die Konkurrenzexperimente angesprochen, ist es unmöglich bei den beobachteten Unterschieden zwischen Affinitäts- und Spezifitäts-Effekten zu unterscheiden, solange nicht der natürliche Ligand von Tex bekannt ist.

Die Bindeeigenschaften der cTex-CTD an DNA entsprechen in ihrer Größenordnung eher denen von cTex(b) als von cTex. Damit stehen die beiden N-terminal verkürzten dem, bis auf den Affinitätsmarker, natürlichen Protein gegenüber. Es wäre jedoch voreilig die unterschiedliche Bindeaffinität der beiden Gruppen möglicherweise allein auf eine spezifitätsregulierende Funktion des Aminoendes von cTex zurückzuführen. Ein Vergleich der Eigenschaften von denaturiert und nativ gereinigtem cTex könnten Hinweise auf den Einfluss der Präparationstechnik auf die Interaktion geben. Es wäre denkbar, dass Unterschiede in der Konformation des C-Terminus, bedingt durch die De- und Renaturierung die Zugänglichkeit der Bindestelle von cTex(b) und der cTex-

CTD erhöhen und damit gleichzeitig die Restriktion der Bindung, z. B. in Hinsicht auf bestimmte Sekundärstrukturen von RNA-Liganden, herabsetzen. Die Bindeaktivität der cTex-CTD zeigt, dass die Bindung von Tex an Nukleinsäuren tatsächlich durch die S1-Domäne und nicht durch die N-terminale Mannitol-Repressor-Domäne vermittelt wird. Aufgrund der Daten für cTex scheint es zudem gerechtfertigt Tex, in Übereinstimmung mit der Mehrheit der anderen S1-Proteine, als RNA-bindendes Protein zu bezeichnen.

### **Anreicherung und Klonierung von Bindesequenzen**

Wenn die geringe Expression von *tex*, wie sie im 2D-PAGE gezeigt wurde (Fountoulakis et al., 1999), durch die Funktion des Proteins begründet ist, z. B. als Bindeprotein für bestimmte RNAs, und nicht durch die fehlende Induktion unter den untersuchten Bedingungen, sollte man für Tex eine hoch spezifische Bindung an seinen/seine Interaktionspartner erwarten.

Generell ist die S1-Domäne vor allem in Proteinen mit eher geringer Sequenzspezifität zu finden (Bycroft et al., 1997). Für das S1 Protein von *E. coli* wurde hingegen schon eine Reihe unterschiedlicher mehr oder weniger spezifischer Interaktionen mit Nukleinsäuren veröffentlicht. Vermutlich bedingt durch die Existenz mehrerer S1-Domänen innerhalb des Proteins, scheint das S1 (mindestens) zwei Nukleinsäure-Bindestellen mit unterschiedlich ausgeprägter Affinität zu bestimmten Homopolymeren und Präferenz für RNA bzw. DNA zu haben (Draper & von Hippel, 1978a; Draper & von Hippel, 1978b; Suryanarayana & Subramanian, 1984). Ferner wurden spezifische RNA-Liganden zu S1 isoliert (Ringquist et al., 1995) und die spezifische Bindung von S1 an die *boxA* RNA des Phagen  $\lambda$  (Mogridge & Greenblatt, 1998) gezeigt. Die Sequenzen von BoxA und den durch SELEX generierten Liganden weisen jedoch keine Ähnlichkeit zueinander auf, wodurch die Spezifität der Bindung anscheinend relativiert wird. Schließlich wurde auch noch eine Funktion von S1 als poly(A) Bindeprotein (Kalapos et al., 1997) und als Autoregulator, vermutlich durch Bindung an die Translationsinitiationsregion der eigenen mRNA (Boni et al., 2000) berichtet. Darüber hinaus bindet der N-Terminus von S1 mit seinen zwei weniger konservierten S1-Domänen an das Ribosom (Walleczek et al., 1990). Die Vielzahl der unterschiedlichen Aktivitäten, die zum Teil unterschiedlichen Regionen des S1 Proteins zugeschrieben werden konnten, unterstreichen die Vielseitigkeit der durch S1-Domänen vermittelten Interaktionen.

Aufgrund ihrer Bindung an cTex(b) konnten in dieser Arbeit drei unterschiedliche cDNAs kloniert werden, aber nur zwei davon mehrfach. Die geringe Anzahl verschiedener Sequenzen deutet zunächst auf die spezifische Anreicherung dieser Sequenzen vor der Klonierung hin. Die Anzahl der analysierten Klone ist allerdings zu klein, um statistisch abgesicherte Aussagen darüber machen zu können. Außerdem wäre es sinnvoll die Sequenzen in Bindeversuchen mit und ohne Konkurrenz einzusetzen und mit den bisherigen Daten für RNA- und DNA-Gesamtpräparationen zu vergleichen. Die klonierten Sequenzen selbst geben jedoch Hinweise zu ihrer Authentizität.

Die CsrB RNA wirkt als Antagonist der Bindung des globalen Regulators CsrA an verschiedene mRNAs (Liu et al., 1997; Liu & Romeo, 1997). CsrB ist 360 nt groß und

enthält 18 Bindestellen für CsrA und bewirkt durch Konkurrenz mit den verschiedenen Ziel-mRNAs um freies CsrA die Regulation der Aktivität des Proteins. CsrA (carbon storage regulator A) ist in *E. coli* an der Regulation des Kohlenstoff-Stoffwechsels beteiligt und reprimiert die Gluconeogenese, Glycogen-Biosynthese und den Glycogen Katabolismus durch Bindung verschiedener mRNAs im Bereich ihrer Ribosomenbindestelle. Gleichzeitig aktiviert CsrA die Glycolyse, der Mechanismus ist allerdings noch unklar (Romeo, 1998; Wei *et al.*, 2000). Homologe Regulatorpaare in *Erwinia carotovora* (RsmA/RsmB) und *Salmonella typhimurium* (CsrA/CsrB), sind in den beiden Arten an der Regulation des Sekundärmetabolismus und der Virulenz beteiligt (Altier *et al.*, 2000; Cui *et al.*, 1999). Die Sequenz von CsrB und RsmB ist, bis auf die Bindestellen für CsrA bzw. RsmB, nur schwach konserviert (Liu *et al.*, 1997). Der PrrB RNA aus *Pseudomonas fluorescens* wird ebenfalls eine zu RsmB homologe Funktion in der Regulation des Sekundärmetabolismus zugeschrieben, die RNA zeigt in der Sequenz jedoch kaum Ähnlichkeit (Aarons *et al.*, 2000). Die Aminosäureabfolge von CsrA ist hingegen deutlich stärker konserviert und ein TBLAST gegen die zugänglichen Genomsequenzen findet Homologe im gesamten Reich der Eubakterien. In *Bordetella pertussis* konnte bislang jedoch kein entsprechender Leserahmen gefunden werden, obwohl die Sequenzierung des Genoms weitgehend abgeschlossen ist (<http://www.sanger.ac.uk/Projects/Microbes/>). Die Existenz eines CsrB-Homologen in *B. pertussis* als Interaktionspartner von Tex erscheint damit unwahrscheinlich kann aber zur Zeit, insbesondere für andere Arten, nicht ausgeschlossen werden.

Die ausgeprägte Komplementarität zwischen CsrB und dem konstanten Teil des für die reverse Transkription der durch die Bindung an cTex(b) angereicherten RNAs verwendeten Primers, macht zudem die Isolierung der cDNA über das Maß ihrer Repräsentation in der Ausgangslösung hinaus wahrscheinlich. Der Befund, dass alle isolierten CsrB cDNAs exakt die gleichen Enden aufweisen spricht für diese Annahme. Die 16S rRNA ist dagegen anscheinend wegen ihrer Abundanz innerhalb der gesamten gebundenen RNA und nicht aufgrund einer Komplementarität zum konstanten Teil des verwendeten Primers revers transkribiert worden. Andererseits scheinen die resultierenden cDNAs bei der anschließenden PCR, durch verstärkte Bindung des Primers an den G/C-reichen Enden, kinetisch bevorzugt gewesen zu sein. In der Literatur konnten keinerlei Hinweise auf regulatorische, spezifisch an rRNA bindende Proteine in gefunden werden. Somit kann auch die Bindung der 16S rRNA an Tex nicht rational nachvollzogen oder erklärt werden.

Die Bindeversuche mit radioaktiv markierter gesamt-RNA haben gezeigt, dass nach drei Waschschrritten alle ungebundene RNA aus den Ansätzen entfernt ist. Die Isolierung der cDNAs von CsrB und der 16S rRNA sind demnach tatsächlich auf die vorherige Bindung an cTex(b) zurückzuführen. Dennoch bleibt unklar, ob es sich bei den beiden RNAs um authentische Bindepartner von Tex handelt. Mit der reversen Transkription und der anschließenden Amplifikation der cDNAs durch PCR, sind der Klonierung der Liganden zwei Arbeitsschritte vorangestellt, die gegenüber der Kinetik der Bindung von Primern an ihre Matrize ausgesprochen empfindlich sind und daher besonders anfällig für experimentelle Artefakte erscheinen. Der Vergleich der Bindeeigenschaften von cTex und cTex(b) wirft zusätzlich, wie schon angesprochen, die Frage nach der Selektivität der RNA-Bindung an cTex(b) auf, die zu jetzigen Zeitpunkt noch nicht geklärt werden konnte.

## Material und Methoden

### Geräte

Elektrophoresekammern	Institutseigene Mechanikwerkstatt, Pharmacia, Bio-Rad
Filme	Amersham Hyperfilm-ECL, Fuji RX-Röntgenfilme
Klett-Photometer	Summerson
Netzgeräte	Bio-Rad 1000/500, Bio-Rad Power PAC 300
pH-Meter	WTW pH 523, Methrohm-Herisau
Photometer	Zeiss PM 6, Pharmacia Gene Quant
Pipetten	Gilson
Szintillationszähler	Beckmann
Thermocycler	bio-med Thermocycler 60
Tischzentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5415C, Heraeus Sepatech Biofuge 15
Ultraschaller	Branson Sonic Power Comp., Sonifier B12
Waagen	Sartorius 2403, Sartorius Feinwaagen
Zentrifugen	Beckmann J-21B, Beckmann J2-21 (mit JA-10, JA-14 und JA-20 Festwinkelrotoren), Heraeus Minifuge 2

### Chemikalien, Enzyme und Fertigsätze ("Kits")

Falls nicht gesondert vermerkt, wurden alle benutzten Chemikalien und Antibiotika von Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Fluka (Neu-Ulm) oder Roth (Karlsruhe) bezogen. Nährmedien und Agarose stammten von Difco (Augsburg), Gibco-BRL (Berlin) oder Merck (Darmstadt). Radioaktiv markierte Nukleotide für die Markierung von Sonden sowie gesamt DNA und RNA wurden von Amersham (Darmstadt) und ICN geliefert. Restriktionsendonucleasen, DNA-modifizierende Enzyme und DNA-Ligase wurden von Pharmacia (Freiburg), Stratagene (Heidelberg), Gibco-BRL (Berlin), New England Biolabs (Schwalbach) oder Boehringer (Mannheim) bezogen. *Taq*- und *Pfu*-DNA-Polymerase bzw. DeepVENT™-Polymerase für die PCR stammten von Eurogentech (Seraing, Belgien), MWG (Ebersberg), Promega (Madison, Wisconsin, USA), Stratagene oder New England Biolabs. Fertigsätze ("Kits") wurden von Macherey-Nagel (Düren) (Nucleobond AX PC-100), Qiagen (QIAquick Spin Columns), Pharmacia (Sure Clone Kit, Ready-To-Go DNA-Labeling Kit (-dCTP)), Stratagene (Nucltrap Push Columns) und Amersham (ECL direct nucleic acid labelling and detection Kit) bezogen.

### Bakterienstämme

Stamm	Phänotyp/Genotyp	Herkunft
<i>B. bronchiseptica</i> 7865	Wildtyp-Stamm	Arico und Rapuoli, 1987
<i>B. pertussis</i> TI ΔTox	TI-Derivat, das <i>ptx</i> -Operon ist vollständig durch eine Kn-Resistenzkassette ersetzt	I.R.I.S., Siena Pizza et al., 1989
<i>E. coli</i> DH5α	F <sup>-</sup> , <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> , Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, <i>thi-1</i> , <i>supE44</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Gibco BRL
<i>E. coli</i> 5K	Sm <sup>R</sup> , m <sup>+</sup> , <i>lac</i> <sup>-</sup> , <i>thi</i> <sup>-</sup> , <i>rec</i> <sup>+</sup>	S. Glover

Stamm	Phänotyp/Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> W3110		Institutsstammsammlung
<i>E. coli</i> SM10	<i>lacY</i> , <i>tonA</i> , <i>recA</i> , <i>M<sub>c</sub><sup>+</sup></i> , <i>thi</i> , <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>supE</i> , RP4-2-Tc::Mu, Kan, λpir	A. Pühler, Simon et al., 1983
<i>E. coli</i> SM17.1	<i>pro</i> , <i>res<sup>-</sup></i> , <i>mod<sup>+</sup></i> , rp4-2-Tc::Mu-Kan::Tn7, Tp, Sm, <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR<sup>-</sup></i> , <i>hsdM<sup>+</sup></i> , <i>recA</i>	A. Pühler, Simon et al., 1983
<i>E. coli</i> MC4100	F <sup>-</sup> , <i>araD139</i> , Δ( <i>argF-lac</i> ), <i>rpsL150</i> , <i>relA1</i> , <i>flbB5301</i> , <i>deoC1</i> , <i>ptsF25</i> , <i>rbsR</i> , λpir	Institutsstammsammlung
<i>E. coli</i> LE392	<i>supE</i> , <i>supF</i> , <i>hsdR</i>	Institutsstammsammlung

## Vektoren und Plasmide

### a) Vektoren

Bezeichnung	Eigenschaften	Herkunft
pUC18	Ap <sup>R</sup> , <i>lacZ'</i>	Pharmacia
pBlueskript SK	Ap <sup>R</sup> , <i>lacZ'</i> , f1-ori	Stratagene
pSL1180	Ap <sup>R</sup> , <i>lacZ'</i> , M13-ori, keine Blau/Weiß-Selektion	Pharmacia
pQE30, 31, 32	Ap <sup>R</sup> , His6- Überexpressions-Vektor	Qiagen
pREP4	Km <sup>R</sup> , <i>lacR</i> , Regulations-Vektor für pQE-Vektoren	Qiagen
pRTP1	Ap <sup>R</sup> , <i>rpsL</i> , <i>oriT</i> , kojugierbar, repliziert nicht in Bordetellen	Stibitz et al. 1986
pUC4Kan	Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> -Kassette in MCS	Pharmacia
pKAS32	Ap <sup>R</sup> , <i>rpsL</i> (Sm <sup>S</sup> ), oriR6K (λpir-abh.), Verwend. als „Selbstmord“-Vektor	Skorupski und Taylor, 1996

### b) rekombinante Plasmide, (alle aus dieser Arbeit)

Bezeichnung	Eigenschaften	Vektor
pSKctexHE	<i>ctex5.1.2/ctex3.2</i> (2770 bp) PCR-Fragment mit <i>ctex</i>	pBlueskript SK
pKASctexUKD	<i>ctex</i> Deletionskonstrukt (s. u.)	pKAS32
pSKctexSE	<i>ctex5.10/ctex3.2</i> (2,43 kb) PCR-Fragment mit <i>ctex(b)</i>	pBlueskript SK
pQEctexSE	cTex(b) Expressionskonstrukt	pQE30
pQEctexSK	cTex Expressionskonstrukt	pQE32
pQEctexCTD	cTex-CTD Expressionskonstrukt	pQE31

## Oligonukleotide

Oligonukleotid-Primer wurden von Pharmacia, MWG oder ARK synthetisiert. Nukleotidsequenzen sind in 5'→ 3'-Richtung angegeben. Restriktionsschnittstellen wurden unterstrichen und eingefügte Fehlpaarungen zur Zielsequenz rot hervorgehoben.

Primer	Sequenz	Restriktionsschnittstelle
ctex5.1.2	TGG CCG TAA <u>AGC</u> TTA CAT CTC	<i>HindIII</i>
ctex5.10	GGG AAT <u>AGC</u> <u>ATG</u> <u>CCG</u> TTT ATC G	<i>SphI</i>
ctex3.2	ATA GTG AAT <u>TCC</u> CCG GAC TGG C	<i>EcoRI</i>
ctex5.10	GGG AAT <u>AGC</u> <u>ATG</u> <u>CCG</u> TTT ATC G	<i>SphI</i>
ctexG516	GGT TTT <u>GGC</u> <u>ATG</u> <u>CAG</u> TCG TCA GCG CCA ATC	<i>SphI</i>
ctexG1472'	ACC GCC AGA TCG <u>TCC</u> ACT TCT TTT TTC AGC	<i>SalI</i>
ctexG3956	CGC CCG TAC TGG <u>TCC</u> <u>ACG</u> GTT CGA ATT TGC	<i>SalI</i>
ctexG5107''	CCA CGG GTT <u>GGA</u> <u>TCC</u> AGC GGG ATC ACC	<i>BamHI</i>
ctexG1523	ACG TGA <u>ATT</u> CGT AAG GAA GAG T	<i>EcoRI</i>
ctexG1860R	AAT <u>GGA</u> <u>ATT</u> <u>CAG</u> GAT CGC CTG	<i>EcoRI</i>
ctexNSph	CTC AAA <u>GCA</u> <u>TGC</u> TGA ATG ATT CGT TCT G	<i>SphI</i>
ctexCKpn	CGT GCA AAT TGG <u>TAC</u> <u>CGT</u> AGG CC	<i>KpnI</i>
OL32N6	CTA <u>GCA</u> <u>TGC</u> <u>GTC</u> <u>GAC</u> CAN NNN NN	<i>SphI, SalI</i>
OL32	CTA <u>GCA</u> <u>TGC</u> <u>GTC</u> <u>GAC</u> CA	<i>SphI, SalI</i>
M13 univ.	GTA AAA CGA CGG CCA GT	

## Kulturmedien

LB, pro Liter	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl
2x YT, pro Liter	16 g Trypton 10 g Hefeextrakt 10 g NaCl
NZC, pro Liter	10 g NZ Amine A 5 g NaCl 2 g MgCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O

nach dem Autoklavieren:

5 ml 20 % (w/v) Casamino säuren

### M9-Minimalmedium

5x M9-Salze, pro Liter	30 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 15 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 g NH <sub>4</sub> Cl 2,5 g NaCl
------------------------	---

Vor der Verwendung wurde das Konzentrat mit sterilem Wasser vorverdünnt und pro Liter fertiges Medium folgende sterile Lösungen zugegeben anschließend mit Wasser auf 1x Konzentration der Salze aufgefüllt.

## Material und Methoden

1 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O  
1 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub>  
10 ml 20 % (w/v) Kohlenstoffquelle

Je nach Stamm, der kultiviert werden sollte, wurden außerdem steril zugegeben:

0,1 ml 0,5 % (w/v) Thiamin (Vitamin B1)  
5 ml 20 % (w/v) Casaminosäuren  
oder  
5 ml 40 µg/ml L-Aminosäuren

Für feste Nährböden werden den Medien vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar zugegeben.

