

**Biochemische Charakterisierung des Transkriptionsrepressors
CopR und Evolution des CopR-Operators**

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl.-Biochemikerin Peggy Freede
geboren am 24.02.1976

om namo bhagavate vāsudevāya

Śrīmad – Bhāgavatam 2.1.1.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Regulation der prokaryotischen Transkription durch Aktivator- und Repressor-Proteine	1
1.2. Regulation der Kopiezahl von Plasmiden	10
1.3. Eigenschaften des Transkriptionsrepressors CopR	12
1.4. <i>In vitro</i> -Selektion funktioneller Nukleinsäuremoleküle durch SELEX	15
1.5. Aufgabenstellung	18

2. Material und Methoden

2.1. Präparation der 5'-markierten doppelsträngigen DNA-Fragmente	19
2.2. Reinigung von His ₆ -CopR	21
2.3. Gelretardierungsexperimente	21
2.4. <i>In vitro</i> -Selektion – SELEX	22
2.5. <i>In vitro</i> -Transkription	24
2.6. Überexpression und Reinigung der <i>B. subtilis</i> α -RNAP-Varianten	25
2.7. Präparation des DNA-Fragmentes für die Footprinting-Experimente	26
2.8. DNase I – Footprinting	27
2.9. KMnO ₄ – Footprinting	28
2.10. Glutardialdehyd – Crosslinking	28
2.11. Westernblot	29

3. Ergebnisse

3.1. <i>In vitro</i> -Selektion von CopR-Operatorsequenzen durch SELEX	30
3.2. Bindungskurven mutierter CopR-Operatoren	37
3.3. <i>In vitro</i> -Transkription mit mutierten CopR-Operatoren	43
3.4. Bindung von CopR und <i>B. subtilis</i> - RNA-Polymerase an den Promotor pII	44
3.5. Einfluß von CopR auf die Bildung des offenen Transkriptionsinitiationskomplexes am Promotor pII	46

3.6. Bindung der α -CTD-RNA-Polymerase und CopR an den Promotor pII	47
3.7. Bestimmung der Bindungsregion der α -CTD-RNA-Polymerase am Promotor pII	48
3.8. Interaktion der α -CTD-RNA-Polymerase mit CopR	50

4. Diskussion

4.1. <i>In vitro</i> -Selektion von CopR-Operatoren	55
4.2. Vergleich der Bindungskurven der durch SELEX angereicherten Operatoresequenzen	57
4.3. Vergleich des CopR-Operators mit den Operatoren der verwandten Transkriptionsrepressoren CopF und CopS	59
4.4. Bindung von CopR an den Operator	60
4.5. Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor pII	61
4.6. Repression der Bildung eines offenen Transkriptionsinitiationskomplexes am Promotor pII durch CopR	62
4.7. Interaktion der α -CTD-RNA-Polymerase und CopR	63
4.8. Simultane Bindung von CopR und der α -CTD-RNA-Polymerase an den Promotor pII	65
4.9. Weiterführende Experimente	66

5. Zusammenfassung

6. Literaturverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Anhang

Publikation: Freede P, Brantl S. (2004): Transcriptional Repressor CopR: use of SELEX to study the copR operator indicates that evolution was directed at maximal binding affinity. *J Bacteriol.* Sep;186(18):6254-64.

1. Einleitung

1.1. Regulation der prokaryotischen Transkription durch Aktivator- und Repressor-Proteine

Bakterien leben in Umgebungen, die sich ständig ändernden Bedingungen ausgesetzt sind. Um sich an wechselnde Umweltverhältnisse anpassen zu können, wurde eine Vielzahl von Regulationsmechanismen entwickelt. Diese führen meist zur Aktivierung und/ oder Repression von Genen. Dabei wird die prokaryotische Genexpression durch die Regulation der Transkriptionsinitiation entscheidend beeinflusst. Die Initiation der Transkription bei Prokaryoten wird durch eine Vielzahl von Protein-Protein- und Protein-DNA-Interaktionen zwischen der RNA-Polymerase, der Promotor-DNA und Aktivator- und Repressor-Proteinen reguliert (Hochschild & Dove, 1998). Das *E. coli*-Genom enthält mehr als 300 Gene, die Proteine kodieren, die durch die Bindung an Promotoren die Transkription regulieren (Perez-Rueda & Collado-Vides, 2000). Die meisten dieser Proteine sind sequenzspezifische DNA-Bindungsproteine. Einige von ihnen regulieren die Transkription vieler Gene, wohingegen andere lediglich ein oder zwei Gene kontrollieren. Sieben Transkriptionsfaktoren (CRP, FNR, IHF, Fis, ArcA, NarL und Lrp) regulieren die Transkription von 50 % aller Gene in *E. coli* (Martinez-Antonio & Collado-Vides 2003). Auf der Basis von Sequenzanalysen können bakterielle Transkriptionsfaktoren unterschiedlichen Familien zugeordnet werden. Am besten charakterisiert sind die LacI-, AraC-, LysR-, CRP- und OmpR-Transkriptionsregulatoren. Die Strukturen vieler dieser Proteine sind bereits aufgeklärt worden (Huffman & Brennan, 2002).

Die spezifische Erkennung und Bindung der DNA durch Aktivator- und Repressor-Proteine ist essentiell. Diese Proteine binden in der Regel als symmetrische Protein-Oligomere an spezifische DNA-Erkennungssequenzen, die häufig vollständig bzw. partiell symmetrisch sind. Die meisten Transkriptionsregulatoren wechselwirken mit der DNA durch eine α -Helix. Bedeutend seltener sind Proteine, die die große bzw. kleine Furche der DNA durch ein ' β -ribbon' binden. Das am besten untersuchte DNA-Bindungsmotiv ist das Helix-Turn-Helix-Motiv, bei dem eine α -Helix des Proteins in der großen Furche der DNA bindet. Eine zweite α -Helix, die N-terminal von der ersten angeordnet ist, dient der Stabilisierung der Wechselwirkung. Die Anzahl und Konformation der zwischen den beiden α -Helices gelegenen Aminosäuren kann stark variieren (Wintjens & Rooman,

1996). Neben dem HTH-Motiv gibt es noch weitere DNA-Bindungsmotive, wie dem Leucin-'zipper'-, dem Zinkfinger- und dem β -ribbon'-Motiv.

Prokaryotische RNA-Polymerasen setzen sich aus mehreren Untereinheiten zusammen. Das 'core'-Enzym wird von einer β -, einer β' - sowie zwei α - Untereinheiten gebildet. Dabei bilden die β - und β' -Untereinheiten das aktive Zentrum des Enzyms. Durch die Bindung eines σ -Faktors ist es der RNA-Polymerase möglich, die Promotor-DNA sequenzspezifisch am -35 - und -10 -Element (Transkriptionsstart $+1$) zu binden (Abb. 1). Neben diesen beiden Promotorelementen wird das 3-4 bp-lange 'extended' -10 -Element, das sich unmittelbar stromaufwärts vom -10 -Element befindet, von der Domäne 3 des σ -Faktors spezifisch gebunden (Murakami *et al.*, 2002, Sanderson *et al.*, 2003). Die meisten Bakterien verfügen über mehrere σ -Faktoren, die unterschiedliche Promotoren erkennen. Jede α -Untereinheit der RNA-Polymerase setzt sich aus zwei Domänen zusammen, die durch einen flexiblen 'linker' miteinander verbunden sind (Blatter *et al.*, 1994). Die N-terminale Domäne (α -NTD, 28 kDa) ist für die Dimerisierung und für die Interaktion mit den β - und β' -Untereinheiten verantwortlich (Igarashi & Ishihama, 1991). Die kleinere C-terminale Domäne (α -CTD, 8 kDa) kontaktiert die DNA über stromaufwärts der -35 -Region gelegene A-/T-reiche UP-Elemente (Ross *et al.*, 1993). Die α -CTD-RNAP interagiert außerdem mit vielen Transkriptionsaktivatoren, die die DNA stromaufwärts der -35 -Region binden (Busby & Ebright, 1999). Dadurch übernimmt die α -CTD-RNA-Polymerase durch Kontakte mit der DNA und Wechselwirkungen mit Transkriptionsregulatoren wichtige Funktionen zur Regulation der Transkriptionsinitiation (zusammengefaßt in Gourse *et al.*, 2000).

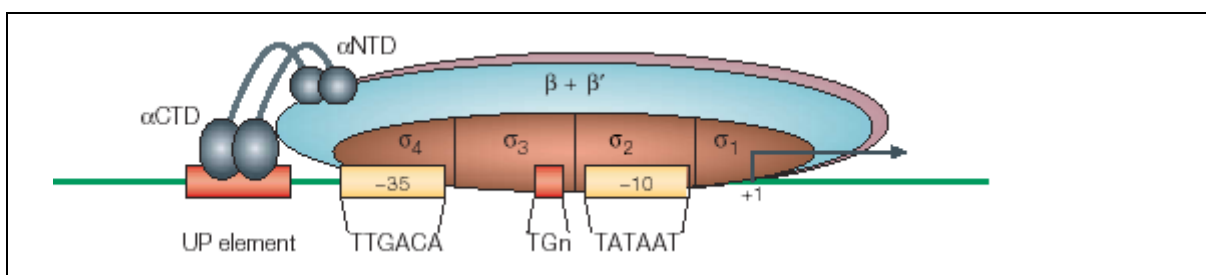


Abb. 1: Interaktion der RNA-Polymerase mit dem Promotor. Die -10 - und -35 -Regionen werden durch den σ -Faktor sequenzspezifisch gebunden. Die beiden α -CTDs kontaktieren das stromaufwärts vom -35 -Element gelegene UP-Element. Das 'extended' -10 -Element ist als TGn dargestellt. $+1$ kennzeichnet den Transkriptionsstartpunkt. (aus Browning & Busby, 2004)

Die Initiation der Transkription kann in verschiedene Phasen unterteilt werden, die durch die Bildung unterschiedlicher RNA-Polymerase-Promotor-Komplexe gekennzeichnet sind (Abb. 2). Durch die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor wird zunächst ein geschlossener binärer Komplex (RPc) gebildet. Hierbei bedeckt die RNA-Polymerase einen Bereich von ca. 60 bp, der sich von Position -55 bis +5 erstreckt (Meccas *et al.*, 1991). Nachfolgend finden Komplexveränderungen statt, die eine Ausweitung des bedeckten Bereichs (-55 bis +20) bewirken (Spassky *et al.*, 1985; Record *et al.*, 1996). Anschließend kommt es zu lokalen Veränderungen der RNA-Polymerase, die ein Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges zur Folge haben. Dabei wird die DNA über eine Länge von ca. 14 bp (-10 bis +2) aufgeschmolzen (Sasse-Dwight & Gralla, 1989). Dieser Komplex wird binärer offener Initiationskomplex (RPO) genannt, da hier die DNA einzelsträngig im Komplex vorliegt und die Bindung der Initiationsnukleotide ermöglicht wird. Sind diese gebunden, so ist die Bildung des Initiationskomplexes (RPinit) abgeschlossen. Nach dem Einbau der ersten Nukleotide kann eine abortive Initiation oder eine produktive Bildung eines Elongationskomplexes erfolgen. Bei einer abortiven Initiation werden kurze Transkripte (2-12 bp) gebildet, die aus dem Promotor-RNA-Polymerase-Komplex entlassen werden. Werden Transkripte mit einer Länge von über 12 Nukleotiden gebildet, wird der σ -Faktor der RNA-Polymerase aus dem Komplex entlassen, und es kommt zur Bildung eines Elongationskomplexes.

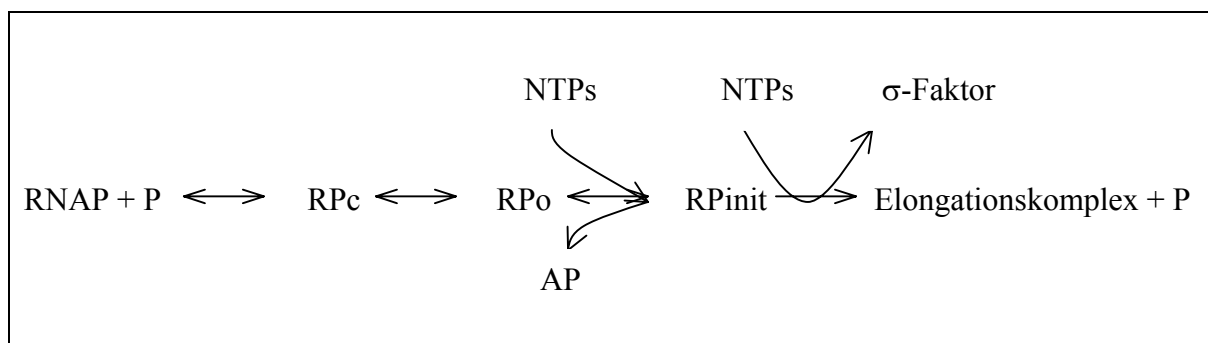


Abb. 2: Initiation der Transkription bei Prokaryoten. RNAP:RNA-Polymerase; P:Promotor; RPc:geschlossener Komplex; RPO:binärer offener Komplex; RPinit:ternärer Initiationskomplex; AP:abortive Produkte.