Beim M9-Medium wird der Agar zunächst zusammen mit der benötigten Menge Wasser ohne Salze autoklaviert. Die angewärmten Stammlösungen werden dann dem auf ca. 40-50 °C abgekühlten Wasseragar zugegeben.

### IPTG/X-Gal-Platten

Für Indikatorplatten für die „blau-weiß-Selektion“ auf β-Galaktosidase-Aktivität von Klonen kommen auf 1/2l „handwarmen“ LB- oder 2x YT-Agar:

0,6 ml 2 % (w/v) X-Gal (in DMF)  
0,5 ml 1M IPTG

### BG- (Bordet-Gengou-) Agar, pro Liter

30 g BG-Agar Base  
10 g Glycerin

nach dem Abkühlen:

200 ml defibriniertes Schaf-/Pferdeblut

Antibiotika wurden ggf. in folgenden Konzentrationen eingesetzt. Für Platten sollte der frisch autoklavierte Nährboden vor der Zugabe erst auf unter 50 °C abgekühlt werden.

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin (Ap)	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O	100 µg/ml
Kanamycin (Km)	30 mg/ml in H <sub>2</sub> O	30 µg/ml
Streptomycin (Sm)	100 mg/ml in 50% (v/v) EtOH	100 µg/ml
Tetracyclin (Tc)	12,5 mg/ml in 50% (v/v) EtOH	12,5 µg/ml
Spectinomycin (Sp)	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O	100 µg/ml

## Arbeiten mit DNA

### Agarosegelelektrophorese

DNA- aber auch RNA-Fragmente können entsprechend ihrer größenabhängigen Ladung elektrophoretisch in verschiedenen Gelmatrices aufgetrennt werden. Um die Nukleinsäuren sichtbar zu machen, werden sie in der Regel mit Ethidiumbromid (EtBr) gefärbt und können im UV-Licht betrachtet werden. Für die Auftrennung von Fragmenten einer Größenordnung von etwa 0,1 kb und größer sind Agarosegele wegen ihrer einfachen Herstellung und Handhabung besonders geeignet.

Entsprechend der Größe der Fragmente, die aufgetrennt werden sollen, wird eine passende Menge an Agarose in 1x Laufpuffer aufgeköcht und gelöst. Nach Abkühlung auf ca. 50 °C wird aus einer Stammlösung (10 mg/ml in HO) 7 µl EtBr pro 100 ml Gellösung zugegeben und durch Schwenken vorsichtig gemischt. Das Gel wird nun sofort in eine vorbereitete Form gegossen und ein Kamm zur

Ausformung der Taschen eingesetzt. Nach ca. 30 min ist das Gel ausgehärtet und kann in die Laufkammer überführt werden. Der Laufpuffer wird so hoch eingefüllt, dass das Gel ca. 1 mm bedeckt ist. Dadurch wird ein zu großer Strom „am Gel vorbei“ verhindert.

Die Proben werden in 2,5x HSE oder 5x Auftragspuffer aufgenommen und neben einem Größenmarker auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt bei einer Spannung von max. 10 V/cm Gellänge.

Agarosekonzentration zur Auftrennung von DNA-Fragmenten:

Agarosekonzentration (% w/v)	DNA-Fragmentgröße (kb)
0,3	5-60
0,5	1-30
0,7	0,8-12
1,0	0,5-10
1,2	0,4-7
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

Zusammensetzung der Laufpuffer:

Konzentration der Arbeitslösung			Konzentration / Zusammensetzung der Stammlösung pro Liter		
TAE	1x	40 mM Tris-Acetat	50x	242 g	Tris
		1 mM EDTA		57,1 ml	Eisessig
				100 ml	0,5 M EDTA, pH 8
TBE	1x	45 mM Tris-Borat	10x	108 g	Tris
		1 mM EDTA		55 g	Borsäure
				40 ml	0,5 M EDTA, pH 8

TAE und TBE sind theoretisch gleichermaßen als Laufpuffer einsetzbar, TBE besitzt jedoch eine größere Pufferkapazität und kann daher für längere Läufe oder solche mit höherer Spannung verwendet werden. TAE hingegen bewirkt angeblich schärfere Banden und ist für manche Gel-Elutionsverfahren besser geeignet.

2,5x HSE

- 30 g Harnstoff
- 62,5 g Saccharose
- 2,33 g EDTA × 2 H<sub>2</sub>O
- 125 mg Bromphenolblau
- 125 mg Xylencyanol
- ad 50 ml H<sub>2</sub>O

5x DNA-Auftragspuffer

- EDTA 25 mM
- 50 % (w/v) Saccharose
- 0,1 % (w/v) Bromphenolblau

### DNA-Größenstandards

Für diese Arbeit wurden die 1 kb Leiter von Gibco BRL und die kb Leiter von Stratagene verwendet. Meist wurde 0,7-1 µg an Standard-DNA aufgetragen

<b>1 kb-DNA-Leiter (Gibco-BRL)</b>	<b>kb-DNA-Ladder (Stratagene)</b>
12216 bp	12000 bp
11198 bp	10000 bp
10180 bp	9000 bp
9162 bp	8000 bp
8144 bp	7000 bp
7126 bp	6000 bp
6108 bp	5000 bp
5090 bp	4000 bp
4072 bp	3000 bp
3054 bp	2000 bp
2036 bp	1500 bp
1635 bp	1000 bp
1018 bp	750 bp
516/506 bp	500 bp
394 bp	250 bp
344 bp	
298 bp	
220 bp	
200 bp	
154 bp	
142 bp	

### Präparation chromosomaler DNA aus gram<sup>-</sup> Bakterien

10 ml einer spät-logarithmischen oder stationären Kultur werden abzentrifugiert (10 min, 6000 g) und das Pellet in 2 ml Lösung 1 resuspendiert. Nachdem die Suspension für mindestens 30 min bei -20 ° C gestanden hat – sie sollte komplett durchgefroren sein – wird sie auf Eis gestellt und langsam aufgetaut. Währenddessen werden 0,2 ml Lysozymbilösung hinzugegeben. Wenn die Zellsuspension vollständig aufgetaut ist, wird sie noch für weitere 30 min auf Eis stehen gelassen.

Die Lyse der Zellen erfolgt durch Zugabe von 1,2 ml Lösung 2. Die nun schleimige Lösung darf nur noch vorsichtig gemischt werden um die Scherung der chromosomalen DNA zu verhindern. Die enthaltenen Proteine werden nach Hinzufügen von 0,2 ml Proteinase K-Lösung für eine Stunde bei 50 ° C im Wasserbad verdaut, bis die Lösung klar geworden ist. An dieser Stelle wird das Ansatzvolumen mit Wasser verdoppelt und 2-3x mit einem Volumen Tris-gepuffertem Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25/24/1) und anschließend einmal mit Chloroform / Isoamylalkohol (24/1) ausgeschüttelt. Dabei muss einerseits auf eine gute Durchmischung der Phasen geachtet werden, andererseits sollte aber auf keinen Fall „gevoertext“ werden um unnötige Scherkräfte zu vermeiden. Die Phasentrennung wird jeweils durch 5minütige Zentrifugation bei max. 5000 g unterstützt. Eine intensivere Zentrifugation erschwert das Abziehen des schleimigen wässrigen Überstandes ohne Verunreinigung durch Teile der Interphase.

Nach Zugabe von 1/10 Vol. 5 M NaCl und 2 Vol. Ethanol fällt die DNA als fädiges Wölkchen aus, kondensiert zusehends und kann mit einer Pipettenspitze gefischt und in ein neues Röhrchen überführt werden. Das Pellet wird leicht getrocknet und anschließend in 1 ml Lösung 3 gelöst. Dies kann durch leichtes Erwärmen und Auf- und Abpipettieren durch eine abgeschnittene Spitze unterstützt werden. Die Lösung wird über Nacht (ÜN) bei 4 ° C oder für 2 Stunden bei 37 ° C mit 30 µl RNase verdaut, erneut mit Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol und Chloroform / Isoamylalkohol extrahiert und wie beschrieben mit Ethanol gefällt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und getrocknet und vorsichtig wieder in 500 µl Wasser oder TE-Puffer gelöst. Nach der photometrischen Konzentrationsbestimmung und der Betrachtung im Agarosegel wird die DNA aliquotiert und bei –

20 ° C gelagert. Erneut aufgetaute Aliquots sollten keinen weiteren Einfrier-Auftau-Zyklen unterzogen werden. Die Ausbeute sollte etwa 30-50 µg DNA pro ml Bakterienkultur betragen.

#### Puffer für die Präparation chromosomaler DNA

	Konzentration / Zusammensetzung der Arbeitslösungen	Zubereitung aus den Stammlösungen pro 100 ml
Lösung 1	50 mM Tris-HCl, pH 8,0	5 ml 1M, pH 8,0
	50 mM EDTA, pH 8,0	10 ml 0,5 M, pH 8,0
Lösung 2	50 mM Tris-HCl, pH 8,0	5 ml 1 M, pH 8,0
	400 mM EDTA, pH 8,0	80 ml 0,5 M, pH 8,0
	0,5 % (w/v) SDS	5 ml 10 % (w/v)
Lösung 3	50 mM Tris-HCl, pH 8,0	5 ml 1M, pH 8,0
	1 mM EDTA, pH 8,0	0,2 ml 0,5 M, pH 8,0
Proteinase K	20 mg/ml in H <sub>2</sub> O	
Lysozym	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O	
RNase A	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O	
TE	10 mM Tris-HCl, pH 7,0	1 ml 1 M, pH 7,0
	1 mM EDTA	0,2 ml 0,5 M, pH 8,0

### Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* im kleinen Maßstab (Miniprep)

1-2 ml einer Übernachtskultur werden in Eppendorf-Caps abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 200 µl S1-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl S2-Puffer werden die Zellen lysiert. Die Ansätze sollten durch mehrmaliges Invertieren gut gemischt werden. Zu heftiges Mischen kann jedoch die Scherung der chromosomalen DNA und dadurch eine Verunreinigung der Präparation mit chromosomalen Fragmenten bewirken. Nach der Zugabe von 200 µl S3-Puffer bildet sich ein dicker, weißer Niederschlag, der nach 5minütiger Inkubation auf Eis bei voller Geschwindigkeit für 10 min abzentrifugiert wird. Der klare Überstand wird in neue Caps überführt und ggf. einmal mit Tris-gepuffertem Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25/24/1) ausgeschüttelt.

Die gereinigte Plasmid-DNA wird mit 1 Vol. Isopropanol gefällt und 15 min bei voller Geschwindigkeit abzentrifugiert, im Vakuum getrocknet und anschließend in 20 µl TE-Puffer gelöst. Für einen analytischen Verdau der Proben sollten jew. 2-5 µl der Präparation ausreichen. Den Verdauansätzen sollte zusätzlich etwa 0,1-0,5 µl RNaseA (10 g/ml) zugegeben werden, da durch die beschriebene Präparation die RNA nicht entfernt wird. Wahlweise kann die Plasmid-DNA auch in TE mit RNase (0,1 mg/ml) gelöst und aufbewahrt werden.

	Konzentration / Zusammensetzung der Arbeitslösungen	Zubereitung aus den Stammlösungen pro 100 ml
S1	50 mM Tris-HCl, pH 8,0	5 ml 1 M, pH 8,0
	10 mM EDTA, pH 8,0	2 ml 0,5 M, pH 8,0
S2	200 mM NaOH	20 ml 1 M
	1 % (w/v) SDS	10 ml 10 % (w/v)
S3	2,6 M KAc, pH 5,2	
TE	10 mM Tris-HCl, pH 7,0	1 ml 1 M, pH 7,0
	1 mM EDTA	0,2 ml 0,5 M, pH 8,0

## **Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* im mittlerem Maßstab (Midiprep)**

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus ÜNK von 100-200 ml wurde der Nucleobond®AX-Midiprep Kit von Macherey-Nagel verwendet. Dieser Kit beruht genauso wie die beschriebene Prozedur zur Präparation im kleinen Maßstab auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Zur besseren Aufreinigung wird die Plasmid-DNA jedoch noch an eine Anionenaustauscher-Säule auf Silikatbasis gebunden und zusätzlich gewaschen.

Die Präparation erfolgte entsprechend dem Protokoll des Herstellers.

## **Präparation von $\lambda$ Phagen-DNA aus flüssigen Lysaten**

Gewinnung von Phagenlysaten

Als Wirt für die Phagen wird am Vortag eine ÜNK von *E. coli* LE392 in LB angeimpft. Aus einem einzelnen Phagenplaque gewinnt man durch Diffusion in 0,2 ml Lambda-Verdünnungspuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 20 mM MgCl<sub>2</sub>) während 2 Stunden bei 4 ° C eine Phagensuspension. Die Hälfte des Eluates wird dann mit 0,1 ml einer 10 mM MgCl<sub>2</sub>/10 mM CaCl<sub>2</sub> – Lösung und 0,1 ml ÜNK vermischt und 15 min bei 37 ° C inkubiert. Dies ermöglicht die effiziente Anheftung der Phagenpartikel an die Bakterien. Der Ansatz wird dann mit 50 ml vorgewärmten NZC-Medium verdünnt und in einem 250 ml Kolben bei 37 ° C heftig geschüttelt (220 rpm auf einem Kreiselschüttler). Nach 6-8 Stunden sollte die Kultur lysiert sein und wird sofort geerntet. Einige Tropfen Chloroform bewirken die Lyse von noch intakten Zellen. Das Lysat wird in Greiner-Röhrchen umgefüllt und die Zelltrümmer mit 6000 rpm 15 min bei 4 ° C abzentrifugiert. Das geklärte Phagenlysat wird abgenommen und kann bei 4 ° C aufbewahrt werden.

Präparation der DNA

Ungefähr 50 ml flüssiges Phagenlysat werden mit 50 µg DNase und 250 µg RNase für eine Stunde bei 37 ° C inkubiert. Dabei werden die im Lysat enthaltenen bakteriellen Nukleinsäuren verdaut und die Viskosität des Lysates sollte sich verringern. Durch Zentrifugation bei 132000 g und 4 ° C für 1 ½ Stunden oder 2 ¼ Stunden bei 48000 g werden die Phagenpartikel als durchscheinender Niederschlag gesammelt und werden nach Entfernen des Überstandes in 200 µl 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 aufgenommen. Das Resuspendieren des Niederschlages muss sehr sorgfältig erfolgen. Die Phagensuspension wird 2-3x mit gepuffertem Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25/24/1) extrahiert. Dabei sollte beim ersten Durchgang für gut 10-15 min Ausgeschüttelt oder „gevortext“ werden, um sicherzustellen, dass das Phagenperzipitat komplett gelöst wird. Phenolreste werden durch einmalige Extraktion mit Chloroform/ Isoamylalkohol (24/1) entfernt. Die gelöste Phagen-DNA wird mit 1/10 Vol. 3 M NaAc, pH 4,8 und 2 Vol. Ethanol bei RT gefällt, für 15 min in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und das Präzipitat mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min wird der Niederschlag getrocknet und in 100 µl TE-Puffer gelöst. 3 µl der Präparation sollten für einen analytischen Verdau und die Überprüfung im Agarosegel genügen.

## **Präparation von DNA aus Agarosegelen**

Die Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick Gelextraktionskit von Qiagen entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Dabei wird das ausgeschnittene Gelstück mit dem darin enthaltenen Fragment zunächst in einem Guanidin-Detergenz-haltigen Puffer gelöst und die DNA anschließend über ein Silikatsäulchen gereinigt.

## **Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Reaktionsbedingungen für verschiedene PCRs werden entsprechend der Hersteller-Vorgaben für die verwendete Polymerase, die eingesetzten Primer und das zu amplifizierende Template angepasst. Die Primer werden in der Regel in einer Konzentration von 1-2 pmol/µl eingesetzt. Die Templatekonzentration liegt für chromosomale DNA in der Größenordnung von 10 ng pro 100 µl Reaktionsvolumen, kann aber stark variieren.

Für die Auswahl der passenden Hybridisierungstemperatur kann normalerweise das Datenblatt des Oligo-Herstellers herangezogen werden und sollte zunächst 1-2 ° C unterhalb des angegebenen Schmelzpunktes des weniger affinen Oligos gewählt werden. Als Faustregel für die Länge der Polymerisationsphase gilt eine Minute pro kb des angestrebten Produktes.

Als Beispiel sei hier eine Standard-PCR mit der *Taq*-DNA-Polymerase von Promega Bedingungen aufgeführt:

× µl	DNA-Template (z. B. 1-10 ng Plasmid)
10 µl	10 × Thermopol.-Puffer (Promega)
6 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>
1 µl	20 mM dNTPs
1 µl	Primer 1 (100 nM)
1 µl	Primer 2 (100 nM)
0,2 µl	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl, Promega)
ad 100 µl	H <sub>2</sub> O

3 min	94° C	„first step delay“	
1 min	94° C	Denaturierung	
1 min	55° C	„Annealing“	
1 min	72° C	Elongation	30 Zyklen
3 min	72° C	„last step delay“	

Die Stringenz der PCR kann durch Erhöhung der Annealing-Temperatur bzw. Verkürzung der Annealing-Zeit erhöht werden.

Die Reinigung von PCR-Produkten für den Einsatz in nachfolgende Reaktionen (Phosphorylierung, Klonierung) erfolgt über QIAquick Spin Säulchen (Qiagen) entsprechend dem Protokoll des Herstellers.

## Glätten und Phosphorylieren von PCR-Produkten

*Taq*-Polymerasen hängen an das 3'-Ende durch sie synthetisierter Sequenzen unspezifisch ein zusätzliches Adenin an, so dass letztlich Produkte mit überhängenden, „klebrigen“ Enden entstehen. Zudem sind PCR-Primer in der Regel an ihrem 5'-Ende nicht phosphoryliert und eignen sich daher nur mit geringer Effizienz als Template für Ligationen.

Zur Erzeugung von DNA-Fragmenten mit glatten, phosphorylierten Enden ("Blunting/Kinasing") zur anschließenden Klonierung wurden diese wie folgt mit DNA-Polymerase I Klenow-Fragment und T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK) behandelt:

15 µl (2-5 µg)	PCR-Produkt
2 µl	10 × One-Phor-All-Buffer
1 µl (6 U)	Klenow-Fragment
1 µl (6 U)	T4-PNK
1 µl	50 mM ATP

Die Inkubation erfolgt zunächst für 10 min bei Raumtemperatur, anschließend wird 1 µl 20 mM dNTPs zupipettiert und für weitere 20-30 min bei 37° C inkubiert. Die DNA wird dann über QIAquick Spin Säulchen gereinigt.

Bei PCR-Produkten, die mithilfe anderer Polymerasen erzeugt wurden, ist eine Behandlung mit Klenow-Fragment nicht notwendig.

## Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Je nach Verwendungszweck wird eine bestimmte Menge gereinigter DNA mit den gewünschten Restriktionsenzymen und dem vom jew. Hersteller vorgesehenen Puffer bei der vorgegebenen Temperatur inkubiert. Die Menge an Enzymlösung, die dem Ansatz zugegeben wird, sollte 10 % (v/v) der Ansatzgröße nicht überschreiten, da sonst die Sequenzspezifität der Restriktionsendonuklease stark herabgesetzt werden kann (sog. Sternaktivität). Aufgrund der Vielfalt verschiedener Produkte und Anwendungen lässt sich hier keine allgemeingültige Aussage über benötigte Enzymmengen und Inkubationsbedingungen treffen. Bei Mehrfachverdauen ist jedoch darauf zu achten, dass die Bedingungen so gewählt werden, dass alle verwendeten Enzyme korrekt arbeiten können. Ist das nicht möglich, müssen die verschiedenen Verdauungen nacheinander durchgeführt werden. Dabei ist es evtl. möglich die Pufferkonzentration zwischen den Schritten zu erhöhen und das neue Enzym zuzugeben ohne den Ansatz erst aufzureingen zu müssen. Sternaktivität tritt vor allem bei zu geringen Salzkonzentrationen oder zu viel Glycerin auf.

Zur Kontrolle sollten Restriktionsverdauungen immer im Agarosegel analysiert werden.

## Alkalische Phosphatase-Behandlung

Zur Dephosphorylierung von Vektor-DNA wird entsprechend geschnittener Vektor wie folgt mit Alkalischer Phosphatase (AP, Pharmacia) behandelt:

3-5  $\mu\text{l}$  (ca. 500 ng) gesplante Vektor-DNA  
2  $\mu\text{l}$  10  $\times$  One-Phor-All-Buffer  
1  $\mu\text{l}$  (1 U) AP  
ad 20  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O

Der Ansatz wird 40 min bei 37° C inkubiert, anschließend mit QIAquick Spin Säulchen gereinigt.

## Ligation

Vektor- und Insert-DNA werden wie folgt mit T4-DNA-Ligase (Gibco-BRL) ligiert:

"sticky ends"-Ligation:

50-100 ng geschnittener Vektor  
200-500 ng geschnittenes Insert  
4  $\mu\text{l}$  5  $\times$  T4-DNA-Ligase-Puffer  
1  $\mu\text{l}$  5 mM ATP  
1  $\mu\text{l}$  (1 U) T4-DNA-Ligase  
ad 20  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O

"blunt ends"-Ligation

50-100 ng geschnittener Vektor (AP-behandelt)  
0,5-1  $\mu\text{g}$  Insert (Klenow-/T4-PNK-behandelt)  
4  $\mu\text{l}$  5  $\times$  T4-DNA-Ligase-Puffer  
2  $\mu\text{l}$  5 mM ATP  
1  $\mu\text{l}$  (1 U) T4-DNA-Ligase  
ad 20  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O

Die Inkubation erfolgt jeweils über Nacht bei 16° C. Für die Transformation wird zwischen einem Viertel und dem gesamten Ligationsansatz verwendet.

## Transformation von kompetenten *E. coli*

### Gewinnung CaCl<sub>2</sub>-kompetenter Zellen

100 ml vorgewärmtes LB werden mit 0,5 ml einer ÜNK angeimpft und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,5 (ca. 80 Klett) bei 37 ° C geschüttelt und anschließend für 15 min auf Eis gestellt. Von nun an ist es essentiell, die Zellen permanent kalt zu halten. Daher sollten alle Lösungen auf Eis stehen und zügig gearbeitet werden.

Die Kultur wird auf zwei 50 ml Röhrchen aufgeteilt und für 10 min mit ca. 4000 g bei 4 ° C für 10 min zentrifugiert. Die pelletierten Zellen werden in jew. 10 ml kaltem 0,1 M CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und nochmals für mindestens ½ Stunde auf Eis gestellt. Nach der Inkubation werden die Zellen erneut abzentrifugiert und anschließend in je 5 ml kaltem 0,1 M CaCl<sub>2</sub> mit 20 % (v/v) Glycerin aufgenommen, in 100 µl Portionen aliquotiert und bei -80 ° C eingefroren oder direkt weiterverwendet. Tiefgefrorenen Zellen bleiben für 1-2 Jahre kompetent.

### Transformation CaCl<sub>2</sub>-kompetenter Zellen

Kompetente Zellen werden auf Eis langsam aufgetaut und vorsichtig mit bis zu 10 µl DNA-Lösung (Ligationsansatz oder Plasmid) vermischt und für etwa 10 min auf Eis stehen gelassen. Während des anschließenden Hitzeschocks für 45 sek. bei 42 ° C, vorzugsweise im Wasserbad, wird die DNA aufgenommen, bevor der Ansatz erneut für einige Minuten auf Eis gestellt wird. Durch die Zugabe von 1 ml vorgewärmtes 2x YT-Medium wird die einstündige Zwischenzüchtung bei 37 ° C eingeleitet, die den transformierten Zellen Zeit gibt die übertragenen selektierbaren Marker zu exprimieren. Zur Selektion von Transformanten werden 10 µl, verdünnt auf 100 µl, 100 µl und nach Zentrifugation der Rest in 100 µl auf entsprechende Nährböden ausplattiert und über Nacht bebrütet.

## Konjugation von Plasmiden in *Bordetella*-Stämme

Donor- (*E. coli* SM10 o. SM17.1) und Akzeptorstamm (*Bordetella* sp.) werden entsprechend ihrer Wachstumsgeschwindigkeit frisch auf passenden Nährböden angeimpft damit sie zum Zeitpunkt des Experiments bereits gut gewachsen sind sich aber noch in der logarithmischen Wachstumsphase befinden (*Bordetella* sp.: 2-3 d; *E. coli*: ÜN). Für die Konjugation wird vom Akzeptor und Donor jew. etwas an Bakterien mit einer Impföse abgenommen im Verhältnis von ca. 5:1 bis 10:1 auf einer vorgewärmten BG-Platte ohne Antibiotika, aber mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> gut vermischt. Der Ansatz wird nun für 5-6 Stunden bebrütet. Anschließend werden auf geeigneten selektiven Nährböden mehrere Verdünnungsausstriche des Konjugationsgemisches angefertigt. Transkonjuganten können nach 3-7 Tagen isoliert werden. Um zu verhindern, dass die *Bordetellen* durch *E. coli* trotz der Selektionsbedingungen überwachsen werden, sollten so früh wie möglich Einzelkolonien ausgewählt und auf frische Nährböden überstrichen werden.

## Hybridisierung von DNA-Fragmenten mit markierten DNA-Sonden (Southern Blot)

Diese Methode wird in der Regel zum PCR-unabhängigen Nachweis insbesondere chromosomaler Sequenzen verwendet und kann unter Einbeziehung entsprechender Kontrollen auch zur Bestätigung von Deletionen herangezogen werden. Dazu wird die DNA zunächst mit Restriktionsendonukleasen verdaut, auf einem Agarosegel aufgetrennt und anschließend per Kapillarblot auf eine Nylonmembran (Hybond N+, Amersham) übertragen (geblottet) und fixiert. Auf der Membran findet dann die Hybridisierung und der Nachweis statt. Die Markierung der spezifischen Sonde kann entweder radioaktiv oder mit chemisch nachweisbaren Gruppen erfolgen.

Der Vorteil gegenüber der PCR beruht auf der geringeren Empfindlichkeit gegenüber Kontaminationen, z. B. durch Plasmid-DNA. Außerdem können durch diese Form der Hybridisierung leichter auch multiple Kopien einer Sequenz aufgespürt und ihre Anzahl bestimmt werden sofern diese auf unterschiedlich großen Restriktionsfragmenten liegen.

In dieser Arbeit wurde der ECL (enhanced chemiluminescence)-Kit (Amersham-Pharmacia) für die Markierung und den Nachweis von DNA-Sonden benutzt. Die Aufbereitung der Proben und der Nachweis der gesuchten Fragmente erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers.

## Sequenzierung von doppelsträngiger Plasmid DNA (T7 Sequencing™ Kit, Pharmacia)

Der Kit beruht auf der von Sanger et al. entwickelten Dideoxymethode durch den Einbau von definierten Dideoxynukleotiden komplementär zur Matrize statistisch Kettenabbrüche provoziert werden. Die entstehenden Fragmente werden anschließend auf einem Harnstoffgel aufgetrennt und auf Grund des Einbaus radioaktiver Nukleotide auf einem Röntgenfilm abgebildet.

1,5-2 µg der Template DNA werden auf ein Volumen von 8 µl verdünnt und durch Zugabe von 2 µl NaOH und 10minütiger Inkubation bei Raumtemperatur denaturiert. Anschließend werden 3 µl NaAc, 7 µl H<sub>2</sub>O und 60 µl EtOH<sub>abs</sub> zugegeben und die DNA während 15 min bei -20° C gefällt und danach abzentrifugiert (14.000 rpm, 15', 4° C), mit 70 %igem EtOH gewaschen, im Vakuum getrocknet und schließlich in 10 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Für die Anlagerung des Sequenzierungsprimers werden der denaturierten DNA 2 µl Annealing buffer und 2 µl der auf 5-10 ng/µl eingestellten Primerlösung zugegeben und der Ansatz für 20 min bei 37° C und anschließend für mindestens 10 min bei RT inkubiert.

An dieser Stelle kann die Probe bei -20° C eingefroren und so gelagert werden, ansonsten folgt die Sequenzierungsreaktion. Dazu werden zunächst für jeden Ansatz 4 Eppendorf cups mit G, A, T, bzw. C beschriftet und 2,5 µl des entsprechenden "Short Mix" vorgelegt und die im Kit enthaltene Polymerase auf 1,5 u/µl verdünnt. Jedem der Sequenzierungsansätze werden jetzt 3 µl A-Labeling Mix, 1 µl [ $\alpha$  <sup>35</sup> S] dATP und 2 µl der verdünnten Polymerase hinzugefügt und das Ganze für 5 min bei RT inkubiert während die G-, A-, T-, C-Cups auf 37° C vorgewärmt werden.

Für die Terminierungsreaktion werden je 4,5 µl der Sequenzierungsreaktion in die vorgewärmten G-, A-, T-, bzw C-Mixes pipetiert (alle 15 sec eines) und für genau 5 min bei 37° C inkubiert bevor die Reaktion durch Zugabe von 5 µl Stopplösung die Reaktion beendet wird. Auch an dieser Stelle können die Proben mindestens für einige Tage eingefroren werden.

Bevor die Proben auf das während 15-30 min warmgelaufene Harnstoffgel aufgetragen werden, werden sie für 5 min auf ca. 80-85° C erhitzt. Pro Lauf werden von jedem Reaktionsansatz 5 µl aufgetragen und bei 2900 V (75 W) aufgetrennt. Es ist zweckmäßig 2 Läufe im Abstand von rd. 3 Stunden aufzutragen.

Der Kit enthält als "short mixes" fertige Mischungen an Desoxynukleotiden in einem Puffer aus 40 mM Tris-Cl (pH 7,6) und 50 mM NaCl.

Außerdem:

- T7 Polymerase (8 u/µl)
- Enzyme dilution buffer
- Universal Primer (5 pmol/µl)
- Annealing buffer (1 M Tris-HCl [pH 7,6], 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 160 mM DTT)
- Labelling Mix: (je 1,375 µM dCTP, dGTP, dTTP in 333,5 mM NaCl)
- Stop Puffer

zusätzlich werden benötigt:

- 2 M NaOH
- 3 M, pH 4,5 NaAc
- 70 % (v/v) EtOH
- 100 % EtOH
- 10 mCi/ml [ $\alpha$  <sup>32</sup>S] dATP

## 6 % Harnstoffgel für Sequenzierungen

Zunächst werden die Gelplatten (60 x 20 cm) mit einer Folge von Seifenwasser, dH<sub>2</sub>O, 70 % (v/v) EtOH und 100 % EtOH gereinigt und mit den gereinigten Seiten nach Innen unter Verwendung von 0,3 mm Spacern aufeinandergelegt und verklammert und waagrecht hingelegt. Anschließend wird die gefilterte Harnstoff-Acrylamid-Lösung mit APS und TEMED versetzt und sofort mit Hilfe einer Glaspipette vom oberen Ende her zwischen die Platten gegossen. Zur Beschleunigung können die Platten dabei leicht schräg gehalten werden, allerdings ist darauf zu achten, daß immer genügend der Gellösung nachfließt, damit keine Blasen entstehen. Ist die Lauffront am unteren Ende der Platten angekommen werden diese, damit die Lösung nicht ausläuft, wieder hingelegt und wird am oberen Ende ein Haifischzahn-Kamm mit der Oberflächenformer-Seite eingeschoben. Nach einer Stunde ist das Gel auspolymerisiert und kann entweder gleich verwendet oder mit feuchten Tüchern an den Enden bis zum nächsten Tag aufbewahrt werden.

Vor der Verwendung sollte insbesondere der obere Rand gut abgespült werden um zu vermeiden, daß Gelreste sich in die späteren Taschen setzen und damit zu unregelmäßigen Banden führen können. Nach einem mind. 15 minütigen Vorlauf ohne Kamm bei 75 W wird die große Tasche gründlich mit Laufpuffer ausgespült und der Haifischkamm so eingesetzt, daß seine Zähne gerade die Oberfläche des Gels berühren.

Jetzt können die denaturierten Sequenzierungsansätze, zweckmäßigerweise immer in der gleichen Reihenfolge, z. B. G A T C, aufgetragen werden. Ferner ist darauf zu achten entsprechend Platz für die später aufzutragenden Läufe zu lassen. Bevor diese Aufgetragen werden müssen die Taschen erneut ausgespült werden.

Nach ca. 2 x 3 hrs Laufzeit wird das Gel abgebaut, die Platten voneinander gelöst und an einer der Platten anhaftende Gel auf Whatman™ 3MM Papier aufgezogen. Die Gelseite wird dann mit Frischhaltefolie überzogen und das Gel für ca 1,5 hrs bei 80° C im Vacuum im Geltrockner getrocknet. Die markierten DNA-Banden werden durch Autoradiographie sichtbar gemacht, dafür wird ein Röntgenfilm je nach Strahlungsaktivität ein bis zwei Tage exponiert und dann entwickelt.

Zusammensetzung der Gellösung:

33,6 g	Harnstoff
7 ml	10x TBE
14 ml	Acrylamid/Bisacrylamid (30 %)
ad 70 ml	H <sub>2</sub> O
300 µl	APS (10 % (w/v))
50 µl	TEMED

Laufpuffer: 1x TBE

## Allelaustauschmutagenese

Das hier verwendete Selektionssystem für den chromosomalen Allelaustausch in Enterobakterien nutzt die Dominanz des Streptomycin-sensitiven (Sm<sup>S</sup>) *rpsL*-Allels gegenüber der resistenten Variante (Skorupski und Taylor, 1996). Daher ist es wichtig als Wirt für den Allelaustausch einen Sm<sup>R</sup> Stamm zu verwenden. Der  $\lambda$ pir-abhängige Austauschvektor pKAS32 trägt neben dem *rpsL* Gen noch das *bla* Gen für Ampicillin-Resistenz (Ap<sup>R</sup>). Nach der Konjugation des Plasmides in einen  $\lambda$ pir-negativen Wirtstamm können auf Ap-haltigem Medium somit nur solche Zellen wachsen, die das Plasmid durch homologe Rekombination chromosomal integriert haben. Nach mehrfacher Zwischenzüchtung der Integranden aus dem ersten Schritt in Medium ohne Ampicillin sollten einzelne Bakterien wegen des fehlenden Selektionsdrucks das integrierte Plasmid wieder verlieren. Durch Selektion auf Sm-haltigen Nährböden können solche Bakterien angereichert werden. Von diesen sollte etwa die Hälfte dem Mutanten- und die andere Hälfte dem Ausgangsgenotyp entsprechen. Wenn bei der Konstruktion des Austauschvektors zwischen die homologen Bereiche eine Resistenzkassette integriert wird, kann nach der Zwischenzüchtung in entsprechendem Medium speziell auf die Mutanten hin selektioniert werden.

Für die Deletion des zu *tex* aus *B. pertussis* homologen Leserahmens *yhgF* aus *E. coli* wurde die in Leserichtung oberhalb von *yhgF* gelegene Sequenz mit den Primern *ctexG516* und *ctexG1472'* in einer PCR mit  $\lambda$  2F6-DNA als Matrize amplifiziert. Über die dabei eingefügten terminalen Schnittstellen (*SphI* und *SallI*) wurde das rd. 950 bp große Fragment in pUC18 kloniert ( $\rightarrow$  pUC*ctexU*). Analog wurde ein 1150 bp Fragment des unterhalb des *Tex*-Homologen gelegenen Bereichs durch PCR mit den Oligonukleotiden *ctexG3965* (*SallI*) und *ctexG5107'* (*BamHI*) gewonnen und wie zuvor über die eingefügten Schnittstellen in das Plasmid pUC*ctexU* eingefügt. Im resultierenden Plasmid pUC*ctexUD* liegen die Fragmente des stromauf- und abwärts gelegenen Bereichs von *yhgF* in der gleichen Anordnung vor, wie auf dem Chromosom. Als zusätzliches, selektionierbares Merkmal wurde noch die Kanamycin Resistenzkassette aus pUC4KAN mit *SallI* als 1,25 kb Fragment ausgeschnitten und in die entsprechende Schnittstelle zwischen den beiden chromosomalen Fragmenten in pUC*ctexUD* eingefügt. Das resultierende Plasmid pUC*ctex UKD* wurde mit *SphI* geöffnet und die überhängenden Enden mit Klenow Fragment abgedaut. Anschließend wurde das gesamte 3,36 kb große Insert mit *EcoRI* aus dem linearisierten Plasmid herausgeschnitten und mit dem *EcoRV* und *EcoRI* geöffneten Vektor pKAS32 zum fertigen Austauschplasmid pKAS*ctexUKD* ligiert. Die Replikation von pKAS32 ist  $\lambda$ pir abhängig. Daher wurde als Wirt für die Transformation des Ligationsansatzes nicht der *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  sondern MC4100  $\lambda$ pir benutzt. Nach Überprüfung des Spaltmusters von pKAS*ctexUKD* wurde das Plasmid für die spätere Konjugation in *E. c.* SM10  $\lambda$ pir ( $\text{Km}^R$ ) transformiert, die Selektion erfolgte auf Ampicillin-Resistenz.

In Abbildung 6A ist der *tex*-Locus von WT und Mutante schematisch dargestellt.