Jeder Schritt in der Initiation der Transkription bietet einen Angriffspunkt für die Regulation durch Aktivator- und Repressorproteine. Die Transkriptionsaktivierung erfolgt an vielen Promotoren nach relativ einfachen Mechanismen (Abb. 3).

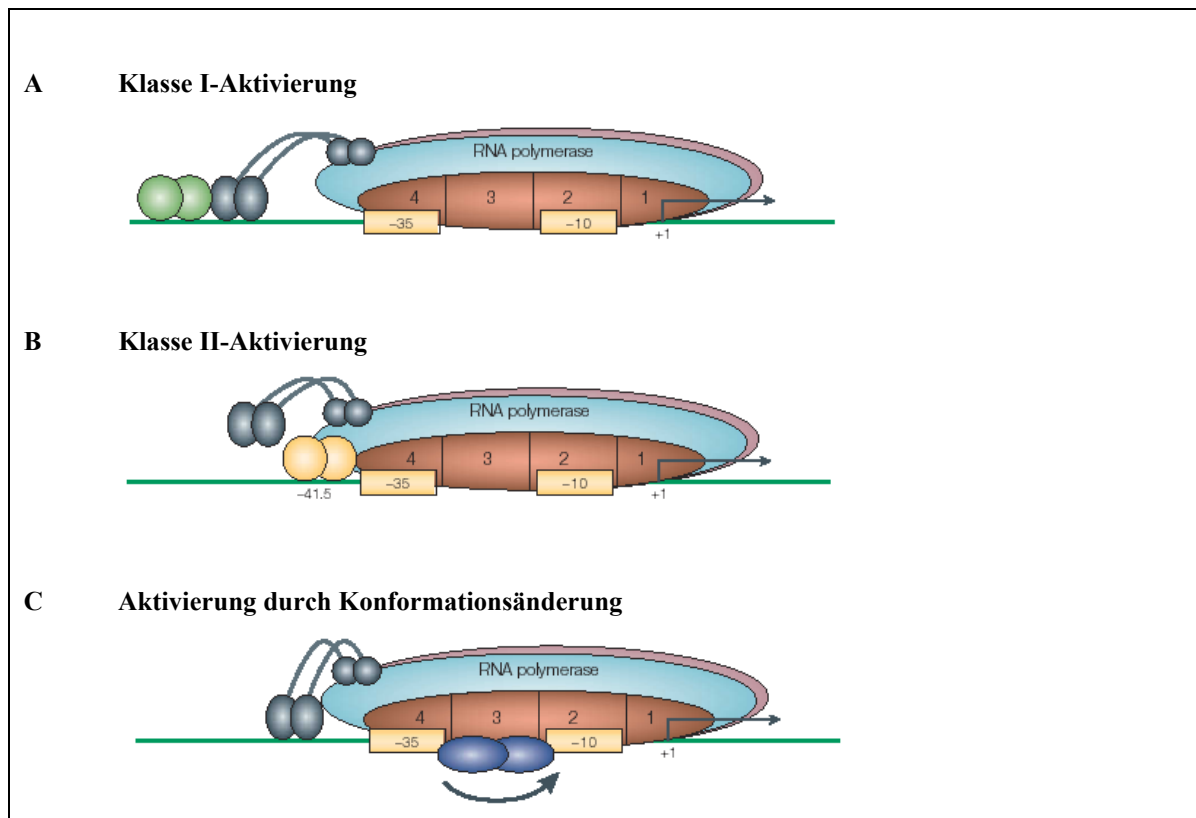


Abb. 3: Aktivierung der Transkriptionsinitiation. A: Der Aktivator bindet stromaufwärts des -35 -Elementes. Durch die Bindung der α -CTD-RNAP erfolgt die Rekrutierung der RNA-Polymerase. B: Der Aktivator bindet nahe der -35 -Region und kontaktiert den σ -Faktor der RNA-Polymerase. C: Durch die Bindung des Aktivators an die -35 - und -10 -Elemente werden diese reorganisiert, so daß die RNA-Polymerase an den Promotor binden kann. Aktivatoren wirken meist als Dimere und sind deshalb als solche dargestellt. (aus Browning & Busby, 2004)

Die Aktivatoren der Klasse I binden an Positionen, die sich stromaufwärts der -35 -Region befinden. Durch Interaktion des Aktivatorproteins mit der α -CTD-RNAP bindet die RNA-Polymerase an den Promotor. Ein Beispiel eines Klasse I-Aktivators ist das CRP-Protein am *lac*-Promotor (Ebright, 1993). Aktivatoren der Klasse II binden an Positionen, die mit der -35 -Region des Promotors überlappen. Dabei interagieren sie mit der Domäne 4 des σ -Faktors. Auf diese Weise aktiviert z.B. das Protein CI des Bakteriophagen λ die Transkription vom Bakteriophagen λ PRM-Promotor (Nickels *et al.*, 2002). Es gibt jedoch auch Klasse II-Aktivatoren, die andere Untereinheiten der RNA-Polymerase (z.B. die α -NTD-RNAP) kontaktieren (Busby & Ebright, 1997). Ein weiterer Mechanismus einer einfachen Transkriptionsaktivierung wurde für Promotoren gefunden, die durch Proteine der MerR-Familie aktiviert werden. Die MerR-Aktivatoren binden die zwischen der -35 - und der -10 -Region gelegenen Basen. Die Zahl der Basenpaare zwischen diesen beiden

Regionen weichen von der eines Konsensuspromotors ab. Durch die Bindung des Aktivators wird eine Konformationsänderung der Promotor-DNA hervorgerufen, wodurch der σ -Faktor der RNA-Polymerase den Promotor binden kann, und folglich die Transkription initiiert wird (Brown *et al.*, 2003).

Repressor-Proteine wirken auf die Transkriptionsinitiation, indem sie (i) die Bindung der RNA-Polymerase an die Promotor-DNA verhindern, (ii) die Bildung eines offenen Initiationskomplexes blockieren und/oder (iii) die RNA-Polymerase am Verlassen der Promotor-DNA behindern.

Die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor kann durch die Bindung eines Repressorproteins an seinen Operator, die durch den Repressor spezifisch gebundene DNA-Sequenz, verhindert werden. Die Operatorsequenz des Repressors überlappt in den meisten Fällen mit der Bindungsregion der RNA-Polymerase, so daß es zu einer sterischen Behinderung kommt (Abb. 4A). Repressor und RNA-Polymerase können folglich nicht simultan an die Promotorregion binden. Beispiele von Transkriptionsrepressoren, die derartig wirken sind der cI-Repressors des Phagen λ am O_{RI} -Operator des viralen p_R -Promotors (Hawley *et al.*, 1985), LacI am O_1 -Operator des des *lac*-Promotors (Schlax *et al.*, 1995, LexA am *uvrA*-Promotor in *E. coli* (Bertrand-Burggraf *et al.*, 1987) sowie das Repressorprotein TyrR am *tyrP*-Promotor in *E. coli* (Yang *et al.*, 2004).

Das Protein p4 aus dem *B. subtilis* Phagen $\phi 29$ kann sowohl als Aktivator als auch als Repressor fungieren. Es aktiviert die Transkription vom späten Promotor A3 und reprimiert die Transkription von den frühen Promotoren A2b und A2c (Rojo & Salas, 1991). Durch die Bindung an eine DNA-Sequenz, lokalisiert an Position -82 vom Promotor A3, erfolgt eine Wechselwirkung zwischen p4 und der C-terminalen Domäne der α -Untereinheit der RNAP, wodurch die Bildung des geschlossenen Komplexes und somit die Aktivierung der Transkription vom Promotor A3 unterstützt wird. Die Bindung von p4 stromaufwärts von P_{A3} verhindert gleichzeitig die Bindung der RNAP an den Promotor A2b, da diese p4-Bindungsregion die -35-Region von P_{A2b} partiell überdeckt (Rojo & Salas, 1991).

Ein weiteres Beispiel eines Repressors, der die RNAP-Bindung verhindert, ist der IcIR-Repressor. IcIR ist ein Repressor des *aceBAK*-Operons in *E. coli* (Sunnarborg *et al.*, 1990, Negre *et al.*, 1992). Der Repressor bindet an die IcIR-Box II (Positionen -52 bis -19) des *aceB*-Promotors und blockiert durch sterische Behinderung die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor (Cortay *et al.*, 1991). Ein weiterer DNA-Bindungsstelle (IcIR-

Box I, Positionen –125 bis –99) des *aceB*-Promotors wird nach der Bildung des offenen Initiationskomplexes von I_cIR gebunden. Die Bindung von I_cIR an diese Box führt zur Dissoziation des offenen Komplexes, dadurch folgt eine Repression der Transkription vom *aceB*-Promotor. Die Interaktion von I_cIR-Box I-gebundenem I_cIR und der α -CTD-RNA-Polymerase führt vermutlich zur Repression am *aceB*-Promotor (Yamamoto & Ishihama, 2003). I_cIR wirkt auch autoregulatorisch, indem es an eine I_cIR-Box (-21 bis +14) bindet, die mit dem *icIR*-Promotor überlappt. Dadurch wird die Bindung der RNA-Polymerase verhindert und folglich die Expression von *icIR* reprimiert (Gui *et al.*, 1996).

Repressoren können jedoch auch die Bindung der RNA-Polymerase verhindern, indem sie an Operatoren binden, die nicht mit der Promotorsequenz überlappen (Abb. 4B). Ein Beispiel ist der CytR-Repressor am *deoP2*-Promotor aus *E. coli*. Der Transkriptionsaktivator cAMP-CRP bindet als Dimer die DNA an den Nukleotidpositionen –93 und –41 des *deoP2*-Promotors, während CytR mit der DNA zwischen diesen beiden Positionen wechselwirkt. Durch die Bindung von CytR erfolgt eine Konformationsänderung des stromabwärts befindlichen cAMP-CRP-Komplexes. Dadurch wird die Interaktion von CRP mit der α -CTD-RNA-Polymerase gestört, so daß die RNA-Polymerase den Promotor nicht effektiv binden kann. Der CytR-Repressor wirkt damit als Antiaktivator am *deoP2*-Promotor (Valentin-Hansen *et al.*, 1996; Shin *et al.*, 2001). Ein weiteres Beispiel eines Repressors, der als Antiaktivator wirkt, ist der FNR-Repressor, der als Dimer die Expression von *ndh* in *E. coli* reprimiert, indem er die essentielle Interaktion zwischen der α -CTD, der DNA und dem Transkriptionsaktivator Fis inhibiert (Jackson *et al.*, 2004).

Die Bindung der RNA-Polymerase kann auch blockiert werden, indem eine Bildung von Schleifen innerhalb der Promotorregion stattfindet (Abb. 4C). Dabei binden mehrere Repressormoleküle an DNA-Bereiche, die sich weit entfernt der –35- und –10- Regionen befinden können. Durch die Interaktion der gebundenen Repressormoleküle untereinander erfolgt die Bildung von Schleifen in der DNA. Durch die Veränderung der DNA-Struktur kann die RNA-Polymerase den Promotor nicht effizient binden, wodurch die Initiation der Transkription inhibiert wird. Ein Beispiel eines Proteins, das auf diese Weise wirkt, ist GalR als Repressor der Transkription vom *gal*-Promotor (Lewis & Adhya, 2002).

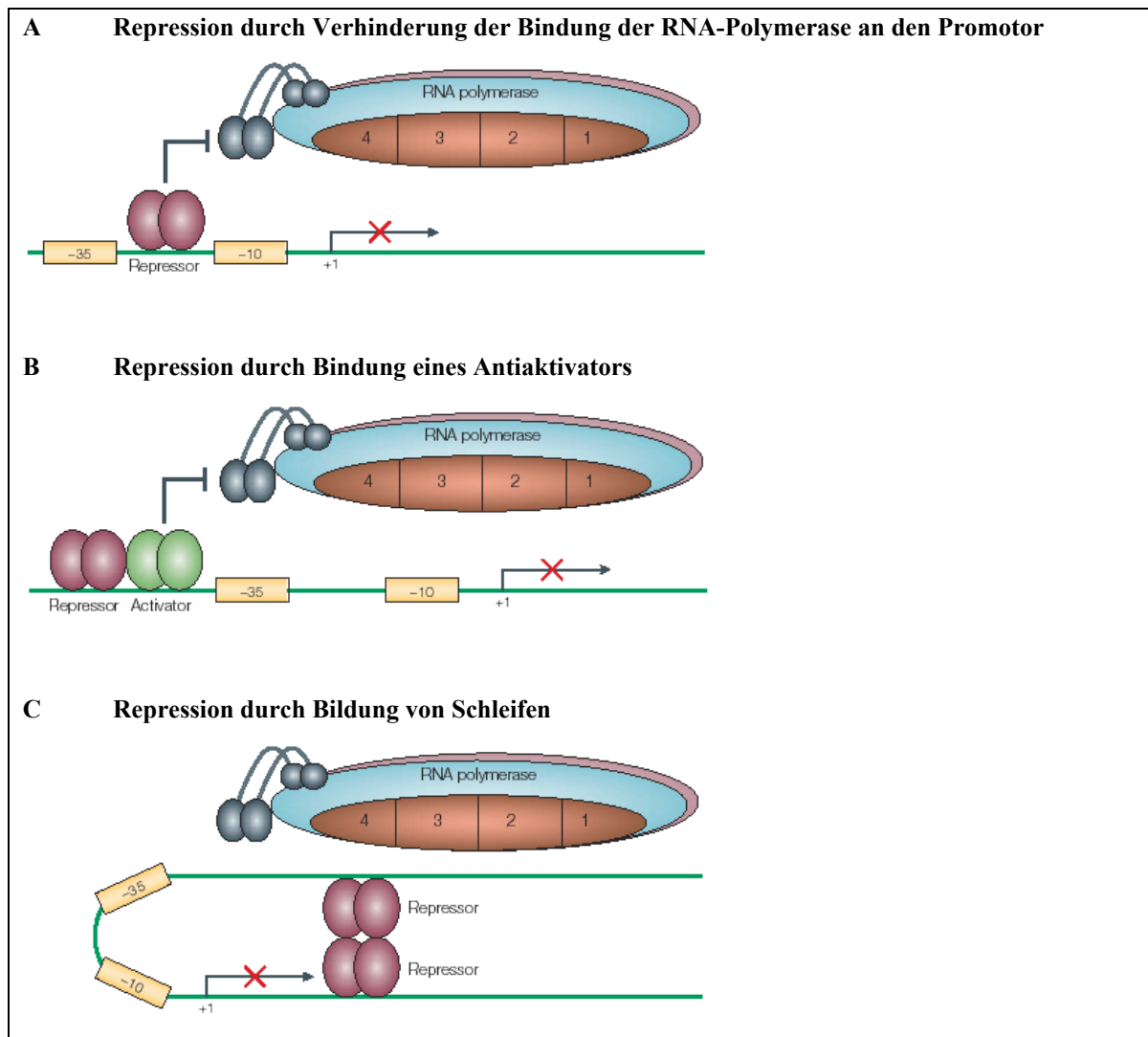


Abb. 4: Repression der Transkriptionsinitiation. A: Durch die Bindung des Repressors an einen die RNAP-Bindungsregion überlappenden Operator wird die Erkennung des Promotors durch die RNA-Polymerase verhindert. B: Der Repressor bindet einen Transkriptionsaktivator, wodurch die Rekrutierung der RNA-Polymerase an den Promotor verhindert wird. C: Zwei an verschiedenen Positionen bindende Repressordimere interagieren miteinander. Dadurch erfolgt eine Schleifenbildung am Promotor, die die Bindung der RNA-Polymerase verhindert. (aus Browning & Busby, 2004)

Viele Repressoren binden an die Promotor-DNA, während die RNA-Polymerase gleichzeitig an den Promotor binden kann. Der Repressionsmechanismus solcher Proteine beruht auf der Inhibition von Komplexbildungen, die nach der RNAP-Bindung während der Transkriptionsinitiation erfolgen. Die RNA-Polymerase kann durch die Bindung des Repressors daran gehindert werden, den doppelsträngigen DNA-Bereich um die -10-Region des Promotors zu öffnen, so daß die Bildung eines offenen Initiationskomplexes verhindert wird. Dabei kann die Bindungsregion des Repressors den Bindungsort der RNA-Polymerase partiell überdecken. Transkriptionsepressoren, die die Bildung eines

offenen Initiationskomplexes verhindern, sind beispielsweise MerR am *merT*-Promotor in *E. coli* (Heltzel *et al.*, 1990), SpoOA am *abrB*-Promotor in *B. subtilis* (Greene & Spiegelman, 1996) und Arc am *Pant*-Promotor des Phagen P22 (Smith & Sauer, 1996). Das Protein p6 reprimiert die Transkription vom Promotor C2 des Phagen ϕ 29, indem es den geschlossenen Initiationskomplex stabilisiert (Camacho & Salas, 2001).

Der 434-Repressor des lambdoiden Phagen 434 fungiert sowohl als Transkriptionsaktivator als auch als –repressor. Die Operatorregion (O_R), die das Zentrum eines komplexen Regulationsmechanismus zur lytischen bzw. lysogenen Entwicklung des Phagen bildet, enthält die beiden divergent orientierten Promotoren P_R und P_{RM} . Die Transkription von diesen Promotoren wird durch die Bindung des 434-Repressors an drei Operatorregionen (O_{R1} , O_{R2} , O_{R3}), die partiell mit P_R und P_{RM} überlappen, reguliert. In Abwesenheit des Repressors initiiert die RNAP lediglich die Transkription von P_R , P_{RM} ist inaktiv. Durch die Bindung des 434-Repressors an die Operatorregion O_{R2} wird die Transkription vom Promotor P_{RM} aktiviert. Gleichzeitig erfolgt eine Repression der Transkription vom Promotor P_R . Durch $KMnO_4$ -Footprinting-Experimente konnte nachgewiesen werden, daß der durch den 434-Repressor verursachte inhibitorische Effekt auf die Transkription vom Promotor P_R auf eine Blockierung der Bildung eines offenen Transkriptionsinitiationskomplexes zurückzuführen ist (Xu & Koudelka, 2001).

Das TyrR-Protein aus *E. coli* wirkt sowohl als Aktivator als auch als Repressor auf die Transkription der Gene des TyrR-Regulons (siehe Übersichtsartikel Pittard, 2005). Für eine effiziente Regulation interagiert TyrR mit ATP, Tyrosin oder Phenylalanin. In Anwesenheit von Phenylalanin liegt TyrR als Dimer vor, in Anwesenheit von Tyrosin und ATP bildet es hingegen ein Hexamer. *TyrB* ist eines der Gene, deren Expression durch TyrR inhibiert wird. Die Bindungsorte von TyrR liegen stromabwärts von der –10-Region des *tyrB*-Promotors. In Anwesenheit von Tyrosin verhindert die Bindung des TyrR-Hexamers an diese Bindungsorte die Bildung des offenen Transkriptionsinitiationskomplexes (Yang *et al.*, 2002). Ähnliche Beobachtungen wurden für die Regulation der Transkription von *aroP* durch TyrR gemacht. Die TyrR-Bindungsorte am *aroPP2*-Promotor befinden sich ebenfalls unmittelbar stromabwärts von der –10-Region. Durch die Tyrosin-vermittelte Bindung von TyrR an diese Bindungsorte wird die Bildung des offenen Initiationskomplexes blockiert (Yang, 1999).

Die Transkription von den beiden Promotoren *P1* und *P2* des *gal*-Operons in *E. coli* wird durch eine GalR-vermittelte Schleifenbildung der DNA innerhalb der Promotorregion inhibiert. Für die Schleifenbildung ist das Protein HU essentiell. In Abwesenheit von HU

wird die Transkription vom Promotor P_1 durch die Bindung von GalR an einen stromaufwärts von P_1 befindlichen Operator (O_E) reprimiert (Choy *et al.*, 1995). Das Repressorprotein GalR wirkt am Promotor P_1 , indem es die Bildung eines offenen Transkriptionsinitiationskomplex verhindert (Roy *et al.*, 2004). GalR aktiviert zudem die Transkription vom Promotor P_2 . Sowohl für die Transkriptionsaktivierung als auch -repression sind Wechselwirkungen zwischen GalR und der C-terminalen Domäne der α -Untereinheit der RNA-Polymerase verantwortlich (Choy *et al.*, 1997).

Für die Bildung eines produktiven Elongationskomplexes muß die RNA-Polymerase die Bindung mit der Promotor-DNA lösen. Einige Transkriptionsrepressoren behindern die RNA-Polymerase am Verlassen der Promotor-DNA ('promotor clearance'), so daß folglich die Bildung eines produktiven Elongationskomplexes nicht stattfinden kann. Ein Beispiel ist das LexA-Protein, das die Transkription vom *recA*-Promotor in *Rhodobacter sphaeroides* reguliert (Tapias *et al.*, 2002). Das H-NS-Protein aus *E. coli* wirkt inhibierend auf die Transkription vom *rrnB* P1-Promotor, indem es durch Überstabilisierung des offenen Initiationskomplexes nach Verknüpfung der ersten drei NTPs die weitere Transkription blockiert (Schröder & Wagner, 2000, Dame *et al.*, 2002). Das Protein p4 des Phagen $\phi 29$ wirkt inhibierend auf die Transkription vom A2c-Promotor durch Bindung an eine stromaufwärts von der RNAP-Bindungsregion befindliche DNA-Region (Position – 71). Dabei bildet sich eine Wechselwirkung zwischen p4 und der C-terminalen Domäne der α -Untereinheit der RNA-Polymerase aus, die dazu führt, daß die RNA-Polymerase am Verlassen des Promotors gehindert wird. Kurze abortive Transkripte werden gebildet, die Ausbildung eines produktiven Elongationskomplexes kann jedoch nicht erfolgen (Monsalve *et al.*, 1996; Monsalve *et al.*, 1998).

PhoP ist ein Regulatorprotein des Zwei-Komponenten-Systems PhoQ-PhoP, das eine Reihe von Genen in *E. coli* reguliert als Reaktion auf die extrazelluläre Mg^{2+} -Konzentration. Die Promotorregionen der unter der Kontrolle von phosphoryliertem PhoP stehenden Gene enthalten ein 'direct repeat', das als PhoP-Bindungsort fungiert. PhoP reguliert die beiden divergent orientierten Gene *mgtA* und *treR*. Die 20 bp-lange PhoP-Bindungsregion liegt zwischen den Positionen –29 und –48 des *treR*_{P3}-Promotors (entspricht den Positionen –43 bis –24 von *mgtA*_{P1}). Während PhoP die Transkription vom Promotor *mgtA*_{P1} aktiviert, wird die Transkription vom Promotor *treR*_{P3} reprimiert. Für die effiziente Transkriptionsrepression am Promotor *treR*_{P3} ist die Anwesenheit der α -CTD-RNA-Polymerase erforderlich. Vermutlich ist der inhibitorische Effekt auf Protein-Protein-

Wechselwirkungen zwischen der RNA-Polymerase und PhoP zurückzuführen (Yamamoto *et al.*, 2002).

Eine Vielzahl prokaryotischer Transkriptionsrepressoren ist sehr ausführlich charakterisiert worden. Bis jetzt gibt es jedoch wenige Kenntnisse über Protein-Protein-Interaktionen zwischen der RNA-Polymerase und Repressoren. Interaktionen zwischen der α -CTD-RNA-Polymerase und Transkriptionsrepressoren wurden bisher nur für wenige Proteine wie für das Protein p4 des Phagen ϕ 29 (Monsalve *et al.*, 1996), PhoP (Yamamoto *et al.*, 2002) sowie IcIR (Yamamoto & Ishihama, 2003) und GalR (Choy *et al.*, 1995, Roy *et al.*, 2004) vermutet.