Für den Allelaustausch – die Deletion von *yhgF* – wurde pKAS*ctexUKD* aus *E. c.* SM10  $\lambda$ pir in *E. coli* 5K ( $\text{Sm}^R$ ) konjugiert. Um nach der Konjugation gegen den Donorstamm selektionieren zu können wurde ein Spectinomycin- und Streptomycin-resistenter ( $\text{Sp}^R$ ,  $\text{Sm}^R$ ) Substamm von 5K hergestellt. Spontane Mutanten mit Spectinomycin-Resistenz konnten durch Ausplattieren von 0,1 ml Aliquots einer ÜNK auf LB-Platten mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Spectinomycin gewonnen werden. Nach zwei Tagen bei 37 ° C wurden resistente Klone isoliert und einer als Rezipient für die Konjugation benutzt. Durch Inkubation ÜN auf LB-Platten mit Ap, Km und Sp wurde auf Transkonjuganden selektioniert. Am nächsten Morgen wurden drei der gewachsenen Kolonien benutzt um eine 20 ml Kultur in LB mit Km und Sp anzupflanzen. Diese Kultur wurde 3 mal nach jeweils ungefähr 12 Stunden 1:100 mit dem gleichen Medium verdünnt und weiter unter Schütteln bebrütet. Durch Ausplattieren verschiedener Verdünnungsstufen der Kultur auf LB-Platten mit Km, Sp und Sm wurden solche Klone isoliert, bei denen ein Austausch des wildtypischen gegen das mutierte Allel stattgefunden hat.

## Arbeiten mit RNA

Beim Umgang mit RNA ist stets sorgfältig auf die Vermeidung der Kontamination mit RNasen zu achten. Dazu werden alle verwendeten Lösungen vor dem Autoklavieren ÜN bei 37 ° C mit 0,05-0,1 % (v/v) DEPC (Diethylpyrocarbonat) inkubiert. Dieser Hemmstoff reagiert mit tertiären Aminen, z. B. von RNasen, und macht sie so unschädlich. Da die Substanz aber auch mit Tris reagiert, können Tris-haltige Puffer lediglich mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt werden und müssen anschließend auf RNase-Freiheit getestet werden. Zudem sollte der Experimentator während aller Arbeiten Handschuhe tragen.

## Ein-Schritt-RNA-Präparation aus Bakterien abgewandelt nach Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987)

Diese Methode wurde ursprünglich zur Präparation von RNA aus eukaryontischen Zellkulturen oder Gewebeproben entwickelt. Sie kann für kleinere Ansätze allerdings problemlos auf gram<sup>-</sup> Bakterien angewendet werden. Bei größeren Ansätzen lässt die Ausbeute allerdings zu wünschen übrig.

Die Zellen aus 10 ml Flüssigkultur in der exponentiellen Phase ( $\text{OD}_{600}=0,5-1,0$ ) werden bei RT abzentrifugiert und ohne vorherigen Waschschrift in 1 ml Denaturierungslösung sorgfältig resuspendiert. Dabei werden die Bakterien augenblicklich lysiert und die chromosomale DNA möglichst stark geschert. Die Suspension sollte jedoch nicht zu stark aufgeschäumt werden. Die mehr oder weniger klare Lösung wird noch für 5 min bei RT stehen gelassen und anschließend zunächst mit

100 µl 2 M NaAc, pH 4,0 und dann mit 1 ml wassergesättigtem Phenol sorgfältig vermischt und für weitere 5 min bei RT inkubiert. Die Trennung von organischer und wässriger Phase wird durch die Zugabe von 200 µl Chloroform/ Isoamylalkohol (24/1) eingeleitet. Der Ansatz wird nochmals gut gemischt und für 15 min auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation für 20 min bei 10000 g befinden sich Proteine und DNA-Fragmente bis ca. 10 kb in der organischen Phase, während größere DNA-Fragmente in der Interphase und die RNA in der wässrigen Phase zu finden sind. Letztere wird, um größere DNA Verunreinigungen zu vermeiden, nicht vollständig abgenommen und in ein frisches Röhrchen übertragen. Die enthaltene RNA wird mit 1 Vol. Isopropanol für mindestens 30 min bei -20 ° C gefällt und anschließend für 20 min mit 10000 g bei 4 ° C präzipitiert. Reste an GuSCN aus der Denaturierungslösung werden durch Waschen mit 75%igem EtOH entfernt.

Für die meisten Anwendung ist es notwendig die gereinigte RNA zusätzlich noch einem DNase-Verdau zu unterziehen. Dazu wird der RNA-Niederschlag nach der Fällung in 250 µl DNase-Puffer gelöst und zusammen mit 40 U RNase-freier DNase I (Pharmacia) 30 min bei 37 ° C inkubiert. Danach wird der Ansatz je einmal mit 1 Vol. wässrigem Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25/24/1) und 1 Vol. Chloroform/ Isoamylalkohol (24/1) extrahiert und anschließend erneut mit Isopropanol gefällt. Der getrocknete Niederschlag wird in 100 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

	Konzentration / Zusammensetzung der Arbeitslösungen	Zubereitung aus den Stammlösungen
Denaturierungs-Lösung	4 M GuSCN	50 g
	25 mM NaCitrat, pH 7	2,64 ml 1 M, pH 7
	0,1 M 2-Mercaptoethanol	0,7 ml
	0,5 % N-Lauroylsarcosin	5,28 ml 10 %
		59,5 ml H <sub>2</sub> O
NaAc-Lsg.	2 M NaAc, pH 4	16,42 g NaAc, wasserfrei
		30 ml H <sub>2</sub> O
		35 ml Eisessig
		mit Eisessig auf pH 4 einstellen und mit H <sub>2</sub> O auf 100 ml auffüllen
DNase-Puffer	40 mM Tris, pH 7,5	
	6 mM MgCl <sub>2</sub>	

### Drei-Detergenzien-Methode zur Präparation von RNA aus gram<sup>-</sup> Bakterien (Syn et al., 1999)

Diese Methode eignet sich vor allem zur Präparation größerer Mengen an RNA.

50 ml einer spätlogarithmischen Kultur (*E. coli*: OD<sub>600</sub>=1,2-1,6) werden 10 min mit 6000 g abzentrifugiert und das Pellet in ca. 1 ml des Überstandes resuspendiert und mit 20 ml STT Puffer für 1 min gevortext. Nach der Zugabe von 1/40 Vol. (ca. 0,6-0,7 ml) 1 M HCl wird gut gemischt und eine Minute bei RT inkubiert. Das Lysat wird mit 2 ml 2 M NaAc (pH 4,0) gepuffert und anschließend 2 mal mit saurem Phenol(pH 4,0)/Chloroform (4:1) extrahiert. Die Phasentrennung erfolgt jeweils durch 15 min Zentrifugation bei 6000 g. Phenolrückstände entfernt man durch ein- bis zweimaliges Ausschütteln mit Chloroform. Die Fällung der RNA erfolgt durch Zugabe von 1 Vol. Isopropanol und eine Stunde Inkubation bei -20 ° C. Das Präzipitat wird 30 min mit 6000 g bei 4 ° C abzentrifugiert kurz im Vakuum getrocknet und wie beschrieben DNase-behandelt.

## Material und Methoden

		Zubereitung aus den Stammlösungen pro 100 ml
SST-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0	1 ml 1 M, pH 8,0
	20 mM EDTA, pH 8,0	4 ml 0,5 M, pH 8,0
	2 % (w/v) SDS	20 ml 10 % (w/v)
	1 % (v/v) Tween 20	1 ml
	1 % (v/v) Triton X-100	1 ml

### Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese

RNA kann generell, genau wie DNA auch in TAE- und TBE-Agarosegelen aufgetrennt werden. Wegen der stärker ausgeprägten Sekundärstrukturen der einzelnen Moleküle und der Gefahr durch RNasen empfiehlt sich jedoch in einigen Fällen die Verwendung von Formaldehyd-Agarosegelen zur denaturierenden Auftrennung der Fragmente.

Für ein 100 ml Gel wird dazu 1-1,5 g Agarose in 87 ml DEPC-H<sub>2</sub>O und 10 ml 10x MOPS-Puffer aufgekocht und gelöst. Nach Abkühlung auf ca. 45-50 ° C werden 3 ml Formaldehyd-Lsg. und 8 µl EtBr-Lsg. (10 mg/ml) unter dem Abzug zugegeben und vorsichtig gemischt. Die Gellösung wird nun in eine vorbereitete Form gegossen und erstarren gelassen.

Die Proben werden 1:1 in RNA-Probenpuffer aufgenommen und bei 100 V aufgetrennt.

Als Laufpuffer für die Elektrophorese dient 1x MOPS-Puffer.

		Konzentration der Arbeitslösung		Konzentration / Zusammensetzung der Stammlösung pro Liter
MOPS-P.	1x	mM	MOPS	10x 41,8 g MOPS 800 ml H <sub>2</sub> O
				pH 7,0 mit NaOH einstellen und autoklavieren
		48 mM	NaAc	16 ml 3 M NaAc
		10 mM	EDTA	20 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0
				ad 1 l H <sub>2</sub> O

Die Stammlösungen und das Wasser zum Verdünnen werden DEPC-behandelt und autoklaviert. Der fertige 1x Puffer wird nicht erneut autoklaviert und dunkel aufbewahrt.

2x RNA-Probenpuffer	6,7 µl	Formamid (deion.)
	3,4 µl	Formaldehyd
	3,4 µl	10x MOPS-Puffer
	1,7 µl	ges. Bromphenolblau-Lsg. in H <sub>2</sub> O
	= 15,2 µl	

## Primer Extension

### Radioaktive Markierung des Oligonukleotids

Zur Endmarkierung des Oligonukleotid-Primers mit [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-dATP wird folgende Kinase-Reaktion zusammenpipettiert und für 30 min bei 37° C inkubiert:

20 $\mu$ l (200 $\mu$ Ci)	[ $\gamma$ - $^{32}$ P]-dATP (10 mCi/ml)
1 $\mu$ l (100 ng)	Oligonukleotid (100 ng/ $\mu$ l)
2,5 $\mu$ l	10 $\times$ Kinase-Puffer
4 U	T4-PNK

Zur Inaktivierung der Polynukleotid-Kinase wird anschließend für 5 min bei 65° C inkubiert. Zur Abtrennung der nicht eingebauten Radioaktivität wird eine Reinigung mit einer NucTrap-Säule (Stratagene) (siehe 6.1.12.1) durchgeführt. Die spezifische Aktivität [cpm/ $\mu$ l] der Sonde wird im Szintillationszähler bestimmt und sollte mindestens  $1 \times 10^5$  cpm/ $\mu$ l betragen.

### Hybridisierung der Sonde an die RNA

$5 \times 10^5$  cpm des markierten Oligonukleotids werden zu 70  $\mu$ g RNA gegeben und der Ansatz durch Zugabe von 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat, pH 4,8 und 2,5 Vol. Ethanol im Trockeneis-Ethanol-Bad ausgefällt. Die Nukleinsäuren werden abzentrifugiert (15 min, 14000 rpm, 4° C), restliches Ethanol wird auf saugfähigem Papier (Kleenex) entfernt und das Pellet (vollständig!) in 30  $\mu$ l Hybridisierungspuffer resuspendiert. Der Hybridisierungsmix wird für 5 min auf 70° C erhitzt und über Nacht bei 30° C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Nukleinsäuren durch Zugabe von 170  $\mu$ l 0,3 M Natriumacetat, pH 4,8 und 500  $\mu$ l Ethanol wie oben ausgefällt.

### Reverse Transkription (Primer Extension) und Gelelektrophorese

Die Nukleinsäuren werden (vollständig!) in 25  $\mu$ l RT-Mix resuspendiert und 2  $\mu$ l AMV Reverse Transkriptase (25 U/ $\mu$ l, Stratagene) hinzupipettiert. Die Inkubation erfolgt für 90 min bei 42° C. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1  $\mu$ l 0,5 M EDTA gestoppt und die RNA durch Zugabe von 1  $\mu$ l (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) Ribonuklease A verdaut (30 min bei 37° C). 100  $\mu$ l 2,5 M Ammoniumacetat werden zum Ansatz pipettiert, die Probe wird mit 125  $\mu$ l Phenol:Chloroform (1:1) extrahiert und die wässrige Phase durch Zugabe von 300  $\mu$ l Ethanol ausgefällt. Die cDNA wird abzentrifugiert (15 min, 14000 rpm, 4° C), mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 3  $\mu$ l TE-Puffer aufgenommen. 4  $\mu$ l Formamid-Probenpuffer (aus  $^{17}$ Sequencing Kit, Pharmacia) werden zugegeben, die Probe wird 3 min bei 95° C aufgeköcht, auf Eis abgekühlt und auf einem Sequenziergel (siehe Anleitung zum  $^{17}$ Sequencing Kit, Pharmacia) aufgetragen. Eine Sequenzierungsreaktion wird als Längenstandard neben der Primer Extension-Reaktion aufgetragen. In der vorliegenden Arbeit wurden hierzu jeweils Sequenzierungsreaktionen der entsprechenden in pUC18 klonierten Gene mit dem auch bei der Primer Extension verwendeten Oligonukleotid durchgeführt, so dass die jeweiligen Transkriptions-Startpunkte direkt abgelesen werden konnten.

10 $\times$ Kinase-Puffer	500 mM	Tris-HCl, pH 7,6
	100 mM	MgCl <sub>2</sub>
	50 mM	DTT
	1 mM	Spermidin
	1 mM	EDTA
Hybridisierungs-P.	80% (v/v)	deionisiertes Formamid
	40 mM	PIPES, pH 6,4 (nicht autokl.)
	400 mM	NaCl
	1 mM	EDTA

## Material und Methoden

10 × RT-Puffer	500 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	50 mM	MgCl <sub>2</sub>
	50 mM	DTT
	50 mM	KCl
RT-Mix (pro Reaktion)	3,5 µl	4 mM dNTPs
	2,5 µl	10 × RT-Puffer
	1,25 µl	RNA Guard (Pharmacia)
	18 µl	(DEPC-) H <sub>2</sub> O

## Arbeiten mit Proteinen

### SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Analytische SDS-PAGE wurden in der Regel in Mini-Gelkammern von Bio-Rad mit Gelen der Größe 100 × 50 × 1 mm durchgeführt. Zur Herstellung der SDS-PAA-Gele wird zunächst das Trenngel (8-15 %) bis ca. 0,5-1 cm unter den späteren Rand der Taschen gegossen und mit 150 µl 2-Butanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wird das 2-Butanol entfernt, das Sammelgel gegossen und der Kamm eingesteckt. Nach dem vollständigen Polymerisieren wird der Kamm entfernt und das Gel in die Laufkammer eingespannt. Die Taschen werden mit Hilfe einer Spritze vorsichtig mit Laufpuffer ausgespült und Luftblasen am unteren Gelende entfernt.

Die Proben werden währenddessen in 5x Laemmli-Puffer aufgenommen, kurz aufgekocht und auf Eis abgekühlt. Nach dem Auftragen der Proben erfolgt der Lauf bei 100 V. Nach der Elektrophorese wird das Gel auseinandergebaut und das Sammelgel abgeschnitten. Das Trenngel wird 15 min mit Färbelösung angefärbt und das Gel schließlich zunächst für ca. 15 min in Schnellentfärber und anschließend für mehrere Stunden (evtl. über Nacht) in Entfärber geschwenkt. Das Gel kann zum Aufbewahrung auf Whatman 3MM-Papier oder zwischen Cellophan auf dem Geltrockner unter Vakuum getrocknet werden (2 h bei 80° C).

Zusammensetzung von Trenngelen unterschiedlicher Maschenweite  
Endvol. 10 ml (reicht für zwei Minigele); Angaben in ml

	6 %	8 %	10 %	12 %	15 %
H <sub>2</sub> O	5,3	4,6	4,0	3,3	2,3
30% Acrylamid-Mix (Roth)	2,0	2,7	3,3	4,0	5,0
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
10 % (w/v) SDS	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
10 % (w/v) APS	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008

Zusammensetzung des Sammelgels (5 %)

Endvolumen 5 ml:	3,4 ml	H <sub>2</sub> O
	0,83 ml	30% Acrylamid-Mix (Roth)
	0,63 ml	1 M Tris, pH 6,8
	0,05 ml	10% (w/v) SDS
	0,05 ml	10% (w/v) APS
	0,005 ml	TEMED

Zubereitung aus den Stammlösungen  
pro 100 ml

5x Laemmli	50 mM	Tris-HCl, pH 6,8	5 ml	1 M, pH 6,8
	2 % (w/v)	SDS	20 ml	10 % (w/v)
	5 % (v/v)	2-Mercaptoethanol	5 ml	
	0,005 % (w/v)	Bromphenolblau	50 mg	
	10 % (v/v)	Glycerin	10 ml	

	Konzentration / Zusammensetzung der Arbeitslösungen	Zubereitung aus den Stammlösungen pro 1 l
10x Laufpuffer	Tris	30,3 g
	Glycin	144,1g
	1 % (w/v) SDS	100 ml 10 % (w/v)
Coomassie-Lsg	45 % (v/v) Ethanol	450 ml
	10 % (v/v) Essigsäure	100 ml Eisessig
	0,1 % (w/v) Coomassie R250	1 g
Schnellentfärber	45 % (v/v) Ethanol	450 ml
	10 % (v/v) Essigsäure	100 ml Eisessig
Entfärber	10 % (v/v) Essigsäure	100 ml Eisessig
Broad Range Protein Standard (Bio-Rad)		
200 kDa		
116 kDa		
97 kDa		
66 kDa		
45 kDa		
31 kDa		
21,5 kDa		
14 kDa		
6,5 kDa		

## Zweidimensionale (2 D-) Gelelektrophorese

Selbst bei längeren Laufstrecken als diese mit Minigelen möglich sind ist die Auftrennung komplexer Proteingemische (z. B. Zellysate) nur eingeschränkt möglich, da viele unterschiedliche Proteine im SDS-PAGE das gleiche (scheinbare) Molekulargewicht aufweisen. Durch die vorhergehende Auftrennung der Proteine nach ihrem isoeletrischen Punkt (Isoelektrische Fokussierung) als erste Dimension wird nach der anschließenden Gößensortierung eine Auflösung erreicht, die um Größenordnungen höher ist als die einer einfachen SDS-PAGE.

Für diese Arbeit wurde mit der „PROTEAN II xi“ Kammer von Bio-Rad und den dazugehörigen Protokollen gearbeitet.

## Isoelektrische Fokussierung (IEF, 1. Dimension)

Bevor die Gele für die IEF gegossen werden können werden die Glasröhrchen ÜN in einer Lösung aus 10 % (w/v) KOH in 70 % (v/v) EtOH geschwenkt und so gereinigt. Am nächsten Morgen werden die Röhrchen mit reichlich Wasser gespült und mit Pressluft getrocknet. Für reproduzierbare Gradienten ist eine gleichmäßige Länge der Gele außerordentlich wichtig. Daher werden die Röhrchen außen mit Filzstift bei 13 cm markiert und späte bis genau zu dieser Marke mit der entgasten Gellösung gefüllt und 20 min zum Polymerisieren stehen gelassen.