1.2. Regulation der Kopiezahl von Plasmiden

Bakterien können extrachromosomale zirkuläre DNA-Moleküle, sogenannte Plasmide, enthalten. Plasmide besitzen, ähnlich wie das bakterielle Chromosom, einen eigenen Replikationsursprung und replizieren autonom. Trotz dieser autonomen Replikation wird für die Plasmidreplikation die Replikationsmaschinerie des Wirtsbakteriums benutzt. Die Kontrolle der Plasmidreplikation erfolgt jedoch durch plasmidkodierte Systeme. Die Kopiezahl eines bestimmten Plasmides in der Zelle ist ein plasmidspezifisches Merkmal. Für die Aufrechterhaltung einer konstanten Plasmidkopiezahl in der Zelle ist eine stringente Regulation der Plasmidkopiezahl unerlässlich. In Abhängigkeit von der Art des kontrollierenden Faktors, werden zwei Kontrollmechanismen unterschieden: (i) die durch Iterons ('direct repeats') vermittelte Regulation und (ii) die antisense-RNA-vermittelte Regulation ohne oder mit Beteiligung eines zusätzlichen Proteinfaktors.

Die durch Iterons vermittelte Regulation wird von einer Vielzahl von Plasmiden (z.B. F-Plasmid, P1 und pSC101) gramnegativer Wirte verwendet (siehe dazu Übersichtsartikel Chattoraj, 2000). Die Regulation der Plasmidkopiezahl durch antisense-RNAs erfolgt durch unterschiedliche Mechanismen (Übersichtsartikel Brantl, 2002): durch (i) Inhibition der Reifung des für die Replikation essentiellen Primers (ColE1), (ii) Induktion eines vorzeitigen Transkriptionsabbruchs der *rep*-mRNA (pT181, Plasmide der *inc18*-Familie), (iii) Inhibition der Translation des essentiellen Rep-Proteins (R1) oder aber durch (iv) Inhibition der Bildung eines 'pseudoknot', der für die Translation des Rep-Proteins erforderlich ist (Plasmide der IncB- und IncI α -Familien). Die Replikation einiger Plasmide wird durch eine antisense-RNA und einem Cop-Protein reguliert, das als

Transkriptionsrepressor am *rep*-Promotor fungiert. Beispiele hierfür sind die Plasmide der *inc18*-Familie (pIP501, pAM β 1, pSM19035), das Plasmid R1 und das der pMV158-Familie zugehörige Plasmid pLS1.

Die Replikation des *E. coli* Plasmides R1 wird durch das Protein CopB und durch eine antisense-RNA, CopA, reguliert. CopB (11 kDa) wirkt als Transkriptionsrepressor am *repA*-Promotor, kontrolliert somit die Synthese des Replikationsinitiationsproteins RepA (Blomberg *et al.*, 1992). CopB bildet Tetramere und bindet an eine stromaufwärts vom *repA*-Promotor gelegene symmetrische Operatorsequenz (Light & Molin, 1982, Riise & Molin, 1986). Die Replikation des Streptokokkenplasmides pLS1 wird durch das Repressorprotein CopG und durch eine antisense-RNA (RNAII) reguliert. CopG und antisense-RNA sind an der Regulation der Synthese des essentiellen Replikationsinitiationsproteins RepB beteiligt (del Solar *et al.*, 1992). CopG (5.1 kDa) hemmt die Transkription vom Promotor *Pcr*, der die Synthese der *copG-repB*-mRNA steuert, und wirkt damit autoregulatorisch. CopG bindet als Dimer zwei aufeinanderfolgende große Furchen auf derselben Seite der DNA. Die Bindungsregion von CopG erstreckt sich über einen Bereich von über 50 bp und beinhaltet ein 13 bp-langes 'imperfect repeat' (del Solar *et al.*, 1995), das die -35-Box des Promotors *Pcr* überdeckt. Durch die Bindung eines CopG-Tetramers an den Operator wird eine drastische Biegung der DNA von 50°-60° induziert. Die Kristallisation von CopG zeigte, daß das Protein eine Ribbon-Helix-Helix-Struktur aufweist (Gomis-Rüth *et al.*, 1998, Costa *et al.*, 2001).

An der Kopiezahlregulation der Plasmide der *inc18*-Familie, die nach dem theta-Mechanismus replizieren, sind ebenfalls eine antisense-RNA und ein Cop-Protein beteiligt. Die Plasmide der *inc18*-Familie pIP501, pAM β 1 und pSM19035 kodieren die Proteine CopR, CopF bzw. CopS (Swinfield *et al.*, 1990; Ceglowski *et al.*, 1993, Brantl, 1994). Die drei Cop-Proteine (10.6 kDa) weisen eine hohe Sequenzhomologie auf. CopF und CopS unterscheiden sich von CopR lediglich durch den Aminosäureaustausch in den Positionen 51 und 80 sowie durch zwei zusätzliche Aminosäuren (CopF) bzw. durch die Deletion von zwei Aminosäuren (CopS) im C-Terminus. Für CopF wurde ein HTH-Bindungsmotiv im Bereich zwischen den Aminosäuren 16 und 37 vermutet, seine Operatorsequenz auf eine 31 bp-lange Region eingegrenzt (Le Chatelier *et al.*, 1994). CopS ist hingegen nicht näher charakterisiert. Die Plasmide pIP501, pAM β 1 und pSM19035 zeigen außerdem ausgeprägte Identitäten (>90 %) in ihren Replikationsregionen. Der an der Regulation der Kopiezahl des Plasmides pIP501 beteiligte Transkriptionsrepressor CopR soll im folgenden ausführlich dargestellt werden.

1.3. Eigenschaften des Transkriptionsrepressors CopR

Das zur *inc18* Inkompatibilitätsgruppe gehörende Plasmid pIP501 wurde ursprünglich aus *Streptococcus agalactiae* (Horodniceanu *et al.*, 1976) isoliert. Der Wirtsbereich von pIP501 erstreckt sich jedoch auf viele grampositive Bakterien. Die Replikation des Plasmides pIP501 wird durch zwei Komponenten reguliert: dem Transkriptionsrepressor CopR und einer antisense-RNA (RNAIII) (Brantl & Behnke, 1992a). Sie regulieren die Syntheserate des Geschwindigkeits-limitierenden Replikationsproteins RepR (Brantl & Behnke, 1992b). Die Abb. 5 illustriert die Regulation der Kopiezahl von pIP501. Durch die Wechselwirkung zwischen der 136 nt-langen RNAIII und der *repR*-mRNA (RNAII) erfolgt ein vorzeitiger Transkriptionsabbruch der *repR*-mRNA (Brantl *et al.*, 1993; Brantl & Wagner, 1994).

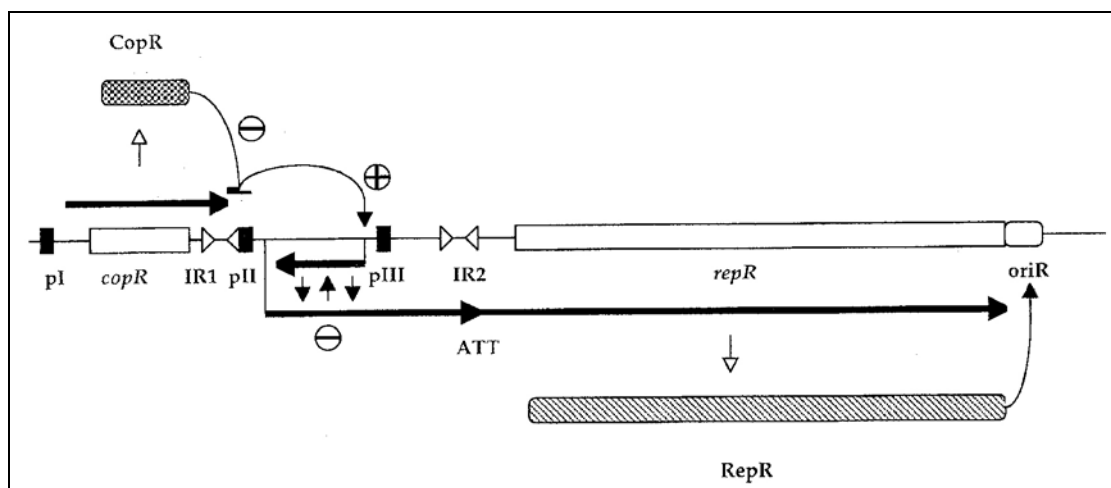


Abb. 5: Modell der Kopiezahl-Kontrolle des Plasmides pIP501. Die Promotoren pI, pII und pIII sind durch schwarze Kästchen, die Leserahmen durch weiße Rechtecke dargestellt. Die schraffierten Rechtecke kennzeichnen die Genprodukte CopR und RepR. RNAI, RNAII und RNAIII sind durch waagerechte Pfeile gekennzeichnet. IR1 und IR2 verdeutlichen die 'inverted repeats' stromaufwärts von pII bzw. stromabwärts von pIII. ATT stellt die Position dar, an der die Termination von RNAII induziert wird. (aus Steinmetzer & Brantl, 1998)

CopR ist ein aus 92 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von 10.6 kDa. CopR wirkt als Transkriptionsrepressor am *repR*-Promotor pII, indem es an ein stromaufwärts von pII liegenden 'inverted repeat' (IR1) bindet (Brantl, 1994). Durch diese Repression wird gleichzeitig die konvergente Transkription von den Promotoren pII und pIII (*rnaIII*-Promotor) verhindert, da indirekt eine erhöhte Transkriptionsaktivität vom

rnaIII-Promotor pIII bewirkt wird (Brantl & Wagner, 1997). Mutationen und Deletionen im *copR*- bzw. *rnaIII*-Gen bewirken eine 10-20fache Erhöhung der Plasmidkopiezahl, wohingegen eine gleichzeitige Deletion beider Gene keinen additiven Effekt zeigt (Brantl & Behnke, 1992a).

Durch Methylierungsinterferenz-Experimente konnte gezeigt werden, daß CopR die DNA in der großen Furche kontaktiert. CopR bindet als Dimer zwei aufeinanderfolgende große Furchen auf derselben Seite der DNA (Steinmetzer *et al.*, 1998). Die CopR-Erkennungssequenz besteht aus zwei nahezu symmetrischen 4-5 bp-langen Bindungsstellen (I und II) mit dem Konsensusmotiv 5'-CGTG, die durch einen 7 bp-langen *spacer* voneinander getrennt sind (Steinmetzer & Brantl, 1997). Die Dissoziationskonstanten des CopR-Dimers (0.4×10^{-9} M) und des CopR-DNA-Komplexes (1.44×10^{-6} M) wurden durch analytische Ultrazentrifugation bestimmt (Steinmetzer *et al.*, 1998). Die Abschätzung der intrazellulären CopR-Konzentration in *B. subtilis* ergab, daß 15000 CopR-Moleküle (Monomere) pro Zelle vorliegen. Das entspricht einer intrazellulären CopR-Konzentration von $20-30 \times 10^{-6}$ M (Steinmetzer *et al.*, 1998).

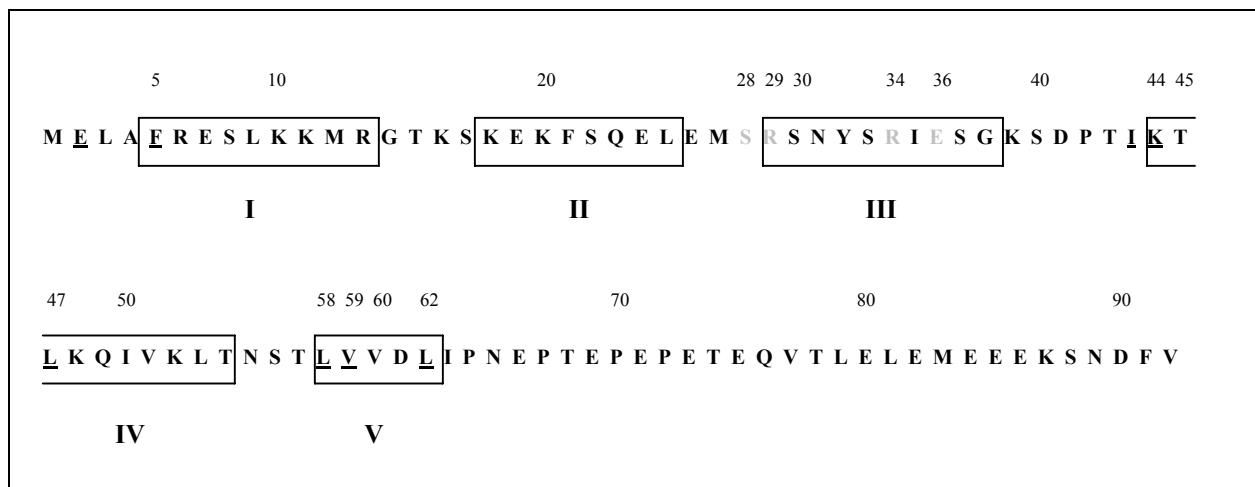


Abb. 6: Aminosäuresequenz von CopR. Die durch ein Strukturmodell vorhergesagten α -Helices (I-V) sind in Boxen dargestellt. Die Aminosäuren, die nach dem Modell direkt oder indirekt an der DNA-Bindung beteiligt sind, sind hell gedruckt. Die unterstrichenen Aminosäuren sind an der Dimerisierung beteiligt. Die Nummerierung kennzeichnet die Position der Aminosäuren beginnend vom N-Terminus. (nach Steinmetzer *et al.*, 2000a)

CopR ist ein HTH-Protein der λ -Repressor-Familie, das mit der DNA über ein Helix-Turn-Helix-Motiv in Wechselwirkung tritt (Steinmetzer *et al.*, 2000a). Durch ein 3D-Strukturmodell der ersten 63 N-terminalen Aminosäuren von CopR und durch

Mutationsanalysen konnten Aminosäuren identifiziert werden, die an der Interaktion mit der DNA und an der CopR-Dimerisierung beteiligt sind (Steinmetzer *et al.*, 2000a; Steinmetzer *et al.*, 2000b). Laut der Strukturvorhersage von CopR bilden die ersten 63 Aminosäuren 5 α -Helices (Abb. 6). Die Helix I wird von den Aminosäuren 5-13 gebildet. Helix II umfaßt die Aminosäuren 18-25, Helix III die Aminosäuren 29-37. Diese beiden Helices bilden das HTH-Motiv. Während Helix II der Stabilisierung dient, bildet Helix III die DNA-Erkennungshelix. Helix IV (Aminosäuren 44-54) und Helix V (Aminosäuren 58-62) sind an der Dimerisierung beteiligt (Steinmetzer *et al.*, 2000b).