Zum Auftrag der Proben werden diese 1:10 in IUE (iso urea solution E) verdünnt, scharf abzentrifugiert und der Überstand mit einer Spritze in die Röhrchen überführt. Um Blasen zu vermeiden ist es am zuverlässigsten die Röhrchen zunächst mit dem oberen Laufpuffer zu befüllen und diesen dann mit den (dichteren) Proben zu unterschichten. Die Proben sollten parallel im Triplikat gefahren werden. Nachdem die obere und untere Kammer mit den jeweiligen Laufpuffern gefüllt sind erfolgt ÜN die Fokussierung bei folgenden Bedingungen:

2 h bei 200 V,  
2 h bei 500 V,  
8 h bei 800 V

## Material und Methoden

Nach Beendigung des Laufs werden die Gele am oberen Enden mit Bromphenolblau gefärbt und dann mit einer Spritze aus den Glasröhrchen heraus auf „Schiffchen“ aus Aluminiumfolie gedrückt und sofort auf Trockeneis eingefroren. Die Lagerung erfolgt bei  $-20^{\circ}\text{C}$  oder besser bei  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Detergenzlösung	0,3 g CHAPS
	100 $\mu\text{l}$ IGEPAL CA-630 (Sigma)
	900 $\mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}$
Gel	11 g Harnstoff
	3 ml 30 % Acrylamid/bis
	0,5 ml Ampholyte pH 3-10
	0,25 ml Ampholyte pH 4-6,5
	0,25 ml Ampholyte pH 5-8
	1 ml Detergenzlösung
	7 ml $\text{H}_2\text{O}$
	20 $\mu\text{l}$ TEMED
	40 $\mu\text{l}$ 10 % (w/v) APS
IUE	0,1 g DTT
	0,4 g CHAPS
	500 $\mu\text{l}$ Ampholyte pH 3-10
	6 ml $\text{H}_2\text{O}$
oberer Laufpuffer	0,8 g/l NaOH ( $\Rightarrow$ 20 mM)
unterer Laufpuffer	0,57 ml/l $\text{H}_3\text{PO}_4$ ( $\Rightarrow$ 10 mM)
Bromphenolblau-Lösung	
	50 % (v/v) Glycerin in $\text{H}_2\text{O}$
	0,05 % (w/v) Bromphenolblau

## SDS-PAGE (2. Dimension)

Die Prozedur entspricht im Wesentlichen der bereits beschriebenen. Allerdings sind die verwendeten Gele deutlich größer und werden ohne Sammelgel gegossen. Um eine gleichmäßige Polymerisation des Gels zu gewährleisten wird außerdem kein SDS in die Gellösung gegeben. Das im Laufpuffer enthaltene SDS reicht für die effiziente Elektrophorese aus. Nach zwei Stunden Polymerisationszeit können die Gele beladen werden. Dazu wird ein IEF-Gel aufgetaut und für 5 min mit Äquilibrierungspuffer inkubiert. Dann lässt man es vorsichtig von der Alufolie blasenfrei auf den oberen Rand des PAGE-Gels gleiten. Daneben wird noch ein Agarosestückchen mit einem Größenstandard aufgetragen. Die aufgetragenen Gele werden mit 1 % (w/v) in Laufpuffer fixiert. Die Auftrennung erfolgt UN bei 15-20 mA.

Nach der zweiten Dimension wurden die Gele Silber-gefärbt oder einer Western Blot Analyse unterzogen.

## Silber-Färbung von SDS-PAA-Gelen

Die zu färbenden Gele werden unmittelbar nach Beendigung der Elektrophorese für mindestens 1 h in Fixierer geschwenkt und anschließend 2 min in 30%igem EtOH gewaschen, bevor sie für 1 min in Oxidierer-Lsg. überführt werden. Danach werden sie 3 x für je 1 min in Wasser gewaschen und dann für 1 h in Silbernitrat-Lsg. inkubiert. Nach zwei kurzen Waschschritten von je 30 sec. in Wasser werden die Gele mit Entwickler bedeckt und so lange geschwenkt bis die Färbung die gewünschte Intensität erreicht hat. Die Reaktion wird dann durch zweimaliges Waschen mit Wasser gestoppt und die Gele in Fixierer aufbewahrt. Wahlweise können sie auch mit möglichst wenig Flüssigkeit in „Gefrierbeuteln“ eingeschweißt werden. Vor dem Einscannen oder Trocknen der Gele sollte man sie in Wasser oder 10 % (v/v) Essigsäure wieder zu ihrer ursprünglichen Größe quellen lassen.

Fixierer	45 % (v/v)	EtOH
	10 % (v/v)	Essigsäure in H <sub>2</sub> O
Oxidierer	0,66 µl/ml	Formaldehyd
	0,5 µl/ml	Na-Thiosulfat (43 % (w/v) in H <sub>2</sub> O) in H <sub>2</sub> O
Silbernitratlsg.	1 mg/ml	AgNO <sub>3</sub>
	0,66 µl/ml	Formaldehyd in H <sub>2</sub> O
Entwickler	60 mg/ml	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
	0,5 µl/ml	Formaldehyd in H <sub>2</sub> O

## Überexpression und Reinigung mit dem QIAexpressionist-System (Qiagen)

Das von Qiagen optimierte System benutzt zwei einfache und etablierte Elemente: 1. Die Überexpression eines Gens von einem starken, LacR-reprimierten (IPTG-induzierbaren) Promoter und 2. die hochaffine Bindung von Reihen von Imidazolringen an eine Matrix komplexierte Nickelionen. Dazu wird die kodierende Sequenz des gewünschten Proteins im passenden Leseramen in einen vorgefertigten Vektor kloniert, der stromaufwärts einen optimierten *lac*-Promoter, eine Ribosomenbindestelle (RBS) und die Sequenz für sechs Histidine bereitstellt (pQE30, 31, 32). Das Konstrukt wird dann in den Überexpressionsstamm *E. coli* M15::pREP4 transformiert. Das Plasmid pREP4 stellt eine ausreichende Konzentration an Lac-Repressor in der Zelle sicher. Die Induktion der Proteinexpression erfolgt durch Zugabe von 0,01-1 mM IPTG zum Wachstumsmedium.

Es ist empfehlenswert nach der Transformation des Überexpressionskonstruktes mehrere Klone im kleinen Maßstab (10 ml) auf ihre Inuzierbarkeit zu testen, da hier erhebliche Unterschiede auftreten können. Ebenso wichtig ist die experimentelle Auswahl des richtigen Wachstumsmediums für die Anzucht und Überexpression. Je nach Medien-Zusammensetzung werden die Fusionsproteine zum Teil sehr unterschiedlich stark überproduziert oder liegen als unlösliche Einschlusskörperchen (inclusion bodies) vor. Generell sollte angestrebt werden das gewünschte Protein in seiner löslichen Form zu erhalten. Dies vereinfacht einerseits die anschließende Reinigung und stellt außerdem eine möglichst native Konformation des Fusionsproteins sicher.

Die Überexpression für die anschließende Reinigung erfolgt im Liter-Maßstab. Dazu wird 1 l vorgewärmtes Medium (Km 30 µg/ml, Ap 100 µg/ml) mit 20 ml einer Übernachtskultur (ÜNK) angeimpft, auf 2-3 2 l-Erlenmeier Kolben verteilt und unter kräftigen Schütteln (ca. 200 rpm) bei 37 ° C bebrütet. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,4 werden 2 ml der Kultur als Nullwert abgenommen, die enthaltenen Zellen abzentrifugiert und in 100 µl 5x Laemmli-Puffer aufgenommen. Der Rest der Kultur wird auf eine geeignete IPTG-Konzentration eingestellt und weitere 3-4 Stunden inkubiert.

Bevor die Zellen abzentrifugiert werden (JA-10, 8000 rpm, 30 min, 30 ° C) werden erneut 11 ml der Kultur abgenommen und 1 ml davon wie der Nullwert weiterbehandelt. Der Rest der Probe wird nach der Zentrifugation einmal mit TE gewaschen, in 2 ml aufgenommen und anschließend per Ultraschall lysiert. Dabei ist die Suspension immer auf Eis zu halten. Das Lysat wird 15 min bei 4 ° C und voller Geschwindigkeit in der Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert und der Überstand möglichst vollständig in ein neues Gefäß überführt und 200 µl davon mit 50 µl 5x Laemmli vermischt. Das Pellet wird in 200 µl 5x Laemmli aufgenommen. Die vier Proben werden nun 1 min gekocht und sofort auf Eis abgekühlt um die Viskosität der Lysate zu verringern. Je 20 µl der Ansätze werden dann auf ein vorbereitetes SDS-PAGE-Gel aufgetragen und aufgetrennt. Nach der Coomassie Färbung lässt sich so der Erfolg der Überexpression sowie die Löslichkeit des Proteins ermitteln.

Während der Elektrophorese wird das Pellet des Hauptanteils der Kultur einmal in 40 ml FP-Puffer gewaschen, in 50 ml-Greiner Röhrchen abzentrifugiert und ÜN bei -70 ° C eingefroren.

## Reinigung löslicher Proteine

Alle Lösungen und aufgefängenen Fraktionen werden auf Eis gehalten! Meist erfolgt die gesamte Reinigung bei 4 ° C.

Das Zellpellet vom Vortag wird mit FP-Puffer auf 40 ml aufgefüllt und zügig resuspendiert. Die Suspension wird dann mittels „French Press“ lysiert. Dabei werden die Zellen unter hohem Druck (ca. 100 psi) durch eine feine Öffnung gepresst und durch die plötzliche Druckentlastung zum Platzen gebracht. Es handelt sich dabei um eine gleichermaßen effiziente wie für die Proteine schonende Methode des Zellaufschlusses.

Das Lysat auf JA-20 Röhrchen aufgeteilt und 30 min bei 15000 rpm und 4 ° C abzentrifugiert. Der Überstand wird langsam auf eine mit 5-10 ml Ni-NTA-Agarose gepackte und FP-äquilibrierte Chromatographiesäule aufgetragen und der Durchlauf aufgefangen. Es folgt ein Waschschritt mit ca. 200 ml Waschpuffer. Der Waschpuffer wird in mehreren Fraktionen aufgefangen. Die Elution erfolgt durch einen linearen Gradienten von Waschpuffer zu Waschpuffer mit 250 mM Imidazol mit 20 ml Gesamtvolumen und anschließend noch 10 ml Waschpuffer mit 250 mM Imidazol. Es werden Elutionsfraktionen von 1,3 ml gesammelt.

Von jeder zweiten Elutionsfraktion und dem Durchlauf sowie den Waschfraktionen werden 10 µl durch SDS-PAGE analysiert. Die besten Elutionsfraktionen werden vereinigt und ÜN gegen das 1000fache Volumen an Aufbewahrungspuffer dialysiert.

## Reinigung unlöslicher Proteine aus Einschlusskörperchen

Der Zellaufschluss und die Aufreinigung erfolgen im Wesentlichen wie für lösliche Proteine beschrieben. Allerdings wird nach der French Press und der anschließenden Zentrifugation das Pellet und nicht der Überstand weiterverwendet. Dieses wird dann aus dem Zentrifugeröhrchen herausgekratzt und auf Eis in 20 ml Triton Puffer resuspendiert. Nach 30 min Zentrifugation im JA-20 Rotor bei 20000 rpm und 4 ° C wird der Überstand wiederum abgenommen und das Pellet in 30 ml Guanidin (Gu-) Puffer resuspendiert und 1 Stunde auf Eis gerührt, bevor erneut wie nach dem Waschschritt abzentrifugiert wird. Der geklärte Überstand wird auf die mit Gu-Puffer äquilibrierte Säule aufgetragen und mit 100 ml Gu-Puffer gewaschen. Im Verlauf eines Gradienten von Gu-Waschpuffer zu Waschpuffer mit einem Gesamtvolumen von 50 ml werden die Proteine an der Säule renaturiert und dann noch mit weiteren 50 ml ohne Guanidin weiter gewaschen.

Die Elution und Dialyse erfolgt wieder wie bei der nativen Reinigung.

	Konzentration / Zusammensetzung der Arbeitslösungen	Zubereitung aus den Stammlösungen pro 100 ml
FP-Puffer	50 mM Tris, pH7,5	5 ml 1 M, pH 7,5
	50 mM KCl	2 ml 2,5 M
	1 mM PMSF	1 ml 100 mM in EtOH o. 17,4 mg
	1 mM DTT	0,1 ml 1 M
Waschpuffer	50 mM Tris, pH7,5	5 ml 1 M, pH 7,5
	50 mM KCl	2 ml 2,5 M
	1 mM PMSF	1 ml 100 mM in EtOH
	1 mM DTT	0,1 ml 1 M
	20 mM Imidazol	2 ml 1 M
	10 % (v/v) Glycerin	10 ml
Elutionspuffer	50 mM Tris, pH7,5	5 ml 1 M, pH 7,5
	50 mM KCl	2 ml 2,5 M
	1 mM PMSF	1 ml 100 mM in EtOH
	1 mM DTT	0,1 ml 1 M
	250 mM Imidazol	25 ml 1 M
	10 % (v/v) Glycerin	10 ml

Aufbew.-Puffer	50 mM	Tris, pH7,5	5 ml	1 M, pH 7,5
	50 mM	KCl	2 ml	2,5 M
	1 mM	PMSF	1 ml	100 mM in EtOH
	1 mM	DTT	0,1 ml	1 M
	20 % (v/v)	Glycerin		
Triton-Puffer	50 mM	Tris, pH7,5	5 ml	1 M, pH 7,5
	100 mM	KCl	4 ml	2,5 M
	1 mM	PMSF	1 ml	100 mM in EtOH
	1 mM	DTT	0,1 ml	1 M
	1 % (v/v)	Triton X 100	1 ml	
Gu-Puffer	6 M	GuHCl	57,32 g	
	50 mM	Tris, pH7,5	5 ml	1 M, pH 7,5
	50 mM	KCl	2 ml	2,5 M
	1 mM	PMSF	1 ml	100 mM in EtOH
	1 mM	DTT	0,1 ml	1 M
	20 mM	Imidazol	2 ml	1 M
	10 % (v/v)	Glycerin	10 ml	

## Vorbereitung von Dialyseschläuchen

Dazu werden vor dem 1-2 m Dialyseschlauch in Stücke von 5-10 cm Länge geschnitten und zunächst in 1,5 l 1 % (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in Wasser mit einer Spatelspitze EDTA aufgeköcht und anschließend durch mehrmaliges Kochen in frischem Wasser bis auf einen pH von ca. 5,5 neutralisiert. Um Siedeverzüge zu vermeiden sollte eine umgedrehte Glaspipette als Siedekapillare verwendet werden. Danach wird das Material in 1 mM EDTA autoklaviert und bei 4 ° C aufbewahrt.

## Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde der Bio-Rad Protein Micro Assay mit BSA als Standard verwendet. Der Assay folgt der Methode von Bradford (1976). Dazu wird ein Farbstoffkonzentrat mit einer geeigneten Verdünnung einer Proteinlösung gemischt und die Absorption des sich bildenden blauen Komplexes bei 595 nm im Photometer gemessen. Anhand einer parallel erstellten Eichkurve von bekannten Proteinkonzentrationen kann die Konzentration der Proben ermittelt werden.

Um möglichst genaue Messergebnisse zu erzielen sollte die Zeit zwischen der Zugabe des Farbreagens und der photometrischen Messung kurz und für alle Proben gleich lang gehalten werden.

## Western Blot

### Übertragung der Proteine auf eine Nylon Membran

Im Gegensatz zum Verfahren beim Southern-Blot werden Proteine meist durch ein elektrisches Feld und nicht durch Flüssigkeitsströme auf die Blot-Membran übertragen. Bei der halbtrockenen Blot-Methode dienen getränkte Filterpapiere als einzige Pufferreservoir.

Dazu werden die Graphitelektroden zunächst gut mit Wasser abgespült und für jedes Gel, das gebロットet werden soll, 6 Blatt dickes Filterpapier (Whatman™ 3MM) und zusätzlich noch einmal 12 weitere auf Gelgröße zurechtgeschnitten. Dann werden 6 Blatt Filterpapier in Anodenpuffer I getränkt und auf die Anodenplatte gelegt. Es folgt ein Transferpaket aus 3 Lagen Filterpapier mit Anodenpuffer II, der mit Anodenpuffer II befeuchteten Nylon-Membran (Hybond™-C, Amersham), dem Gel und 3 Lagen mit Kathodenpuffer getränktem Filterpapier. Es können problemlos 3 weitere solcher Transferpakete folgen bevor abschließend noch 6 weitere Filter mit Kathodenpuffer und die Kathodenplatte aufgelegt werden. Bei jeder neuen Lage ist genau darauf zu achten, dass keine Luftblasen zwischen den Schichten gefangen bleiben. Diese würden an der entsprechenden Stelle des

Gels eine Übertragung der Proteine verhindern. Sicherheitshalber sollte daher evtl. eingefangene Luft mithilfe einer Glaspipette „herausgerollt“ werden.

Die Übertragung erfolgt während einer Stunde bei einem konstanten Strom von 0,8 mA/cm<sup>2</sup>.

Zur Überprüfung wird die Membran nach dem Transfer ca. 15 min in Ponceau S Lösung (2 % (w/v) in TCA, Roth) gefärbt und so lange in Wasser gewaschen, bis die Proteinbanden deutlich zu sehen sind. Dann wird die Markerspür abgeschnitten, zwischen Filterpapier getrocknet und dunkel aufbewahrt.

## Nachweis der Proteine mit Antikörpern und Chemilumineszenz (ECL-Western Blotting Kit, Amersham)

Der Rest der Membran wird zur vollständigen Entfärbung und zur Absättigung noch unbesetzter Bindestellen für 1-2 Stunden in Blockpuffer (5 % (w/v) Magermilchpulver, 0,2 % (v/v) Tween 20 in 1x TBS) geschwenkt. Die Inkubation mit dem ersten (experimentellen) Antikörper erfolgt in frischem Blockpuffer für mindestens eine Stunde oder ÜN. Danach wird dreimal für je 10 min mit Blockpuffer gewaschen. Der zweite Antikörper bindet spezifisch an den ersten und dient zu dessen Nachweis. dazu ist er kovalent mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt (s. u.). Die notwendige Verdünnung der verwendeten Antikörper/Antiseren kann, je nach Qualität sehr stark schwanken (1:200 – 1:10000) und muss experimentell ermittelt werden. Ein gebräuchlicher Anfangswert ist 1:1000. Nach der Bindung des zweiten Antikörpers (1 h, in Blockpuffer) wird dreimal für 10 min mit 1x TBS gewaschen und auf einen Bogen Frischhaltefolie gelegt. Während des letzten Waschschriffs wird entsprechend der Membrangröße aus den beiden Detektionslösungen ein 1:1 Gemisch vorbereitet (0,125 ml/cm<sup>2</sup>) und die Membran damit vollständig überschichtet. Nach genau einer Minute lässt man die Membran abtropfen und auf Filterpapier gerade so lange trocknen, bis die Oberfläche nicht mehr glänzt. Dann legt man die Membran zwischen zwei Folien in eine Expositionskassette und legt für zunächst 5-30 sec einen geeigneten Film (Hyperfilm-ECL) auf.