Die für die Dimerisierung essentiellen Aminosäuren liegen zwischen den Positionen 38 und 65 (Abb. 6). E2 und F5 in der N-terminalen Region von CopR interagieren mit Aminosäuren innerhalb des CopR-Monomers (Steinmetzer *et al.*, 2000b). R29 und R34 liegen in der Erkennungshelix (Helix III) des Helix-Turn-Helix-Motivs und kontaktieren vermutlich die Operator-DNA sequenzspezifisch an G240 (Bindungsort I) und G254 (Bindungsort II) bzw. an G242/T243 (Bindungsort I) und G251 (Bindungsort II). C239 und C255 in den Bindungsorten (I und II) des CopR-Operators werden wahrscheinlich über Wasserstoffbrücken-Bindungen vom E19 des CopR kontaktiert (Steinmetzer *et al.*, 2000a). K10, S28 und E36 wechselwirken mit den Basen der Operator-DNA über das Phosphatrückgrat der DNA (Abb. 7).

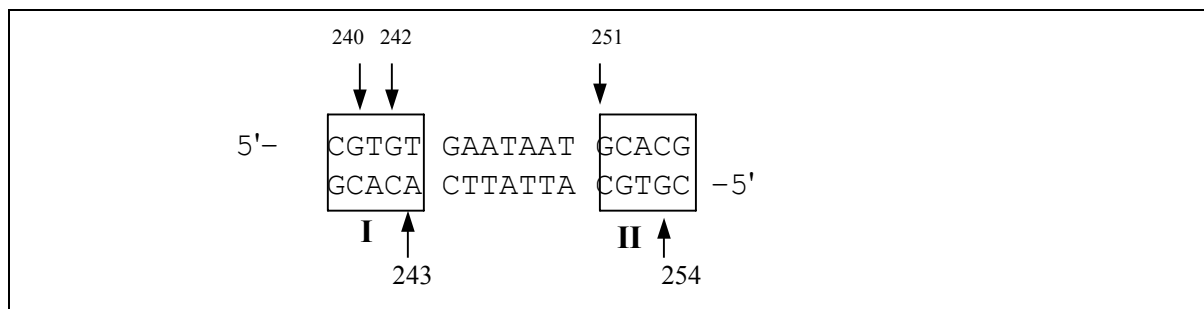


Abb. 7: CopR-Operatorsequenz. Die durch CopR spezifisch kontaktierten Nucleotide in den Bindungsorten I und II sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Die durch 'pulse-chase'-Experimente ermittelten Halbwertszeiten von C-terminal verkürzten CopR-Mutanten zeigten, daß der überwiegend aus sauren Aminosäuren bestehende C-Terminus von CopR für die Stabilität des Proteins essentiell ist. Die letzten 29 C-terminalen Aminosäuren sind weder für die Protein-Dimerisierung, noch für die DNA-Bindung notwendig (Kuhn *et al.*, 2000). Durch CD-Experimente konnte gezeigt werden, daß zwischen den Aminosäuren 76 bis 84 eine β -Faltblatt-Struktur gebildet wird,

die als ein wichtiges Stabilisierungselement fungiert (Kuhn *et al.*, 2002). Hydroxylradikal-Footprinting-Experimente ließen vermuten, daß die Konformation des DNA-Rückgrates durch die CopR-Bindung verändert wird. Durch FRET-Messungen konnte nach Bindung von CopR eine Biegung der Operator-DNA von 20-25 ° festgestellt werden (Steinmetzer *et al.*, 2002).

1.4. *In vitro*-Selektion funktioneller Nukleinsäuremoleküle durch SELEX

Die SELEX-Methode (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) basiert auf einer wiederholten Anwendung des Prinzips der Selektion und Amplifikation von Nukleinsäuren einer gewünschten Funktionalität. Dabei werden aus einer kombinatorischen Bibliothek von bis zu 10^{16} verschiedenen chemisch synthetisierten Molekülen in einem zyklischen Prozeß Oligonukleotide selektiert, die eine Sekundärstruktur ausbilden und dadurch Affinitäten zu einer vorgegebenen Zielstruktur haben. Zielstrukturen können extrazelluläre Proteine, Membranrezeptoren, aber auch Zucker- oder Lipidstrukturen sein. Das Prinzip der Nukleinsäureselektion ist in Abb. 8 dargestellt. Während der chemischen Synthese eines Oligodesoxyribonukleotides werden zwischen zwei festgelegten Sequenzen zufällig Nukleotidbausteine eingebaut. Die festgelegten Sequenzen dienen als Primer für die PCR. Das Resultat der Synthese ist ein Gemisch von Oligodesoxyribonukleotiden, in dem mindestens jeweils ein Oligodesoxyribonukleotid zu finden ist, das an einer der randomisierten Positionen jeweils ein definiertes Nukleotid trägt. Mit Hilfe eines PCR-Verfahrens werden die Oligodesoxyribonukleotide amplifiziert, um die Anzahl der individuellen Oligodesoxyribonukleotide innerhalb des Gemisches zu erhöhen. Da Oligoribonukleotide komplexere dreidimensionale Strukturen als entsprechende Oligodesoxyribonukleotide haben, wird die Bibliothek von DNA-Oligonukleotiden mit Hilfe einer RNA-Polymerase in RNA-Oligonukleotide übersetzt. Durch Affinitätschromatographie, Protein-Nukleinsäure-Bindung an Nitrozellulose-Filter oder Gelelektrophorese werden die Oligonukleotide isoliert, die mit besonders hoher Affinität an die vorgegebene Zielstruktur binden. Da die selektierten Oligonukleotide nur in sehr kleinen Mengen vorliegen, wird ein weiterer Amplifikationsschritt angeschlossen. Dazu werden die RNA-Oligonukleotide nach dem Selektionsschritt durch reverse Transkription in DNA umgeschrieben. Die DNA-Moleküle werden anschließend durch PCR amplifiziert. Danach wird eine weitere

SELEX-Runde gestartet, indem wieder RNA-Oligonukleotide hergestellt werden. Da nur ein geringer Bruchteil der in der Anfangsbibliothek enthaltenen Molekülvarianten die gewünschte Affinität für die Zielstruktur besitzt, sind mehrere Selektionszyklen nötig. Durch mehrmaliges Durchlaufen des ganzen Verfahrens werden schließlich nur wenige Oligoribonukleotide selektiert, die mit hoher Affinität an die vorgegebene Zielstruktur binden. Die hochaffinen Oligonukleotide werden als Aptamere bezeichnet. Meist werden die Oligodesoxyribonukleotide nach 5-10 SELEX-Zyklen kloniert und sequenziert. Über einen Sequenzvergleich können gemeinsame Motive identifiziert und die funktionellen und strukturellen Eigenschaften einzelner klonierter Moleküle untersucht werden. Über einen Konsensusmotiv-Vergleich und eine phylogenetische Sequenzanalyse ist es möglich, Vorhersagen zur Sekundär- bzw. Tertiärstruktur der selektierten Oligonukleotide zu treffen.

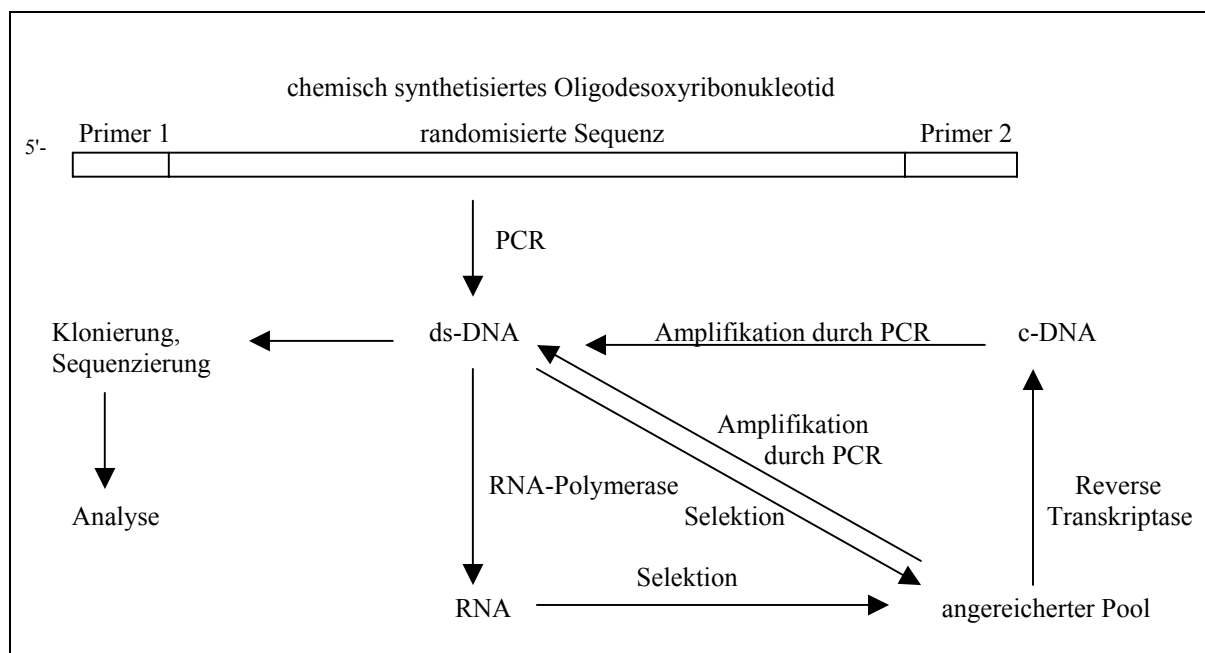


Abb. 8: *In vitro*-Selektion funktioneller DNA- und RNA-Moleküle durch SELEX. Aus einem Nucleinsäure-Pool können DNA- oder RNA-Moleküle mit einer gewünschten Eigenschaft durch wiederholte Selektions- und Amplifikationszyklen isoliert werden.

Das SELEX-Verfahren wurde 1990 unabhängig voneinander in drei verschiedenen Arbeitsgruppen entwickelt (Ellington & Szostak, 1990; Robertson & Joyce, 1990; Tuerk & Gold, 1990). Durch die Anwendung der SELEX-Technik konnten Ribozyme identifiziert werden, die eine Vielzahl chemischer Prozesse katalysieren, wie die Spaltung, Ligation, Alkylierung und Synthese von RNA. Außerdem wurden durch die *in vitro*-Selektion von

Nukleinsäuren Aptamere gefunden, die an Ionen, Peptide, Proteine und sogar Viren binden. Die SELEX-Technik wird zur Gewinnung von hochaffinen Oligonukleotiden eingesetzt, die als Inhibitoren physiologische Prozesse wirken. So können hochspezifische Rezeptoren auf DNA-/RNA-Basis erzeugt werden, die medizinisch relevante Proteine binden. Auf diese Weise ist es möglich, neue Pharmazeutika auf der Basis von RNA- bzw. DNA-Oligonukleotiden herzustellen. An dieser Stelle soll hier auf die Übersichtsartikel von Wilson & Szostak (1999) und Joyce (2004) verwiesen werden.