## Gelretardationsexperimente

Gelretardationsexperimente dienen dem Nachweis und der Analyse von Protein-DNA-Interaktionen. Dabei macht man sich das unterschiedliche Laufverhalten bei der Elektrophorese der ausgebildeten Komplexe im Vergleich zu den Einzelkomponenten zunutze. In der Regel werden dazu als Sonde relativ kurze DNA-Fragmente (ca. 25-100 bp) eingesetzt, von denen bekannt ist, dass sie die Zielsequenz für die Bindung des jeweiligen Proteins enthalten.

Da für *Tex* ein solches Motiv bisher nicht bekannt ist wurde für diese Arbeit ein 335 bp großer Abschnitt aus dem Promotor-Bereich und dem 5'-Ende der kodierenden Sequenz des *tex*-Gens aus *E. coli* verwendet.

## Markierung der DNA-Sonde

Der als Sonde ausgewählte Bereich wird in einer PCR amplifiziert und dabei über die Primer an den Enden mit Restriktionsschnittstellen versehen. Das gewonnene Fragment wird über ein Säulchen gereinigt und die Enden mit dem entsprechenden Enzym geschnitten. Die „klebrigen“ Enden können dann nach einer erneuten Aufreinigung in einer Klenow-Auffüllreaktion mit radioaktiven Nukleotiden markiert werden. Für diese Arbeit wurde an den Enden der Sonde je eine *EcoRI* Schnittstelle eingefügt (G/AATTC) und nach der Spaltung mit radioaktivem dATP und dTTP aufgefüllt.

1 µg	geschnittenes PCR-Produkt
2 µl	10x One-Phor-All-Buffer
1 µl	2 mM dCTP
1 µl	2 mM dGTP
1 µl	[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]dATP (10 µCi)
1 µl	[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]dTTP (10 µCi)
2 µl	Klenow-Fragment (1 U/µl)
ad 20 µl	H <sub>2</sub> O

Der Ansatz wird eine halbe Stunde bei 37 ° C inkubiert und danach die Reaktion durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 gestoppt. Die freien Nukleotide werden mit Hilfe einer NucTrap™-Säule (Stratagene) entfernt. Dazu wird der Markierungsansatz mit 1x STE auf 70 µl aufgefüllt und auf die mit 120 µl 1x STE äquilibrierte Säule gegeben und durchgedrückt. Anschließend spült man die Säule noch einmal mit 70 µl 1x STE. Das gesamte Eluat wird in einem Eppendorf-Cap aufgefangen. Zur Aktivitätsbestimmung wird 1 µl des Eluats im Szintillationszähler gemessen.

		Zubereitung aus den Stammlösungen pro 10 ml	
1x STE	100 mM NaCl	0,2 ml	5 M
	20 mM Tris-HCl, pH 7,5	0,2 ml	1 M, pH 7,5
	10 mM EDTA, pH 8,0	0,2 ml	0,5 M, pH 8,0

## Komplexbildung und elektrophoretische Auftrennung

Für die Ausbildung der Protein-DNA-Komplexe wird der Bindeansatz in folgender Reihenfolge zusammenpipettiert:

ad 15 µl	H <sub>2</sub> O
3 µl	5x HBP
1,5 µl	50 mM MgSO <sub>4</sub>
1 µl	15 µg/µl BSA
1 ml	1 µg/µl poly(dI-dC)
10-500 ng	gereinigtes Protein
1,5 x 10 <sup>5</sup> cpm	DNA-Sonde

Der Ansatz wird gut durchmischt, für 3 min bei 37 ° C und weitere 27 min auf Eis inkubiert.

Die Auftrennung erfolgt in einem 5%igem nativen Polyacrylamidgel (200 x 300 x 1,5 mm). Nach dem Auspolymerisieren der Gellösung (2 h-ÜN) lässt man das Gel ca. 1 h bei 250 V mit 0,4x TBE als Laufpuffer vorlaufen, bis der Strom auf etwa 15 mA abgesunken ist. Der Laufpuffer wird dann gegen frische ausgetauscht und die Taschen des Gels gut ausgespült. Die Bindeansätze werden dann neben einer Spur mit Farbpuffer aufgetragen und bei 250 V aufgetrennt, bis die Blaufront des Farbpuffers eine Laufstrecke von ca. 17 cm zurückgelegt hat.

Nach Beendigung des Laufs wird das Gel auf Whatmann™ 3MM aufgezogen und 2,5 h bei 80 ° C unter Vakuum getrocknet. Die anschließende Exposition eines Röntgenfilms erfolgt bei -20 ° C für 1 h bis drei Tage.

		Zubereitung aus den Stammlösungen pro 10 ml	
5x HBP	100 mM HEPES, pH 7,9	1 ml	1 M; pH 7,9
	250 mM KCl	1 ml	2,5 M
	5 mM EDTA, pH 8,0	0,1 ml	0,5 M, pH 8,0
	5 mM DTT	50 µl	1 M
	15 % (v/v) Ficoll	1,5 ml	
Farbpuffer	10 mM HEPES, pH 7,9	0,1 ml	1 M, pH 7,9
	10 % (v/v) Glycerin	1 ml	
	0,01 % (w/v) Bromphenolblau	1 mg	
5 %, natives PAA-Gel	78,5 ml H <sub>2</sub> O		
	4,0 ml 10x TBE		
	16,7 ml 30 % Acrylamid/bis		
	0,7 ml 10 % (w/v) APS		
	0,1 ml TEMED		

## Festphasen Bindeassays

Bei dieser Möglichkeit Wechselwirkungen von Proteinen mit anderen Molekülen zu untersuchen macht man sich die zur Reinigung angehängten Histidinreste (s. o.) zunutze. Über diesen „His-Tag“ wird das Protein an Ni-NTA-Agarose-umhüllte Magnetkügelchen (Qiagen) immobilisiert. Die Kügelchen lassen sich aufgrund ihrer geringen Größe leicht in einem Puffer mit möglichen Interaktionspartnern in einem Reaktionsgefäß resuspendieren. Nach einer Inkubation können sie einfach mit einem Magneten, der aussen an das Gefäß gehalten wird, vom Rest des Ansatzes abgetrennt werden. Auf diese Weise können Bindepartner auch aus einem komplexen Gemisch heraus gefischt werden und/oder quantifiziert werden.

In dieser Arbeit wurden Bindestudien mit verschiedenen Tex-Konstrukten und radioaktiv markierter Gesamt-RNA oder chromosomaler DNA von *E. coli* durchgeführt. Außerdem wurden aus *E.coli*-Gesamt-RNA gebundene Sequenzen mit Zufalls-Primern revers transkribiert kloniert und sequenziert.

## Bindeassays mit markierten Nukleinsäuren

Zur radioaktiven Markierung von gesamt RNA wurden ÜNK von *E. coli* W3110 in M9-Medium 1:100 verdünnt und ab einer OD<sub>600</sub> von 0,05 für drei Stunden mit 10 µCi/ml [5, 6 <sup>3</sup>H] Uridin bei 37 ° C kräftig geschüttelt. Kulturen zur Gewinnung markierter chromosomaler DNA wurden ÜNK von *E. coli* W3110 in M9-Medium mit 5 µCi/ml [<sup>3</sup>H] Thymidin angezogen. Die Nukleinsäuren wurden dann nach den oben beschriebenen Protokollen aufgereinigt.

Für die Bindestudien werden 20 µl der Kügelchen-Vorrats-Suspension zunächst in 500 µl Protein-Bindepuffer (PBP) äquibriert und dabei durch Invertieren in Suspension gehalten. Dann wird der Puffer durch 20 µg His-markiertes Protein in 500 µl PBP ersetzt und der Protein-Bindeansatz für eine halbe Stunde beständig invertiert. Dazu werden die Eppendorf-Caps mit den Ansätzen in einer Schaumstoffhalterung an einem Inkubationsrad befestigt und dieses auf eine mittlere Umdrehungsgeschwindigkeit eingestellt. Währenddessen werden für die Nukleinsäure- (NS-) Bindeansätze unterschiedliche Mengen an Msp I-verdauter, chromosomaler DNA oder gesamt RNA mit 5x Bindepuffer (BP) und Wasser auf ein Volumen von 500 µl und eine Pufferkonzentration von 1x eingestellt. Nach der Proteinbindung werden die Kügelchen mit dem immobilisierten Protein ein mal mit BP gewaschen und dann ½ h mit den NS-Bindeansätzen wie vorher inkubiert. Es folgen drei Waschschrte mit jeweils 500 µl BP. Die Elution der gebundenen NS erfolgt in 100 µl Elutionspuffer (EP). Der Elutionsüberstand wird komplett im Szintillator gemessen.

## Bindeassays zum „Fischen“ von Bindesequenzen

Die Abfolge der einzelnen Wasch- und Inkubationsschritte ist gleich wie oben beschrieben. Es werden lediglich 75 µl der Kügelchen-Vorrats-Suspension und etwa 70 mg Protein eingesetzt. Zur Bindung werden dann 50-100 µg RNA eingesetzt. Die Eluate werden mit 1 Vol. Isopropanol gefällt und nach der reversen Transkription mit Zufalls-Primern (Stratagene, RT-PCR Kit) in pUC18 Sma I BAP (Pharmacia, Ready-To-Go Kit) kloniert.

	Konzentration / Zusammensetzung der Arbeitslösungen	Zubereitung aus den Stammlösungen
5x PBP	100 mM Tris, pH7,2	10 ml 1 M, pH 7,2
	250 mM KCl	10 ml 2,5 M
	5 mM PMSF	5 ml 100 mM in EtOH
	5 % (v/v) Tween 20	5 ml 10 % (v/v)
		70 ml H <sub>2</sub> O
5x BP	100 mM Tris, pH7,2	10 ml 1 M, pH 7,5
	250 mM KCl	10 ml 2,5 M
	5 mM PMSF	5 ml 100 mM in EtOH
	0,5 % (v/v) Tween 20	0,5 ml 10 % (v/v)
	100 mM Imidazol	10 ml 1 M
	64,5 ml H <sub>2</sub> O	

Elutionspuffer	20 mM	Tris, pH7,2	200 µl	1 M, pH 7,2
	50 mM	KCl	200 µl	2,5 M
	1 mM	PMSF	100 µl	100 mM in EtOH
	1 % (v/v)	Tween 20	10 µl	10 % (v/v)
	20 mM	Imidazol	200 µl	1 M
	100 mM	NaCl	200 µl	5 M
			9,09 ml	H <sub>2</sub> O

## Literatur

- Aarons, S., Abbas, A., Adams, C., Fenton, A. & O'Gara, F. (2000).  
A regulatory RNA (PrrB RNA) modulates expression of secondary metabolite genes in *Pseudomonas fluorescens* F113.  
*J Bacteriol* **182**(14), 3913-9.
- Altier, C., Suyemoto, M., Ruiz, A. I., Burnham, K. D. & Maurer, R. (2000).  
Characterization of two novel regulatory genes affecting *Salmonella* invasion gene expression.  
*Mol Microbiol* **35**(3), 635-46.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997).  
Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.  
*Nucleic Acids Res* **25**, 3389-402.
- Atkins, P. W. (1990)  
Physikalische Chemie, 1. Aufl., Hrsg. A. Höpfer  
Wiley-VCH, Weinheim
- Ayers, D. J., Sunshine, M. G., Six, E. W. & Christie, G. E. (1994).  
Mutations affecting two adjacent amino acid residues in the alpha subunit of RNA polymerase block transcriptional activation by the bacteriophage P2 Ogr protein.  
*J Bacteriol* **176**(24), 7430-8.
- Bae, W., Xia, B., Inouye, M. & Severinov, K. (2000).  
*Escherichia coli* CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(14), 7784-9.
- Bläsi, U., O'Connor, M., Squires, C. L. & Dahlberg, A. E. (1999).  
Misled by sequence complementarity: does the DB-anti-DB interaction withstand scientific scrutiny?.  
*Mol Microbiol* **33**(2), 439-41.
- Boni, I. V., Artamonova, V. S. & Dreyfus, M. (2000).  
The last RNA-binding repeat of the *Escherichia coli* ribosomal protein S1 is specifically involved in autogenous control.  
*J Bacteriol* **182**(20), 5872-5879.
- Boni, I. V., Isaeva, D. M., Musychenko, M. L. & Tzareva, N. V. (1991).  
Ribosome-messenger recognition: mRNA target sites for ribosomal protein S1.  
*Nucleic Acids Res* **19**(1), 155-62.
- Boni, I. V., Zlatkin, I. V. & Budowsky, E. I. (1982).  
Ribosomal protein S1 associates with *Escherichia coli* ribosomes by means of protein-protein interactions.  
*Eur J Biochem* **121**(371-6).
- Boucher, P. E., Murakami, K., Ishihama, A. & Stibitz, S. (1997).  
Nature of DNA binding and RNA polymerase interaction of the *Bordetella pertussis* BvgA transcriptional activator at the fha promoter.  
*J Bacteriol* **179**(5), 1755-63.
- Boucher, P. E. & Stibitz, S. (1995).  
Synergistic binding of RNA polymerase and BvgA phosphate to the pertussis toxin promoter of *Bordetella pertussis*.  
*J Bacteriol* **177**(22), 6486-91.
- Brandi, A., Spurio, R., Gualerzi, C. O. & Pon, C. L. (1999).  
Massive presence of the *Escherichia coli* 'major cold-shock protein' CspA under non-stress conditions [published erratum appears in EMBO J 1999 May 4;18(9):2670].  
*Embo J* **18**(6), 1653-9.
- Bycroft, M., Hubbard, T. J., Proctor, M., Freund, S. M. & Murzin, A. G. (1997).  
The solution structure of the S1 RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold.  
*Cell* **88**(2), 235-42.

- Carbonetti, N. H., Fuchs, T. M., Patamawenu, A. A., Irish, T. J., Deppisch, H. & Gross, R. (1994).  
Effect of mutations causing overexpression of RNA polymerase alpha subunit on regulation of virulence factors in *Bordetella pertussis*.  
*J Bacteriol* **176**(23), 7267-73.
- Carbonetti, N. H., Romashko, A. & Irish, T. J. (2000).  
Overexpression of the RNA polymerase alpha subunit reduces transcription of Bvg-activated virulence genes in *Bordetella pertussis*.  
*J Bacteriol* **182**(2), 529-31.
- Chen, H., Bjerknes, M., Kumar, R. & Jay, E. (1994).  
Determination of the optimal aligned spacing between the Shine-Dalgarno sequence and the translation initiation codon of *Escherichia coli* mRNAs.  
*Nucleic Acids Res* **22**(23), 4953-7.
- Christiansen, L. & Pedersen, S. (1981).  
Cloning, restriction endonuclease mapping and post-transcriptional regulation of rpsA, the structural gene for ribosomal protein S1.  
*Mol Gen Genet* **181**(4), 548-51.
- Chomczynski, P. u. S., N. (1987).  
Single-step method of RNA isolation by acid Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.  
*Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Company, M., Arenas, J. & Abelson, J. (1991).  
Requirement of the RNA helicase like protein PRP22 for release of messenger RNA from slicosomes.  
*Nature* **349**, 487-93.
- Cui, Y., Mukherjee, A., Dumenyo, C. K., Liu, Y. & Chatterjee, A. K. (1999).  
rsmC of the soft-rotting bacterium *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* negatively controls extracellular enzyme and harpin(Ecc) production and virulence by modulating levels of regulatory RNA (rsmB) and RNA-binding protein (RsmA).  
*J Bacteriol* **181**(19), 6042-52.
- Danchin, A. (1997).  
Comparison between the *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* genomes suggests that a major function of polynucleotide phosphorylase is to synthesize CDP.  
*DNA Res* **4**(1), 9-18.
- de Smit, M. H. & van Duin, J. (1994).  
Translational initiation on structured messengers. Another role for the Shine-Dalgarno interaction.  
*J Mol Biol* **235**(1), 173-84.
- Draper, D. E. & Reynaldo, L. P. (1999).  
RNA binding strategies of ribosomal proteins.  
*Nucleic Acids Res* **27**(2), 381-8.
- Draper, D. E. & von Hippel, P. H. (1978a).  
Nucleic acid binding properties of *Escherichia coli* ribosomal protein S1. I. Structure and interactions of binding site I.  
*J Mol Biol* **122**(3), 321-38.
- Draper, D. E. & von Hippel, P. H. (1978b).  
Nucleic acid binding properties of *Escherichia coli* ribosomal protein S1. II. Co-operativity and specificity of binding site II.  
*J Mol Biol* **122**(3), 339-59.
- Eklund, E. A., Lee, S. & Skalink, D. G. (1995).  
Cloning of a cDNA encoding a human DNA-binding protein similar to ribosomal protein S1.  
*Gene* **155**, 231-235.
- Etchegaray, J. P. & Inouye, M. (1999a).  
CspA, CspB, and CspG, major cold shock proteins of *Escherichia coli*, are induced at low temperature under conditions that completely block protein synthesis.  
*J Bacteriol* **181**(6), 1827-30.

## Literatur

- Etchegaray, J. P. & Inouye, M. (1999b).  
DB or not DB in translation?  
[published erratum appears in *Mol Microbiol* 1999 Nov;34(4):865].  
*Mol Microbiol* **33**(2), 438-9.
- Etchegaray, J. P. & Inouye, M. (1999c).  
Translational enhancement by an element downstream of the initiation codon in *Escherichia coli*.  
*J Biol Chem* **274**(15), 10079-85.
- Etchegaray, J. P., Xia, B., Jiang, W. & Inouye, M. (1998).  
Downstream box: a hidden translational enhancer.  
*Mol Microbiol* **27**(4), 873-4.
- Farwell, M. A., Roberts, M. W. & Rabinowitz, J. C. (1992).  
The effect of ribosomal protein S1 from *Escherichia coli* and *Micrococcus luteus* on protein synthesis in vitro by *E. coli* and *Bacillus subtilis*.  
*Mol Microbiol* **6**(22), 3375-83.
- Figge, R. M., Ramseier, T. M. & Saier, M. H., Jr. (1994).  
The mannitol repressor (MtlR) of *Escherichia coli*.  
*J Bacteriol* **176**(3), 840-7.
- Fountoulakis, M., Taká tcs, M.-F., Berndt, P., Langen, H. & Taká tcs, B. (1999).  
Enrichment of low abundance proteins of *Escherichia coli* by hydroxyapatite chromatography.  
*Electrophoresis* **20**(11), 2181-95.
- Fuchs, T. M. (1996).  
Differentielle Genregulation in *Bordetella pertussis*,  
Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Fuchs, T. M., Deppisch, H., Scarlato, V. & Gross, R. (1996).  
A new gene locus of *Bordetella pertussis* defines a novel family of prokaryotic transcriptional accessory proteins.  
*J Bacteriol* **178**(15), 4445-52.
- Gibson, T. J., Thompson, J. D. & Heringa, J. (1993).  
The KH domain occurs in a diverse set of RNA-binding proteins that include the antiterminator NusA and is probably involved in binnding to nucleic acid.  
*FEBS Lett.* **324**, 361-6.
- Giorginis, S. & Subramanian, A. R. (1980).  
The major ribosome binding site of *Escherichia coli* ribosomal protein S1 is located in its N-terminal segment.  
*J Mol Biol* **141**, 393-408.
- Goldenberg, D., Azar, I. & Oppenheim, A. B. (1996).  
Differential mRNA stability of the *cspA* gene in the cold-shock response of *Escherichia coli*.  
*Mol Microbiol* **19**(2), 241-8.
- Goldenberg, D., Azar, I., Oppenheim, A. B., Brandi, A., Pon, C. L. & Gualerzi, C. O. (1997).  
Role of *Escherichia coli* *cspA* promoter sequences and adaptation of translational apparatus in the cold shock response.  
*Mol Gen Genet* **256**(3), 282-90.
- Graumann, P. L. & Marahiel, M. A. (1998).  
A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain.  
*Trends Biochem Sci* **23**, 286-90.
- Greenblatt, J., Nodwell, J. R. & Mason, S. W. (1993).  
Transkriptional antitermination.  
*Nature* **364**, 401-6.
- Gribskov, M. (1992).  
Translational initiation factors IF-1 and eIF-2 alpha share an RNA-binding motif with prokaryotic ribosomal protein S1 and polynucleotide phosphorylase.  
*Gene* **119**(1), 107-11.