Um die essentiellen Nukleotide des DNA-Bindungsereiches eines DNA-bindenden Proteins zu bestimmen, ist es möglich, die Nukleotide der Bindungsstelle systematisch zu verändern. Ein zu diesem Zweck rationellerer Weg ist es, nach der SELEX-Technik ein Gemisch aus Oligonukleotiden mit allen möglichen DNA-Sequenzen einzusetzen und das Oligonukleotid mit optimaler Bindungssequenz zu selektieren. Auf diese Weise ist es möglich, DNA-Bindungsmotive von Proteinen durch SELEX-Experimente zu untersuchen. Durch die Anwendung der SELEX-Technik konnte eine Konsensussequenz der Bindungsorte von LRP (leucine-responsive regulatory protein), das als Transkriptionsaktivator am *ilvIH*-Operon in *E. coli* wirkt, aus selektierten DNA-Oligonukleotiden ermittelt werden (Cui *et al.*, 1995). Ebenso wurden DNA-Sequenzen des UP-Elementes vom *E. coli rrnB* P1-Promotor identifiziert, die *in vivo* eine höhere Promotoraktivität als das *rrnB* P1-UP-Element aufwiesen (Estrem *et al.*, 1998). Durch *in vitro*-Selektion wurden ebenfalls die DNA-Bindungsstelle des Methionin-Repressors MetJ aus *E. coli* untersucht (He *et al.*, 1996). Mittels einer *in vitro*-Selektion der Bindungsstelle des bakteriellen IHF (integration host factor) wurde der Einfluß der 5'-Bindungsdomäne auf die Struktur, Affinität und Funktion des IHF-DNA-Komplexes untersucht (Goodman, 1999). Ein ungewöhnlicher DNA-Bindungsmodus wurde für TRF1, einem Regulator der Telomerlänge in Vertebraten, gefunden (Bianchi *et al.*, 1999). Durch SELEX-Experimente wurden DNA-Aptamere mit hoher Bindungsaffinität zur RNase H der HIV-1 Reversen Transkriptase isoliert. Die selektierten Oligonukleotide konnten die HIV-1 RNase H-Aktivität *in vitro* inhibieren (Andreola *et al.*, 2001). Um die DNA-Bindungsspezifität des *Bradyrhizobium japonicum* Response-Regulators RegR am *fixR-nifA*-Operon detaillierter zu untersuchen, wurde ebenfalls das SELEX-Verfahren angewandt. Das führte zur Isolation von RegR-Bindungssequenzen, die ein 'inverted repeat' aufwiesen (Emmerich *et al.*, 2000). Das DNA-Einzelstrang-Bindungsprotein g5p des Phagen Ff bindet mit hoher Affinität an Nukleinsäuren, die G-Quadruplex-Strukturen und DNA-'hairpins' bilden (Wen & Gray, 2004). Desweiteren wurde der Einfluß der N-terminalen Domäne des

Repressorproteins Mnt des Phagen P22 auf die DNA-Bindungsspezifität durch *in vivo*- und *in vitro*-Selektion untersucht (Silbaq *et al.*, 2002). Die vielfältigen Beispiele der Anwendung der DNA-SELEX-Technik zeigen, daß die *in vitro*-Selektion von DNA-Oligonukleotiden eine wichtige Methode zur Untersuchung von Protein-DNA-Interaktionen darstellt.

1.5. Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, die Wechselwirkung des plasmidkodierten Transkriptionsrepressors CopR mit der Operator-DNA näher zu charakterisieren. CopR ist das am besten untersuchte Cop-Protein der *inc18*-Plasmidfamilie. Eine intensive Charakterisierung wurde bisher nur für das vom Plasmid pLS1 kodierte CopG-Protein vorgenommen. Zur Identifizierung von DNA-Basen innerhalb der CopR-Bindungsregion, die für eine effiziente Bindung von CopR essentiell sind, sollten verschiedene *in vitro*-Selektionen des CopR-Operators durchgeführt werden. Dazu wurde die SELEX-Methode angewandt. Auf der Basis der so erhaltenen Daten sollte durch Gelretardierungsexperimente mit mutierten Operatorsequenzen die relative Bedeutung der einzelnen Basenpaare für die Komplexstabilität ermittelt werden. Eine weitere Aufgabe bestand darin, erste Daten zu sammeln, die zur Aufklärung des Repressionsmechanismus des Transkriptionsrepressors CopR führen. Bisher liegen keine Daten zur Aufklärung des Repressionsmechanismus eines an der Regulation der Plasmidkopiezahl beteiligten Cop-Proteins vor. Da es bis jetzt wenige Kenntnisse über Protein-Protein-Interaktionen zwischen RNA-Polymerase und Transkriptionsrepressoren gibt, sollte außerdem durch Glutardialdehyd-crosslinking-Experimente die Wechselwirkung zwischen CopR und der RNA-Polymerase untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Präparation der 5'-markierten doppelsträngigen DNA-Fragmente

In der Tab. 1 sind die Oligonukleotide dargestellt, die in den Gelretardierungsexperimenten verwendet wurden. Je 40 pmol der Oligonukleotide wurden mit 20 μCi [γ - ^{32}P]-ATP (Hartmann-Analytik) und 1 μl Polynukleotidkinase (10 Units/ μl , New England Biolabs) in 1x Reaktionspuffer (New England Biolabs) und einem Volumen von 10 μl für 10 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 10 μl Formamid-Ladepuffer (98% Formamid, 10 mM EDTA, 0.2 % Bromphenolblau) und 5 min Erhitzen bei 75 °C wurden die markierten Oligonukleotide auf einem 6 %igen Sequenzierungsgel (Acrylamid:Bisacrylamid 19:1, 7 M Harnstoff, 1x TBE-Puffer) aufgetragen. Nach erfolgter Elektrophorese (1400 V) wurde ein Röntgenfilm für 5 min auf das mit Fluoreszenzmarkern (Stratagene) versehende Gel gelegt. Diese Marker ermöglichten es, die genaue Position der markierten Oligonukleotide im Gel zu bestimmen, so daß die entsprechenden Gelstücke mit einem Skalpell herausgeschnitten werden konnten. Die einzelsträngigen DNA-Fragmente wurden mit 400 μl Elutionspuffer (1 mM EDTA (pH 8.0), 500 mM NaAc, 10 mM MgAc, 0.1 % SDS) je 1 h bei 50 °C unter Schütteln eluiert und anschließend mit Ethanol präzipitiert. Sie wurden in je 50 μl H₂O gelöst.

In einem darauffolgenden Reaktionsansatz, der 50 μl markiertes Oligonucleotid, 40 pmol Primer SB176 (5'-CCCCTTAAAAAATAAGC-3'), bzw. Primer SB415 (5'-TCGCTGAACATTCGATCTA-3') (zum Auffüllen von SB414, SB417, SB418), 10 μl 10x HS-Puffer (500 mM Tris, 1 M NaCl, 100 mM MgCl, 10 mM DTT), 6 μl dNTP's (2 mM) und 3 μl Klenow (3 Units/ μl , Boeringer) enthielt, wurden die einzelsträngigen DNA-Fragmente in einem Gesamtvolumen von 100 μl (H₂O ad 100 μl) zu DNA-Doppelsträngen aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 30 min. Anschließend wurde eine Phenol-/Chloroform-Extraktion, gefolgt von einer Ethanol-Präzipitation durchgeführt. Die Menge an inkorporierter Radioaktivität wurde durch Messung der 'counts' in einem Szintillator (Beckman) ermittelt. Um Einzelstrangbrüche zu vermeiden, wurden die in H₂O gelösten DNA-Fragmente bei 4 °C aufbewahrt.

KS1	5' -GGGGAAAAGCAATGATTT CGTGT GAATAAT GCACG AAATCATTGCTTATTTTTTTAAGGGG-3'
KS9	5' -GGGGAAAAGCAATGATTT CGTGC GAATAAT GCACG AAATCATTGCTTATTTTTTTAAGGGG-3'
KS3	5' -GGGGAAAAGCAATGATTT CGTGT GAATAAT ACACG AAATCATTGCTTATTTTTTTAAGGGG-3'
SB174	5' -GGGGAAAAGCAATGATTT CGTGT <u>TA</u> ATAAT GCACG AAATCATTGCTTATTTTTTTAAGGGG-3'
SB175	5' -GGGGAAAAGCAATGATTT CGTGT <u>GAA</u> AAAT GCACG AAATCATTGCTTATTTTTTTAAGGGG-3'
SB180	5' -GGGGAAAAGCAATGATTT TGTGT GAATAAT GCACG AAATCATTGCTTATTTTTTTAAGGGG-3'
SB183	5' -GGGGAAAAGCAATGATTT CGTGT <u>AAAAAA</u> GCACG AAATCATTGCTTATTTTTTTAAGGGG-3'
Sb184	5' -GGGGAAAAGCAATGATTT CGTGT <u>TTTTTT</u> GCACG AAATCATTGCTTATTTTTTTAAGGGG-3'
SB187	5' -GGGGAAAAGCAATGATTT CGTGT <u>GGGGGG</u> GCACG AAATCATTGCTTATTTTTTTAAGGGG-3'
SB188	5' -GGGGAAAAGCAATGATTT CGTGT <u>GAA</u> _AAT GCACG AAATCATTGCTTATTTTTTTAAGGGG-3'
SB189	5' -GGGGAAAAGCAATGATTT CGTGT <u>GAAT</u> TAAT GCACG AAATCATTGCTTATTTTTTTAAGGGG-3'
SB190	5' -GGGGAAAAGCAATGATTT CGTGT <u>CCCCCC</u> GCACG AAATCATTGCTTATTTTTTTAAGGGG-3'
SB198	5' -GGGGAAAAGCAATGATTT CGCGT GAATAAT GCACG AAATCATTGCTTATTTTTTTAAGGGG-3'
SB199	5' -GGGGAAAAGCAATGATTT CGTAT GAATAAT GCACG AAATCATTGCTTATTTTTTTAAGGGG-3'
SB414	5' -TAGCTTAGGCAGTCACATGAAAC TGTGC ATGTATT GGACG AATTAGATCGAATGTTAGCGA-3'
SB417	5' -TAGCTTAGGCAGTCACATGAAAC TGTGC ATGTATT GCACG AATTAGATCGAATGTTAGCGA-3'
SB418	5' -TAGCTTAGGCAGTCACATGAAAC CGTGC ATGTATT GGACG AATTAGATCGAATGTTAGCGA-3'

Tab. 1: Liste der in den Gelretardierungsexperimenten verwendeten Oligonukleotide. Die Bindungsorte I und II sind fettgedruckt dargestellt, mutierte Nukleotide unterstrichen. Lediglich der jeweils obere Strang der doppelsträngigen DNA-Fragmente ist dargestellt.

2.2. Reinigung von His₆-CopR

CopR wurde aus dem *E.coli* Stamm M15 [Rep4](pQEC1) (Steinmetzer & Brantl, 1997; Steinmetzer *et al.*, 1998) isoliert. Das Protein trägt am N-Terminus die zusätzliche Sequenz Arg-Gly-Ser-(His₆)-Gly-Ser. Die Reinigung von CopR erfolgte durch Affinitätschromatographie an einer Nickel-NT-Agarose-Säule (Quiagen).

Der Stamm wurde in 600 ml TY-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin angezogen. Die Induktion der Expression erfolgte bei OD₅₆₀ ~0.9 durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM). Die Zellen wurden für weitere 2.5 h kultiviert, anschließend durch Zentrifugation (8000 rpm, 10 min, 4 °C) pelletiert und bei –20 °C über Nacht gelagert, um die Effektivität des Zellaufschlusses zu erhöhen. Die Zellpellets wurden am nächsten Tag in insgesamt 60 ml Lysispuffer (50 mM Na-Phosphat-Puffer pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM PMSF) resuspendiert und durch Ultraschall aufgeschloßen. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 10 min, 4 °C) wurde der Rohextrakt auf die in Lysispuffer equilibrierte Nickel-NT-Agarose-Säule (2 ml Volumen) gegeben. Die Säule wurde mit 8 ml Waschpuffer (50 mM Na-Phosphat-Puffer pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte in 1 ml-Fractionen mit Elutionspuffer (50 mM Na-Phosphat-Puffer pH 8.0, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol). Die einzelnen Fractionen wurden auf einem 17.5 % igen SDS-Polyacrylamid-Gel analysiert. Die Bestimmung der Konzentration des His₆-CopR erfolgte durch einen Bradford-Assay (Bradford, 1976).

2.3. Gelretardierungsexperimente

In einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden 0.9 nM der 5'-markierten DNA-Fragmente mit 3 – 800 nM His₆-CopR, Heringssperma-DNA (Endkonzentration 0.025 g/l) und 1 µl Ladepuffer (0.25 % Bromphenolblau, 0.25 % Xylencyanol, 30 % Glycerin) in 0.5 x TBE-Puffer (pH 8.0) für 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Trennung von gebundenen und ungebundenen DNA-Fragmenten erfolgte in 8 % igen nativen Polyacrylamid-Gelen durch Elektrophorese (1.5 h, 16 V/cm) in 0.5 x TBE-Puffer. Visualisierung und Quantifizierung der Banden erfolgte am Fuji-PhosphorImager, die Auswertung der Daten mit dem Programm PCBAS 2.0.

2.4. *In vitro*-Selektion – SELEX

Folgende Oligonukleotide wurden für die Konstruktion doppelsträngiger DNA-Fragmente für SELEX I-IV verwendet.

SB206 (I): 5'-ACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCGATGGAATTCAAGC
TTAATGATTTCGTGT-(N₇)-GCACGAAATCATGGATCCATGCATCA
C TGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTG-3'

SB265 (II): 5'-ACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCGATGGAATTCAAGC
TTAATGATTT-(N₁₇)-AAATCATGGATCCATGCATCACTGGCCGTC
GTTTTACAACGTCGTGACTG-3'

SB369 (III): 5'-TACGGTAACTGGACTGCATAACGATGCATTTGACTCATTCAAGC
TTCATCCATA-(N₃₀)-TAGTCGTGGATCCTTGACATGACAGGTATG
TAGTCATAAGCACTTAGCAA-3'

SB330 (IV): 5'-ACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCGATGGAATTCAAG
CTTAAT-(N₅)-CGTGTGAATAATGCACG-(N₅)-ATGGATCCATGCAT
CACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTG-3'

In einem 100 µl-Reaktionsansatz, der 8 – 333 pmol dieser Oligonukleotide, äquimolare Mengen des Primers SB179 (5'-GATGCATGGATCCATGAT-3') bzw. SB370 (5'-ATGTCAAG GATCCACGAC-3') im Falle von SB330 (SELEX IV), 10 µl 10x HS-Puffer (500 mM Tris, 1 M NaCl, 100 mM MgCl, 10 mM DTT), 6 µl dNTP's (2 mM) und 3 µl Klenow (3 Units/µl, Boeringer) enthielt, wurden bei Raumtemperatur und einer Inkubationszeit von 30 min doppelsträngige DNA-Fragmente erzeugt.

Nach anschließender Phenol-/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung wurden die DNA-Fragmente durch PCR mit den Primern SB223 (5'-CAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGATGCATGGATCCATGAT-3') und SB224 (5'-ACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCGATGGAATTCAAGCTTAATG-3') im Fall von SELEX I, II und IV bzw. mit den Primern SB371 (5'-TACGGTAACTGGACTGCATAACGATGCATTTGACTCATTCAAGCTTCATC-3') und SB372 (5'-TTGCTAAGTGCTTATGACTACATACCTGTCATGTCAAGGATCCACGAC-3') im Falle der SELEX III amplifiziert. Hierzu wurde ein PCR-Kit (Roche) verwendet (30 PCR-Zyklen je 30 sec 95 °C, 37 °C, 72 °C). Durch die PCR-Amplifikation wurden längere DNA-Fragmente (121 bp bei SELEX I, II und IV bzw. 134 bp bei SELEX III) erzeugt, da durch Hybridisierung der verwendeten Primer mit den zu amplifizierenden DNA-Fragmenten Überhänge entstanden.

Die PCR-Amplifikate wurden Phenol-/Chloroform-extrahiert und mit Ethanol gefällt. Anschließend wurden sie mit 10 μCi [γ - ^{32}P]-ATP (Hartman-Analytik) (siehe 2.1.) markiert und aus einem 8 % igen Polyacrylamid-Gel gereinigt. Die radioaktiv markierten DNA-Fragmente wurden durch einen Fuji-Phosphorimager detektiert, die entsprechenden Gelstücke aus dem Gel geschnitten. Die Elution der DNA erfolgte zweimalig für je 1 h bei 50 °C unter Schütteln in insgesamt 500 μl Elutionspuffer (1 mM EDTA (pH 8.0), 500 mM NaAc, 10 mM MgAc, 0.1 % SDS). Nach anschließender Ethanol-Fällung wurden die markierten DNA-Fragmente in H_2O gelöst.

Die Bindung von His₆-CopR und den DNA-Fragmenten erfolgte in einer Reaktion mit 20 μl Volumen in 0.5 x TBE für 30 min bei 30 °C, wobei jeweils 84 nM His₆-CopR eingesetzt wurden. Gebundene DNA-Fragmente wurden in einem 8 % igen Polyacrylamid-Gel durch Elektrophorese (230 V, 2 h) von ungebundenen getrennt. In jeder Selektionsrunde wurden als Referenz DNA-Fragmente verwendet, die die Sequenz des Wildtyp-CopR-Operators und gleiche Länge wie die jeweiligen SELEX-DNA-Fragmente (121 bp bei SELEX I, II und IV bzw. 134 bp bei SELEX III) aufwiesen. Dadurch war es möglich, die selektierten DNA-Fragmente nach der ersten Selektionsrunde von SELEX II und III aus dem Gel zu eliminieren, obwohl diese durch Phosphorimaging nicht detektiert werden konnten. Nach der dritten Selektionsrunde von SELEX I-IV wurde 0.6 μM eines 61 bp-langen DNA-Fragmentes (KS1, siehe Tab. 1), das die Wildtyp-CopR-Operatorsequenz, aber keine Bindungsstelle für die PCR-Amplifikations-Primer enthielt, im Bindungsreaktionsansatz eingesetzt. Damit wurde der Selektionsdruck unter den DNA-Fragmenten erhöht. Die Elution der selektierten DNA-Fragmente erfolgte wie oben beschrieben. Um die DNA von His₆-CopR zu trennen, wurde eine Phenol-/Chloroform-Extraktion, gefolgt von Ethanol-Fällung durchgeführt.

Die selektierten DNA-Liganden wurden durch PCR (PCR-Kit, Roche) amplifiziert. Hierfür wurden die Oligonukleotide SB225 (5'-CAGTCACGACGTTGTAAA-3') und SB226 (5'-ACAGGAAACAGCTATGAC-3') für die Amplifikation der SELEX I-, SELEX II- und SELEX IV-Produkte sowie SB372 (5'-TACGGTAACTGGACTGCA-3') und SB374 (5'-TTGCTAAGTGCTTATGAC-3') für SELEX III-Produkte verwendet. 20 Zyklen der PCR-Amplifikation wurden bei je 30 sec 95 °C, 52 °C und 72 °C durchgeführt. Die Amplifikate wurden Phenol-/Chloroform-extrahiert und anschließend mit Ethanol präzipitiert. Danach wurden sie wie oben beschrieben radioaktiv markiert. Insgesamt wurden für die SELEX I-IV 10 Selektionsrunden durchgeführt.

Nach der 10. SELEX-Runde wurden die PCR-Amplifikate mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III (Boeringer, je 2.5 µl) in 1 x HS-Puffer (500 mM Tris, 1 M NaCl, 100 mM MgCl, 10 mM DTT) 2 h bei 37 °C gespalten. Die Produkte wurden wie oben beschrieben aus einem 8 %igen, nativen Polyacrylamid-Gel gereinigt, wobei sie mit Ethidiumbromid im Gel angefärbt wurden. Die gespaltenen SELEX-Produkte wurden in einen pUC19-*Bam*HI/*Hind*III-Vektor (Präparation Dr. S. Brantl) ligiert (Sambrook *et al.*, 1989). Nach der Transformation des *E. coli* Stammes TG1 wurden einzelne, weiße Klone nach der Didesoxy-Sequenzier-Reaktion (Sanger *et al.*, 1977) mit einem Sequenase-Kit (Amersham Bioscience) sequenziert.

2.5. *In vitro*-Transkription

Die 320 bp-langen linearen DNA-Fragmente für die *in vitro*-Transkription wurden durch PCR-Amplifikation (PCR-Kit, Boeringer) der Plasmide pUC333, pUC334, pUC294, pUC292, pUC221, pUC228 (Freede & Brantl, 2004) mit dem Primer SB214 (5'-GAATTCCTGCAGCTACGATCAAAGTTGAAT-3') und einem universalen Sequenzierungsprimer erzeugt. Die PCR-Fragmente wurden anschließend aus einem 3 % Agarosegel isoliert (DNA-Isolations-Kit, Biozym) und in H₂O gelöst.

In einem 20 µl-Reaktionsansatz, der 60 mM TrisHCl pH 7.8, 12 mM MgCl, 1 mM DTT enthielt, wurden 0.5 nM lineare DNA-Fragmente mit je 200 µM ATP, GTP, CTP, 20 µM UTP, 5 µCi [α -³²P]-UTP (Hartmann-Analytik) und 1 µM nativem CopR (Freede & Brantl, 2004) gemischt. Nach Inkubation bei 30 °C für 15 min wurde die Transkription durch Zugabe von 30 nM *B. subtilis* RNA-Polymerase (M. Salas, Madrid) initiiert. Durch Phenol-/Chloroform-Extraktion wurde die Reaktion nach 30 minütiger Inkubationszeit gestoppt. Die Produkte wurden durch Ethanol präzipitiert und in H₂O gelöst, anschließend mit 50 % Ladepuffer (98% Formamid, 10 mM EDTA, 0.2 % Bromphenolblau) versetzt und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Die Auftrennung erfolgte in einem 6 % Sequenzierungsgel, das nach der Elektrophorese (1400 V) getrocknet wurde. Die Quantifizierung der Bandenintensitäten erfolgte mit dem Programm PCBAS 2.0.

2.6. Überexpression und Reinigung der *B. subtilis* α -RNAP-Varianten

Verschiedene Varianten der α -Untereinheiten der *B. subtilis*-RNA-Polymerase wurden in *E. coli* überexprimiert und durch Affinitätschromatographie gereinigt.

Für die Konstruktion der entsprechenden Plasmide wurde chromosomale *B. subtilis* DNA (Präparation Dr. A. Chinali) mit folgenden Primern durch PCR amplifiziert (PCR-Kit, Boeringer, 25 Zyklen a 30 sec 95 °C, 30 sec 52 °C und 50 sec 72 °C).

α -RNAP	SB678 (5'-GAATTCCCATGGTCGAGATTGAAAAACCAA-3') SB679 (5'-CTGCAGAGATCTTTATTAGTGATGGTGATGGTGA TGATCGTCTTTGCGAAGTCC-3')
α NTD-RNAP	SB678 (5'-GAATTCCCATGGTCGAGATTGAAAAACCAA-3') SB738 (5'-CTGCAGAGATCTTTATTAGTGATGGTGATGGTGA TGAGTTAAACCAACGAATATTAAGGTGTTTCAGTTAAA ATC-3')
α CTD-RNAP	SB679 (5'-CTGCAGAGATCTTTATTAGTGATGGTGATGGTGA TGATCGTCTTTGCGAAGTCC-3') SB739 (5'-GAATTCCCATGGAAAAAGAAGAAGATCAAAAA GAG-3')
Δ 15- α CTD-RNAP	SB772 (5'-CTGCAGAGATCTTTATTAGTGATGGTGATGGTGA TGCACTTCTTCAAGTGATTTGCGTCCTAGA-3') SB739 (5'-GAATTCCCATGGAAAAAGAAGAAGATCAAAAA GAG-3')
Δ 7- α CTD-RNAP	SB739 (5'-GAATTCCCATGGAAAAAGAAGAAGATCAAAAA GAG-3') SB790 (5'-CTGCAGAGATCTTTATTAGTGATGGTGATGGTGA TGTCCAAGTTCTTCTAGTTTCGCTTTCACT-3')
Δ 3- α CTD-RNAP	SB739 (5'-GAATTCCCATGGAAAAAGAAGAAGATCAAAAA GAG-3') SB789 (5'-CTGCAGAGATCTTTATTAGTGATGGTGATGGTGA TGGCGAAGTCCGAGTCCAAGTTCTTCTAGT-3')

Durch die PCR-Amplifikation wurden jeweils 6 Histidin-Codons an das 3'-Ende der jeweiligen Gene gefügt, so daß eine Reinigung der Proteine an Nickel-NT-Agarose-Säulen ermöglicht wurde.