- Gussin, G. N., Olson, C., Igarashi, K. & Ishihama, A. (1992).  
Activation defects caused by mutations in *Escherichia coli* rpoA are promoter specific.  
*J Bacteriol* **174**(15), 5156-60.
- Hahn, V., Ebel, J. P. & Stiegler, P. (1987).  
Identification of functional regions in the C-terminal domain of *Escherichia coli* ribosomal protein S1 using monoclonal antibodies.  
*Biochem Biophys Res Commun* **149**(1), 34-9.
- Held, W. A., Mizushima, S. & Noruma, M. (1973).  
Reconstitution of *Escherichia coli* 30S ribosomal subunits from purified molecular components.  
*J Biol Chem* **248**, 5720-30.
- Hewlett, E. L. (1997).  
Pertussis: current concepts of pathogenesis and prevention.  
*Pediatr Infect Dis J* **16**(4 Suppl), S78-84.
- Hewlett, E. L. (1999).  
A commentary on the pathogenesis of pertussis.  
*Clin Infect Dis* **28 Suppl 2**, S94-8.
- Jiang, W., Hou, Y. & Inouye, M. (1997).  
CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone.  
*J Bacteriol* **179**, 7081-8.
- Kalapos, M. P., Paulus, H. & Sarkar, N. (1997).  
Identification of ribosomal protein S1 as a poly(A) binding protein in *Escherichia coli*.  
*Biochimie* **79**(8), 493-502.
- Karimova, G., Bellalou, J. & Ullmann, A. (1996).  
Phosphorylation-dependent binding of BvgA to the upstream region of the *cyxA* gene of *Bordetella pertussis*.  
*Mol Microbiol* **20**(3), 489-96.
- Karimova, G. & Ullmann, A. (1997).  
Characterization of DNA binding sites for the BvgA protein of *Bordetella pertussis*.  
*J Bacteriol* **179**(11), 3790-2.
- Koulich, D., Orlova, M., Malhotra, A., Sali, A., Darst, S. A. & Borukhov, S. (1996).  
Domain organization of *Escherichia coli* transcript cleavage factors GreA and GreB.  
*J Biol Chem* **272**(11), 7201-10.
- Langer, D., Lottspeich, F. & Zillig, W. (1994).  
A subunit of an archaeal DNA-dependent RNA polymerase contains the S1 motif.  
*Nucleic Acids Res* **22**, 694.
- Liu, M. Y., Gui, G., Wei, B., Preston, J. F., 3rd, Oakford, L., Yuksel, U., Giedroc, D. P. & Romeo, T. (1997).  
The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*.  
*J Biol Chem* **272**(28), 17502-10.
- Liu, M. Y. & Romeo, T. (1997).  
The global regulator CsrA of *Escherichia coli* is a specific mRNA-binding protein.  
*J Bacteriol* **179**(14), 4639-42.
- Lohrke, S. M., Nechaev, S., Yang, H., Severinov, K. & Jin, S. J. (1999).  
Transcriptional activation of *Agrobacterium tumefaciens* virulence gene promoters in *Escherichia coli* requires the *A. tumefaciens* RpoA gene, encoding the alpha subunit of RNA polymerase.  
*J Bacteriol* **181**(15), 4533-9.
- Mah, T. F., Li, J., Davidson, A. R. & Greenblatt, J. (1999).  
Functional importance of regions in *Escherichia coli* elongation factor NusA that interact with RNA polymerase, the bacteriophage lambda N protein and RNA.  
*Mol Microbiol* **34**(3), 523-37.

## Literatur

- Mayr, B., Kaplan, T., Lechner, S. & Scherer, S. (1996).  
Identification and Purification of a family of dimeric major cold shock protein homologs from the psychrotrophic *Bacillus cereus* WSBC 10201.  
*J Bacteriol* **178**(10), 2916-25.
- Melton, A. R. & Weiss, A. A. (1989).  
Environmental regulation of expression of virulence determinants in *Bordetella pertussis*.  
*J Bacteriol* **171**(11), 6206-12.
- Mogridge, J. & Greenblatt, J. (1998).  
Specific binding of *Escherichia coli* ribosomal protein S1 to boxA transcriptional antiterminator RNA.  
*J Bacteriol* **180**(8), 2248-52.
- Moll, I., Resch, A. & Bläsi, U. (1998).  
Discrimination of 5'-terminal start codons by translation initiation factor 3 is mediated by ribosomal protein S1.  
*FEBS Lett* **436**(2), 213-7.
- Müller-Hill, B. (1998).  
Some repressors of bacterial transcription.  
*Curr Opin Microbiol* **1998**(1), 145-51.
- Nodwell, J. R. & Greenblatt, J. (1993).  
Recognition of *boxA* antiterminator RNA by the *E. coli* antitermination factor NusB and ribosomal protein S10.  
*Cell* **72**, 261-8.
- O'Connor, M., Asai, T., Squires, C. L. & Dahlberg, A. E. (1999).  
Enhancement of translation by the downstream box does not involve base pairing of mRNA with the penultimate stem sequence of 16S rRNA.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(16), 8973-8.
- Parton, R. (1999).  
Review of the biology of *Bordetella pertussis*.  
*Biologicals* **27**(2), 71-6.
- Perraud, A. L., Weiss, V. & Gross, R. (1999).  
Signalling pathways in two-component phosphorelay systems.  
*Trends Microbiol* **7**(3), 115-20.
- Petering, H., Hammerschmidt, S., Frosch, M., van Putten, J. P. M., Ison, C. A. & Robertson, B. D. (1996).  
Genes associated with the meningococcal capsule complex are also found in *Neisseria gonorrhoeae*.  
*J Bacteriol* **178**, 3342-5.
- Pizza, M., Covacci, A., Bartoloni, A., Perugini, M., Nencioni, L., De Magistris, M. T., Villa, L., Nucci, D., Manetti, R., Bugnoli, M., Giovannoni, F., Olivieri, R., Barbieri, T., Sato, H. & Rappuoli, R. (1989).  
Mutants of pertussis toxin suitable for vaccine development.  
*Science* **246**(4929), 497-500.
- Polyakov, A., Richter, C., Malhotra, A., Koulich, D., Borukhov, S. & Darst, S. A. (1998).  
Visualization of the binding site for the Transcript cleavage factor GreB on *Escherichia coli* RNA Polymerase.  
*J Mol Biol* **281**, 465-73.
- Potapov, A. P. & Subramanian, A. R. (1992).  
Effect of *E. coli* ribosomal protein S1 on the fidelity of the translational elongation step: reading and misreading of poly(U) and poly(dT).  
*Biochem Int* **27**(4), 745-53.
- Ramakrishnan, V. & White, S. W. (1998).  
Ribosomal protein structures: insights into the architecture, machinery and evolution of the ribosome.  
*Trends Biochem Sci* **23**, 208-12.

- Ravi, K. & Suryanarayana, T. (1994).  
Amino acid functional groups involved in the binding of *Escherichia coli* ribosomal protein S1 to ribosomes and nucleic acids.  
*Biochem Mol Biol Int* **34**(5), 1035-48.
- Regnier, P., Grunberg-Manago, M. & Portier, C. (1987).  
Nucleotide sequence of the pnp gene of *Escherichia coli* encoding polynucleotide phosphorylase. Homology of the primary structure of the protein with the RNA-binding domain of ribosomal protein S1.  
*J Biol Chem* **262**(1), 63-8.
- Ringquist, S., Jones, T., Snyder, E. E., Gibson, T., Boni, I. & Gold, L. (1995).  
High-affinity RNA ligands to *Escherichia coli* ribosomes and ribosomal protein S1: comparison of natural and unnatural binding sites.  
*Biochemistry* **34**(11), 3640-8.
- Ringuist, S., Shinedling, s., Barrick, D., Green, L., Binkley, J., Stormo, G. D. & Gold, L. (1992).  
Translation initiation in *Escherichia coli*: sequences within the ribosomal binding site.  
*Mol Microbiol* **6**, 1219-29.
- Roberts, M. W. & Rabinowitz, J. C. (1989).  
The effect of *Escherichia coli* ribosomal protein S1 on the translational specificity of bacterial ribosomes.  
*J Biol Chem* **264**(4), 2228-35.
- Romeo, T. (1998).  
Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB.  
*Mol Microbiol* **29**(6), 1321-30.
- Schnier, J., Stoffler, G. & Nishi, K. (1986).  
Deletion and insertion mutants in the structural gene for ribosomal protein S1 from *Escherichia coli*.  
*J Biol Chem* **261**(25), 11866-71.
- Schröder, K., Graumann, A., Schnuchel, A., Holak, T. A. & Marahiel, M. A. (1995).  
Mutational analysis of the putative nucleic acid-binding surface of the cold-shock domain, CspB, revealed an essential role of aromatic and basic residues in binding of single-stranded DNA containing the Y-box motif.  
*Mol Microbiol* **16**, 699-708.
- Shine, J. & Dalgarno, L. (1974).  
The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: Complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites.  
*Proc Natl Acad Sci USA* **71**, 1342-6.
- Shteiman-Kotler, A. & Schuster, G. (2000).  
RNA-binding characteristics of the chloroplast S1-like ribosomal protein CS1.  
*Nucleic Acids Res* **28**(17), 3310-3315.
- Skouy, J., Schnier, J., Rasmussen, M. D., Subramanian, A. R. & Pedersen, S. (1990).  
Ribosomal protein S1 of *Escherichia coli* is the effector for the regulation of its own synthesis.  
*J Biol Chem* **265**(28), 17044-9.
- Slauch, J. M., Russo, F. D. & Silhavy, T. J. (1991).  
Suppressor mutations in rpoA suggest that OmpR controls transcription by direct interaction with the alpha subunit of RNA polymerase.  
*J Bacteriol* **173**(23), 7501-10.
- Sommerville, J. (1999).  
Activities of cold-shock domain proteins in translation control.  
*Bioessays* **21**(4), 319-25.
- Sørensen, M. A., Fricke, J. & Pedersen, S. (1998).  
Ribosomal protein S1 is required for translation of most, if not all, natural mRNAs in *Escherichia coli* in vivo.  
*J Mol Biol* **280**(4), 561-9.

## Literatur

- Sprengart, M. L., Fatscher, H. P. & Fuchs, E. (1990).  
The initiation of translation in *E. coli*: apparent base pairing between the 16srRNA and downstream sequences of the mRNA.  
*Nucleic Acids Res* **18**(7), 1719-23.
- Sprengart, M. L., Fuchs, E. & Porter, A. G. (1996).  
The downstream box: an efficient and independent translation initiation signal in *Escherichia coli*.  
*EMBO J* **15**(3), 665-74.
- Stibitz, S. (1998).  
Mutations affecting the alpha subunit of *Bordetella pertussis* RNA polymerase suppress growth inhibition conferred by short C-terminal deletions of the response regulator BvgA.  
*J Bacteriol* **180**(9), 2484-92.
- Subramanian, A. R. (1983).  
Structure and functions of ribosomal protein S1.  
*Prog. Nucleic Acid Res Mol Biol* **28**, 101-42.
- Subramanian, A. R. & van Duin, J. (1977).  
Exchange of individual ribosomal proteins between ribosomes as studied by heavy isotope-transfer experiments.  
*Mol Gen Genet* **158**, 1-9.
- Sugita, C., Sugiura, M. & Sugita, M. (2000).  
A novel nucleic acid-binding protein in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC6301: a soluble 33-kDa polypeptide with high sequence similarity to ribosomal protein S1.  
*Mol Gen Genet* **263**(4), 655-63.
- Sugita, M., Sugita, C. & Sugiura, M. (1995).  
Structure and expression of the gene encoding ribosomal protein S1 from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 6301: striking sequence similarity to the chloroplast ribosomal protein CS1.  
*Mol Gen Genet* **246**(2), 142-7.
- Suryanarayana, T. & Subramanian, A. R. (1984).  
Function of the repeating homologous sequences in nucleic acid binding domain of ribosomal protein S1.  
*Biochemistry* **23**(6), 1047-51.
- Syn, C. K. C., Teo, W. L. & Swarup, S. (1999).  
Three detergent method for the extraction of RNA from several bacteria.  
*BioTechniques* **27**(6), 1140-5.
- Tedin, K., Resch, A. & Bläsi, U. (1997).  
Requirements for ribosomal protein S1 for translation initiation of mRNAs with and without a 5' leader sequence.  
*Mol Microbiol* **25**, 189-99.
- Thomas, M. S. & Glass, R. E. (1991).  
*Escherichia coli* rpoA mutation which impairs transcription of positively regulated systems.  
*Mol Microbiol* **5**(11), 2719-25.
- Tobe, T., Sasakawa, C., Okada, N., Honma, Y. & Yoshikawa, M. (1992).  
VacB, a novel chromosomal gene required for expression of virulence genes on the large plasmid of *Shigella flexneri*.  
*J Bacteriol* **174**, 6359-67.
- Uhl, M. A. & Miller, J. F. (1994).  
Autophosphorylation and phosphotransfer in the *Bordetella pertussis* BvgAS signal transduction cascade.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(3), 1163-7.
- Uhl, M. A. & Miller, J. F. (1995).  
*Bordetella pertussis* BvgAS virulence control system.  
In *Two-component signal Transduction* (Hoch, J. A. & J., S. T., eds.), pp. 333-49.  
ASM Press, Washington, DC.

- Venkatesh, T. V. & Radding, C. M. (1993).  
Ribosomal protein S1 and NusA protein complexed to recombination protein beta of phage lambda.  
*J Bacteriol* **175**(6), 1844-6.
- Walleczek, J., Albrecht-Ehrlich, R., Stoffler, G. & Stoffler-Meilicke, M. (1990).  
Three-dimensional localization of the NH<sub>2</sub>- and carboxyl-terminal domain of ribosomal protein S1 on the surface of the 30 S subunit from *Escherichia coli*.  
*J Biol Chem* **265**(19), 11338-44.
- Wei, B., Shin, S., LaPorte, D., Wolfe, A. J. & Romeo, T. (2000).  
Global regulatory mutations in *csrA* and *rpoS* cause severe central carbon stress in *Escherichia coli* in the presence of acetate.  
*J Bacteriol* **182**(6), 1632-40.
- Yamanaka, K., Fang, L. & Inouye, M. (1998).  
The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation.  
*Mol Microbiol* **27**(2), 247-55.
- Yamit-Hezi, A., Levy, Z., Neuman, S. & Nudel, U. (1997).  
A *Leuconostoc lactis* protein with homology to ribosomal protein S1 shares common epitopes and common DNA binding properties with a mammalian DNA binding nuclear factor.  
*Gene* **185**(1), 99-103.
- Zhang, J. & Deutscher, M. P. (1992).  
A uridine-rich sequence required for translation of prokaryotic mRNA.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(7), 2605-9.

## Lebenslauf

**Name:** Jochen König  
**Geburt:** 29. Okt. 1970 in Attendorn  
**Familienstand:** ledig  
**Eltern:** Brigitta König, geb. Lingemann, Buchhalterin  
Hubert König, Raumausstatter-Meister

### Schulbildung:

Aug. 1977 - Juli 1981 Kath. Grundschule Sonnenschule in Attendorn  
Sept. 1981 - Juni 1990 Städtisches Rivius Gymnasium Attendorn,  
Abschluss mit Abitur (Gesamtnote 1,8)

### akademische Ausbildung

Okt. 1990 Einschreibung an der Universität Würzburg für den  
Diplomstudiengang Biologie  
März 1993 Vordiplom in allgemeiner Zoologie,  
allgemeiner Botanik,  
Chemie und  
Mathematik  
Sept. 1993 - Juni 1994 Studium an der University of Edinburgh, Schottland  
mit Kursen in Mikrobiologie, Immunologie und Genetik  
Mai 1996 Diplomprüfungen: Hauptfach: Mikrobiologie  
Nebenfächer: Genetik und  
Tierphysiologie  
Juni 1995 - Mai 1996 Diplomarbeit: „Expression bakterieller Virulenzfaktoren in  
Säugerzellen“, betreut durch Prof. Dr. Roy Gross am  
Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Würzburg  
Mai 1996 Graduierung als Diplom-Biologe (Gesamtnote 1,2)  
Juni 1996 – April 2000 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Mikrobiologie  
der Universität Würzburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. Roy  
Gross

Würzburg, 20.11.2000

Jochen König

## Publikationsliste

- König, J., Fuchs, T. M., Deppisch, H., Scarlato, V & Gross, R. (1996)  
A New Gene Locus of *Bordetella pertussis* Defines a Novel Family of Prokaryotic  
Transcriptional Accessory Proteins  
Poster  
VAAM Plasmid-Symposium, Rothenfels
- König, J. & Gross, R. (1998)  
Charakterisierung des *E. coli* Homologen zu Tex, einem an der Toxinexpression  
beteiligten Proteins von *Bordetella pertussis*.  
Vortrag  
DGHM Minisymposium; Rothenfels
- König, J. & Gross, R. (1998)  
Studies concerning the function of Tex, a transcription associated factor in *B. pertussis*  
and *E. coli*.  
Poster  
EMBO, FEBS, UNESCO International Summer School on Molecular and Cell Biology,  
Spetses, Griechenland, 30.08.-12.09.1998
- König, J. & Gross, R. (1999)  
Studies concerning the function of Tex, a transcription associated factor in *B. pertussis*  
and *E. coli*  
Poster  
VAAM-Jahrestagung, Göttingen
- König, J. & Gross, R. (1999)  
Bindung des transkriptions-assoziierten Faktors Tex an Nukleinsäure  
Vortrag  
VAAM Minisymposium „Mikrobielle Pathogenität“,  
Rothenfels
- König, J., Bock, A., Perraud, A.-L., Fuchs, T. M., Beier, D. & Gross, R. (2000)  
Regulatory factors of *Bordetella pertussis* affecting virulence gene expression.  
in Vorbereitung

## Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
A <sub>595</sub>	Absorption bei 595 nm
Abb.	Abbildung
Ap	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B. p.</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
Ci	Curie
Cm	Chloramphenicol
CSD	„cold shock“ Domäne
CSP	„cold shock“ Protein
CTD	carboxyterminale Domäne
Δ	Deletion
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
ddNTP	2', 3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DB	Downstream-box
ds	„double stranded“ doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
<i>E. c.</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Einzelkolonie
EMSA	„electrophoretic mobility shift assay“, Gelretardationsexperiment
EtOH	Ethanol
Frag.	Fragment
g	Einheit der Erdbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunde(n)
His	Histidin
His-tag	(His) <sub>6</sub> -Rest als Affinitätsmarkierung eines Proteins
Hly	Hämolysen (als Phänotyp)
i. d. R.	in der Regel
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
k-	kilo (10 <sup>3</sup> )
kb	Kilobasen = 1000 bp
kDa	Kilodalton, atomare Masseneinheit (=1 kg/Mol)
Km	Kanamycin
l	Liter
[L] <sub>50</sub>	Halbsättigungskonzentration
Lsg.	Lösung
M	molar (mol/l)
m-	milli- (10 <sup>-3</sup> )

μ-	mikro- (10 <sup>-6</sup> )
mA	Milliampere
Me	Methyl-
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
n-	nano- (10 <sup>-9</sup> )
neg.	negativ
nt	Nukleotide
NTA	Nitriloessigsäure
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
P.	Puffer
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pers.	persönlich
pos.	positiv
R	resistent
RBS	Ribosomenbindestelle
rel.	relativ
rd.	rund
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur (18-22 ° C)
S	sensitiv
S1-D	S1 Domäne
SD	Shine-Dalgarno Sequenz
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
Sm	Streptomycin
s. o.	siehe oben
Sp	Spectinomycin
sp.	Spezies (sg.)
ssp.	Spezies (pl.)
ss	„single stranded“ einzelsträngig
s. u.	siehe unten
Tc	Tetracyclin
TIR	Transkriptionsinitiationsregion
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜNK	Übernachtkultur
5'-UTR	5'-untranslatierte Region
V	Volt
Vol.	Volumen
vs.	„versus“, gegen (-über)
v/v	„volume per volume“, Volumenanteile
W	Watt
WT	Wildtyp
w/v	„weight per volume“, Gewichts- pro Volumenanteile
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoyl-b-D-galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel

## Abkürzungsverzeichnis

### Aminosäuren:

G	Gly	Glycin	hydrophil
A	Ala	Alanin	
S	Ser	Serin	
T	Thr	Threonin	
P	Pro	Prolin	
M	Met	Methionin	hydrophob
V	Val	Valin	
L	Leu	Leucin	
I	Ile	Isoleucin	
C	Cys	Cystein	hydrophob, S-Brücken
R	Arg	Arginin	basisch (+)
H	His	Histidin	
K	Lys	Lysin	
D	Asp	Aspartat	sauer (-)
E	Glu	Glutamat	
N	Asn	Asparagin	
Q	Gln	Glutamin	
F	Phe	Phenylalanin	aromatisch
Y	Tyr	Tyrosin	
W	Trp	Tryptophan	

### Nukleoside

A	Adenosin
C	Cytidinin
G	Guanosin
T	Thymidin
U	Uridin

## Anhang

### DNA Sequenz des *tex*-Locus in *E. coli* K12 und Lage der verwendeten Oligonukleotide

Oberhalb der Nukleotidsequenz sind die in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide aufgetragen. Möglichen Transkriptions-Terminatoren, entsprechend der Vorhersage des Programms „terminator“ aus dem GCG Sequenzanalyse Paket angegeben. Die Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen sind rot unterstrichen. Die Translations-Start-Codons von cTex und cTex(b) sind in Fettdruck. In grau ist die konzeptionell translatierte Aminosäuresequenz und darunter die Namen der entsprechenden Proteine aufgeführt. Die zu MtlR und S1 homologen Bereiche der Aminosäuresequenz sind in Fettdruck.

```

ctex5.1.2 HindIII
      AAGCTT
1  TTTGGCCGTA AAGATTACAT CTCTATCGAT TCCCCGATGG CCCGCGCATT GCTGAAAAAA
   F G R K D Y I S I D S P M A R A L L K K

      SalI      ctexG1472'
      GTCGTC
61  GAAGTCGGCG ATCTGGCGGT GGTGAATACC CCTGCCGGGG AAGCGAGCTG GTATGTTAAT
   E V G D L A V V N T P A G E A S W Y V N

      ctexG1523 EcoRI
      GAATTC
121 GCTATCGAGT ACGTGAAACC GTAAGGAAGA GTCTTAACCT CCTGCCGATG GCTGGCATT...
   A I E Y V K P -
           GreB =>|
           mögl. Terminator

ctexNSph
      GC
181 TTGCCAGCCA GTCCGTATAA CTATCCCCTG ATTTTTGATC CGAAAAGATG AACTCAAACC

      SphI
      ATGC
241 ATGATGAATG ATTCGTTCTG CCGCATTATT GCGGGTGAAA TTCAGGCGCG CCCGGAACAG
   M M N D S F C R I I A G E I Q A R P E Q
=> cTex

ctex5.10 SphI
      GCA TGC
301 GTTGACGCTG CCGTTCGCCT GCTTGACGAA GGAATACCG TGCCGTTTAT CGCACGTTAT
   21 V D A A V R L L D E G N T V P F I A R Y
           => cTex(b)

361 CGTAAGGAAA TCACCGGCGG TCTGGATGAC ACGCAGCTGC GTAATCTGGA AACGCGTCTG
   41 R K E I T G G L D D T Q L R N L E T R L

      EcoRI ctexG1860R
      GAATTC
421 AGCTATCTGC GCGAGCTGGA AGAGAGACGT CAGGCGATCC TCAAGTCCAT TTCCGAGCAA
   61 S Y L R E L E E R R Q A I L K S I S E Q

481 GGCAAActCA CCGATGATCT GGCGAAGGCC ATCAACGCCA CCCTAAGCAA AACCGAACTC
   81 G K L T D D L A K A I N A T L S K T E L

```

Anhang

*SacII*

541 GAAGACCTCT ACCTGCCCTA CAAACCTAAA CGCCGCACCC GCGGGCAAAT CGCCATTGAA  
 101 E D L Y L P Y K P K R R T R G Q I A I E

601 GCAGGGCTTG AGCCGTTGGC TGACCTGCTG TGGAGCGATC CGTCACACAC GCCAGAAGTC  
 121 A G L E P L A D L L W S D P S H T P E V

661 GCCGCTGCAC AATATGTTTA TGCCGATAAA GGCCTGGCAG ATACCAAAGC CGCGCTGGAT  
 141 A A A Q Y V Y A D K G V A D T K A A L D

721 GCGCGCGCT ATATCCTGAT GGAACGGTTT GCCGAAGATG CCGCGCTGCT GGCGAAAGTG  
 161 G A R Y I L M E R F A E D A A L L A K V

781 CGTGATTATC TGTGGAAGAA CGCGCATTTG GTTTCTACGG TGGTGAGCGG TAAAGAAGAG  
 181 R D Y L W K N A H L V S T V V S G K E E

841 GAAGGGGCGA AATTCGCGA CTATTTTCGAT CATCACGAAC CGTTGTCCAC GGTGCCTTCT  
 201 E G A K F R D Y F D H H E P L S T V P S

901 CACCGCGCGC TGGCGATGTT CCGTGGGCGT AACGAAGGCG TACTTCAGCT TTCGCTGAAT  
 221 H R A L A M F R G R N E G V L Q L S L N

961 GCCGATCCAC AGTTCGATGA GCCGCCAAA GAGAGCTATT GCGAGCAAAT CATCATGGAT  
 241 A D P Q F D E P P K E S Y C E Q I I M D

1021 CACCTTGGCC TGCGCCTGAA CAATGCCCCG GCGGATAGCT GGCGCAAAGG CGTGGTGAGC  
 261 H L G L R L N N A P A D S W R K G V V S

1081 TGGACGTGGC GCATCAAGGT GCTGATGCAT CTGGAAACCG AACTGATGGG CACCGTGCGC  
 281 W T W R I K V L M H L E T E L M G T V R

1141 GAACGTGCGG AAGATGAAGC AATCAACGTC TTTGCCCGTA ACCTGCACGA TCTGCTGATG  
 301 E R A E D E A I N V F A R N L H D L L M

1201 GCGGCCCTG CCGGACTGCG TGCAACGATG GGCCTCGATC CGGGTCTGCG TACTGGGGTA  
 321 A A P A G L R A T M G L D P G L R T G V

1261 AAAGTGGCGG TGGTCGATGC CACTGGCAA CTGGTGGCGA CCGACCCAT TTACCCGCAC  
 341 K V A V V D A T G K L V A T D T I Y P H

1321 ACCGGACAGG CCGCAAAGC AGCGATGACC GTTGCTGCGC TGTGTGAAAA ACATAACGTT  
 361 T G Q A A K A A M T V A A L C E K H N V

1381 GAACTGGTAG CGATCGGTAA CCGTACAGCT TCCC CGGAAA CTGAGCGTTT CTATCTCGAT  
 381 E L V A I G N G T A S R E T E R F Y L D

1441 GTGCAGAAGC AGTTCGCGAA AGTGACCGCG CAGAAAGTAA TCGTCAGCGA AGCAGGCGCG  
 401 V Q K Q F P K V T A Q K V I V S E A G A

1501 TCGGTTTACT CGGCTTCCGA GCTGGCTGCA CAGGAGTTCC CGGATCTCGA CGTTTCGCTG  
 421 S V Y S A S E L A A Q E F P D L D V S L

*BamHI*

*ClaI*

1561 CGTGGCGCGG TGTCTATCGC CCGCCGTTTG CAGGATCCGC TGGCGGAGCT GGTGAAAATC  
 441 R G A V S I A R R L Q D P L A E L V K I  
 ⇒ cTex-CTD

1621 GATCCGAAAT CTATCGGCGT AGGTCAGTAT CAGCATGACG TCAGCCAGAC GCAACTGGCC  
 461 D P K S I G V G Q Y Q H D V S Q T Q L A

1681 CGCAAAGTGG ACGCAGTAGT AGAAGACTGC GTAAACGCCG TTGGCGTCGA TCTCAACT  
 481 R K L D A V V E D C V N A V G V D L N T

1741 GCTTCTGTTT CGCTGTTAAC CCGCGTGGCG GGCCTGACGC GCATGATGGC GCAAAACATC  
 501 A S V P L L T R V A G L T R M M A Q N I

1801 GTTGCCTGGC GCGATGAGAA CCGTCAGTTC CAGAACCGTC AGCAACTGTT AAAAGTGAGC  
 521 V A W R D E N G Q F Q N R Q Q L L K V S

1861 CGTCTGGGGC CGAAAGCCTT CGAGCAGTGC GCGGGCTTCT TGCGCATTAA CCACGGTGAT  
 541 R L G P K A F E Q C A G F L R I N H G D

1921 AACCCGCTGG ACGCGTCTAC CGTTCACCCG GAAGCCTATC CGGTGGTGGA ACGCATTCCTG  
 561 N P L D A S T V H P E A Y P V V E R I L

*BglII*

1981 GCAGCAACAC AGCAGGCACT GAAAGATCTG ATGGGTAACA GCAGCGAACT GCGTAACCTG  
 581 A A T Q Q A L K D L M G N S S E L R N L

2041 AAAGCGTCTG ACTTTACTGA TGAGAAATTC GGTGTGCCGA CGGTAACCGA CATCATCAAA  
 601 K A S D F T D E K F G V P T V T D I I K

2101 GAGCTGGAAA AACCGGGTCG CGATCCGCGT CCGGAATTTA AAACCGCTCA GTTTGCCGAT  
 621 E L E K P G R D P R P E F K T A Q F A D

2161 GGCCTCGAGA CAATGAACGA CCTGCAACCG GGTATGATCC TCGAAGGCGC AGTGACCAAC  
 641 G V E T M N D L Q P G M I L E G A V T N

2221 GTCACCAACT TTGGCGCGTT TGTCGATATT GGCCTGCATC AGGACGGCCT GGTTCACATC  
 661 V T N F G A F V D I G V H Q D G L V H I

2281 TCTTCATTGT CGAACAAAGT TGTGGAAGAT CCGCATAACCG TGGTGAAAGC GGGCGACATT  
 681 S S L S N K F V E D P H T V V K A G D I

2341 GTGAAGGTGA AAGTGCTGGA AGTGGATCTT CAGCGTAAAC GTATCGCCCT GACTATGCGC  
 701 V K V K V L E V D L Q R K R I A L T M R

2401 CTGGATGAGC AGCCTGGCGA AACCAACGCT CGTCGCGGCG GCGGTAATGA ACGCCGCAA  
 721 L D E Q P G E T N A R R G G G N E R P Q

2461 AACCAACGCC CGGCAGCCAA ACCACGCGGT CGTGAAGCGC AGCCTGCCGG TAATAGCGCG  
 741 N N R P A A K P R G R E A Q P A G N S A

ctexG3956 *Sall*  
 —————GTCGAC

2521 ATGATGGATG CGCTGGCGGC GGCAATGGGC AAAAAACGTT AAACGCCCGT ACTGGCCTAC  
 761 M M D A L A A A M G K K R - möglicher Terminator

—————>  
*KpnI* ctexCKpn  
GGTACC—————

2581 GGTTTCTGAATT TGCACGAAAT CGTAGGGCAG ATAAGGCGTT CACCGCATCT GGCAACGAAC

2641 GCCTTGCCTG ACATAAAAGT GCCGGAGAAT ATCTCCGGCA TTTTTATTCC ACAGCCAAAC  
 möglicher Terminator

2701 TCATAATATA TTCCGGCAAT ATTTATCATT TCATTAACAA CTGAAACCTT AATTAAACAT

*EcoRI* ctex3.2  
 <—————GAATTC—————  
 2761 TAGCCAGTCC GGTAAATTCA CTATTCGAAT



## Daten der Bindung von Nukleinsäuren an verschiedene cTex Derivate

Tab. 2: Bindung von RNA an cTex(b)

Konz. (ng/ml)	Bindung (ng)		
	I	II	III
87,59	13,16		
492,43	39,09		
926,24	55,58		
2463,62	82,77		
4922,04	87,34		
39,34		4,14	
257,53		17,36	
501,63		35,09	
2543,02		71,58	
4874,37		82,61	
44,81			3,25
272,44			20,71
539,85			31,61
2714,79			61,81
5179,07			83,08

Tab. 3: Bindung von DNA an cTex(b)

Konz. (ng/ml)	Bindung (ng)			
	I	II	III	IV
5,00	1,85			
25,00	7,89			
50,00	16,05			
250,00	72,25			
500,00	124,06			
2500,00	282,57			
5,00		2,09		
25,00		7,11		
50,00		13,96		
250,00		54,38		
500,00		81,67		
2500,00		155,63		
50,00			16,53	
250,00			76,22	
500,00			151,46	
1000,00			218,50	
2000,00			294,92	
4000,00			327,13	
8000,00			364,03	
50,00				10,84
250,00				56,38
500,00				97,78
1000,00				149,23
2000,00				195,55
4000,00				226,99
8000,00				195,02

Tab. 4: Bindung von RNA an cTex

Konz. (ng/ml)	Bindung (ng)			
	I	II	III	IV
127,00	0,73			
254,01	1,50			
508,01	2,60			
1016,02	5,00			
2032,04	7,44			
4064,08	13,31			
8128,16	21,33			
16256,33	34,91			
32512,65	57,98			
65025,30	80,37			
130050,60	84,41			
138,15		1,21		
276,30		2,10		
552,59		3,08		
1105,18		5,00		
2210,36		9,22		
4420,72		13,93		
8841,44		27,09		
17682,89		34,78		
35365,77		45,25		
70731,55		68,21		
141463,10		91,96		
48,74			0,71	
121,85			1,14	
243,70			3,80	
487,40			7,02	
974,80			11,82	
1949,59			17,30	
3899,19			28,41	
7798,38			44,05	
15596,75			69,64	
836,77				3,77
1673,53				7,85
3347,06				13,30
6694,12				21,01
13388,24				35,90
26776,49				57,49
53552,97				71,39
107105,94				82,77
214211,88				73,37
428423,77				119,15
856847,53				56,57

Tab. 5: Bindung von DNA an cTex

Konz. (ng/ml)	Bindung (ng)	
	I	II
42	0,71	0,11
105	0,61	0,07
210	0,63	0,06
420	0,57	0,06
840	0,62	0,13
1680	0,77	0,08
3360	0,93	0,11
6720	1,97	0,71
13440	2,65	0,46
26880	3,10	0,54

Tab. 6: Bindung von DNA an cTex-CTD

Konz. (ng/ml)	Bindung (ng)			
	I	II	III	IV
9	1,55			
18	2,48			
36	3,55			
72	7,26			
144	13,52			
288	32,11			
576	58,72			
1152	107,83			
2304	179,30			
90		9,96		
180		23,33		
360		56,28		
720		112,49		
1440		252,66		
2880		433,60		
5760		479,52		
11520		498,01		
23040		461,84		
46080		321,40		
40			4,30	5,52
100			16,94	13,25
200			36,00	35,59
400			80,81	79,90
800			184,61	170,14
1600			290,67	341,89
3200			404,28	395,87
6400			439,16	494,94
12800			451,73	547,03
25600			312,02	550,99

Anhang

Tab. 7: Konkurrenz der Bindung von <sup>3</sup>H-markierter gesamter RNA an cTex(b) mit unmarkierter chromosomaler DNA (D1-5) und gesamter RNA (R1-6).

Überschuß Kompetitor	Bindung (%)						R1	R2	R3	R4	R5	R6
	D1	D2	D3	D4	D5							
0,00	100,00											
0,50	12,74											
1,00	5,43											
2,00	3,68											
4,00	3,25											
0,00		100,00	100,00									
0,60		5,06	12,45									
1,50		2,80	5,09									
3,00		2,23	3,18									
6,00		1,34	1,57									
12,00		1,35	1,71									
0,00				100,00								
0,52				11,53								
1,30				5,03								
2,59				5,96								
5,19				2,33								
10,37				0,97								
0,00					100,00							
0,53					17,92							
1,33					7,41							
2,67					4,31							
5,33					1,92							
10,67					0,99							
0,00						100,00	100,00					
0,63						89,13	101,81					
3,15						50,35	52,57					
6,29						41,07	42,67					
12,58						38,75	43,67					
0,00								100,00				
0,43								99,40				
1,06								86,67				
2,13								74,37				
4,26								56,65				
8,52								37,34				
0,00									100,00	100,00		
0,10									98,49	93,91		
0,52									85,67	86,76		
2,60									65,50	58,90		
5,21									54,45	43,40		
10,42									39,88	28,31		
20,83									25,52	13,11		
0,00												100,00
2,38												61,54
11,88												27,10
23,75												15,73