Die PCR-Fragmente wurden aus einem 1 % Agarose-Gel isoliert (DNA-Isolations-Kit, Biozym) und in H₂O gelöst. Daraufhin wurden die Fragmente mit *NcoI* (Jena Bioscience) in 1 x *NcoI*-Puffer (Jena Bioscience) und 0.1 g/l BSA (Jena Bioscience) bei 37 °C für 1.5 h gespalten. Es erfolgte eine Phenol-/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung. Dann wurden die DNA-Fragmente mit dem Restriktionsenzym *BglIII* (Jena Bioscience) in 1 x HS-Puffer für 1.5 h bei 37 °C gespalten. Wiederum wurde eine Phenol-/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Nach Ethanol-Präzipitation wurde die gespaltene DNA in einen pQE 60-*NcoI*-/*BglIII*-Vektor (Präparation S.Brantl) (pQE-60, Qiagen) ligiert. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur über 2 h.

Nach der Transformation des *E. coli* Stammes TG1 [Rep4] wurden einzelne Klone nach der Dideoxy-Sequenzier-Reaktion (Sanger *et al.*, 1977) mit einem Sequenase-Kit (Amersham Bioscience) sequenziert, um die Gensequenzen zu überprüfen.

Die Stämme TG1 [Rep4] (pQE-60) wurden in je 600 ml TY-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin angezogen. Die Induktion der Expression erfolgte bei OD₅₆₀ ~0.9 durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM). Die Zellen wurden für weitere 2.5 h kultiviert, anschließend durch Zentrifugation (8000 rpm, 10 min, 4 °C) pelletiert und bei -20 °C über Nacht gelagert, um die Effektivität des Zellaufschlusses zu erhöhen. Die Zellpellets wurden am nächsten Tag in insgesamt 30 ml Lysispuffer (50 mM Na-Phosphat-Puffer pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM PMSF, 2 mM β-Mercaptoethanol) resuspendiert und durch Ultraschall aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 10 min, 4 °C) wurde der Rohextrakt auf die in Lysispuffer equilibrierte Nickel-NT-Agarose-Säule (Qiagen, 2 ml Volumen) gegeben. Die Säule wurde mit 8 ml Waschpuffer (50 mM Na-Phosphat-Puffer pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte in 1 ml-Fractionen mit Elutionspuffer (50 mM Na-Phosphat-Puffer pH 8.0, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol).

Die Fraktionen wurden auf einem 17.5 % igen SDS-Polyacrylamid-Gel durch Anfärben mit Coomassie analysiert. Die Bestimmung der Konzentration der einzelnen Proteine erfolgte durch einen Bradford-Assay (Bradford, 1976).

2.7. Präparation des DNA-Fragmentes für die Footprinting-Experimente

Das in den DNase I- und den KMnO₄-Footprinting-Versuchen verwendete lineare 235 bp-lange DNA-Fragment [pPRI-SB6*/SB466], das den Wildtyp-CopR-Operator trägt, wurde

wie folgt konstruiert: 800 pmol des Oligonukleotids SB6 (5'-GTTTCTGGTTCTGGTTCTGTT-3') wurden mit 50 μCi [γ - ^{32}P]-ATP markiert und aus einem 6 % Sequenzierungsgel isoliert (siehe 2.1.). Das markierte Oligonukleotid wurde in 4 μl H_2O gelöst. 40 ng des Plasmides pPR1 (Brantl & Behnke, 1992) wurden mit 400 pmol markiertem SB6 und 400 pmol SB466 (5'-CTAATGGTGGTTAGTTAATT-3') durch PCR (PCR-Kit, Roche) (30 Zyklen a 30 sec 95 °C, 52 °C, 45 sec 72 °C) amplifiziert. Dann wurde das PCR-Amplifikat aus einem 5 % Polyacrylamid-Gel gereinigt (siehe 2.4.). Die inkorporierte Radioaktivität wurde in einem Beckman-Scintillator vermessen.

Das Plasmid pPR1 (Derivat von pIP501) wurde mit dem Oligodesoxyribonukleotid SB6 (5'-GTTTCTGGTTCTGGTTCTGTT-3') nach der Didesoxymethode mit einem Sequenase-Kit (Amersham Bioscience) sequenziert. Aliquote der Sequenzierungsreaktionen wurden 5 min bei 75 °C erhitzt und als Längenmarker für die Footprinting-Experimente verwendet.

2.8. DNase I – Footprinting

In einem 20 μl -Reaktionsansatz, der 0.5 x TBE-Puffer, Heringssperma-DNA (Endkonzentration 0.025 g/l) und 6.25 mM MgCl_2 enthält, wurden jeweils 100 nM des 235 bp-langen, radioaktiv markierten DNA-Fragmentes [pPRI-SB6*/SB466] mit 4.4 μM His₆-CopR und 90 nM *B. subtilis* RNA-Polymerase bzw. 10.6 μM α -CTD-RNAP mit 4.4 μM , 8.8 μM und 17.6 μM His₆-CopR gemischt. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 30 °C. DNase I (Roche, 10 Units/ μl) wurde 1:200 in H_2O verdünnt. 1 μl (0.05 Units) dieser frisch bereiteten DNase I-Verdünnung wurde mit dem Reaktionsansatz gemischt. Die Spaltung der DNA erfolgte für 2 min bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch Phenol-/Chloroform-Extraktion gestoppt. Die DNA wurde mit Ethanol gefällt, mit 80 % Ethanol gewaschen und anschließend in 2 μl H_2O und 2 μl Formamid-Ladepuffer gelöst. Nach Denaturierung der Proben bei 75 °C (5 min) wurden sie auf ein 6 % Sequenzierungsgel aufgetragen. pPR1 wurde mit dem Primer SB6 nach der Didesoxy-Sequenzier-Reaktion (Sequenzierungs-Kit, Amersham Bioscience) sequenziert und als Längenmarker [pPRI-SB6] verwendet. Nach Elektrophorese (1400 V) wurde das Gel auf einem Geltdrockner getrocknet und in einem Fuji-Phosphorimager ausgewertet.

2.9. KMnO_4 – Footprinting

Die Durchführung der *in vitro* KMnO_4 – Footprinting-Experimente folgte prinzipiell der Methode von Sasse-Dwight & Gralla (1989). In einem 20 μl -Reaktionsansatz wurden 100 nM des radioaktiv markierten DNA-Fragmentes [pPRI-SB6*/SB466] (siehe 2.7.) mit 0.5 x TBE, Heringssperma-DNA (Endkonzentraion 0.025 g/l), 6.25 mM MgCl_2 und 2.2 und 4.4 μM His₆-CopR gemischt. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 90 nM *B. subtilis* RNA-Polymerase (M. Salas, Madrid). Die Inkubation erfolgte 30 min bei 30 °C. Einzelsträngige DNA wurde anschließend mit 2.5 μl 80 mM KMnO_4 (Carl-Roth GmbH, frisch hergestellt aus einer 0.37 M Stammlösung) für 2 min bei 37 °C modifiziert. Die Reaktion wurde durch 2 μl 12.8 M β -Mercaptoethanol gestoppt. Die DNA wurde mit Ethanol präzipitiert, dann mit 80 % Ethanol gewaschen und in 10 % Piperidin (Carl-Roth GmbH) aufgenommen. Die alkalische Spaltung der modifizierten, einzelsträngigen DNA erfolgte 30 min bei 95 °C. Die Produkte wurden durch Ethanol gefällt, mit 80 % Ethanol gewaschen und in 2 μl H_2O und 2 μl Formamid-Ladepuffer gelöst. Sie wurden in einem 6 % Sequenzierungsgel nach Denaturierung bei 75 °C aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und die Banden in einem Fuji-Phosphorimager sichtbar gemacht.

2.10. Glutardialdehyd – Crosslinking

Die Glutaraldehyd-Crosslinking-Experimente erfolgten in einem Gesamtvolumen von 20 μl . 8.6 μM His₆-CopR wurden mit 8.0 μM α -NTD-, 8.7 μM α -CTD-, 8.2 μM $\Delta 15$ - α CTD-, 7.3 μM $\Delta 7$ - α CTD- bzw. 7.9 μM $\Delta 3$ - α CTD-RNA-Polymerase in 10 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.6) miteinander gemischt. 8.7 μM α CTD-RNA-Polymerase wurden mit 9.1 μM His₆-CopR- $\Delta 27$, 8.4 μM His₆-CopR-Dim5 bzw. 8.8 μM His₆-CopR-R34Q gemischt. Die Proteine wurden anschließend mit 2 μl einer 1:50 Glutardialdehyd-Lösung (Verdünnung in Wasser, aus einer 25 % Glutardialdehyd-Lösung hergestellt, Carl-Roth GmbH) (Endkonzentration 0.05 %) 30 min bei 30 °C inkubiert.

Die Proben wurden daraufhin mit 5 μl SDS-Ladepuffer (2 mM TrisHCl pH 8.0, 2.5 % SDS, 100 mM DTT, 10 % Glycerin, 0.25 % Bromphenolblau) für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Protein-Elektrophorese erfolgte in 17.5 % igen SDS-Polyacrylamidgelen (Mini PROTEAN[®] II Electrophoresis Cell, BIORAD) 45 min bei 50 mA. Die

Proteinkomplexe wurden daraufhin durch Western-Blotting auf PVDF-Membranen transferiert.

2.11. Westernblot

Die Proteingele wurden 20 min in Transfer-Puffer (5.8 g Tris, 2.9 g Glycin, 0.37 g SDS, 200 ml Methanol, H₂O ad 1 l) equilibriert. Eine PVDF-Membran (Dupont) wurde für 2 min in Ethanol geschwenkt, anschließend gründlich mit H₂O gespült und ebenfalls in Transfer-Puffer equilibriert. Der Protein-Transfer erfolgte in einer 'semidry'-Apparatur bei 12 V für 50 min. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch 1 h Inkubation der Membran mit PBSTG (1 x PBS (8.0 g NaCl, 0.504 g KOH, 1.56 g NaH₂PO₄, H₂O ad 1 l), 0.5 % Tween, 0.5 % Gelatine) blockiert. Anschließend wurde die PVDF-Membran mit dem 1:1000 in PBSTG verdünnten Antiserum (polyklonales Antiserum aus Kaninchen gegen eine 15 Aminosäure-lange Teilsequenz von CopR) 1 h unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Membran wurde zweimalig gespült, dann 3 x mit PBST (1 x PBS, 0.5 % Tween) je 10 min gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit einem Antiserum (Peroxidase-Konjugat, polyklonales Antiserum anti-rabbit, Santa-Cruz), das 1:000 in PBSTG verdünnt wurde, 1 h unter Schwenken inkubiert. Die Membran wurde mit PBST gespült und dreimalig je 10 min gewaschen. Das Peroxidase-Konjugat wurde durch 2 min Inkubation mit einer 3'3'-Diaminobenzidin-Lösung (1 ml TrisHCl pH 8.0, 10 µl 37 % H₂O₂, 40 mg 3'3'-Diaminobenzidin, H₂O ad 20 ml) sichtbar gemacht. Durch Spülen der Membran mit H₂O wurde die Reaktion gestoppt.

3. Ergebnisse

3.1. *In vitro*-Selektion von CopR-Operatorsequenzen durch SELEX

Mit Hilfe des SELEX-Verfahrens ist es möglich, aus einer Bibliothek von Oligonukleotiden diejenigen anzureichern, die eine hohe Affinität zu einem vorgegebenen Liganden haben. In dieser Arbeit wurde die SELEX-Technik angewandt, um die für die effiziente Bindung von CopR an die Operator-DNA essentiellen Nukleotide innerhalb der CopR-Bindungsregion zu bestimmen. Dazu wurden in vier unterschiedlichen SELEX-Experimenten (SELEX I-IV) Oligodesoxyribonukleotide aus einer Bibliothek von DNA-Oligonukleotiden, die randomisierte CopR-Operatorsequenzen unterschiedlicher Länge aufwiesen, angereichert. Durch die schrittweise Selektion und Amplifikation der DNA-Oligonukleotide wurde eine exponentielle Anreicherung CopR-bindender DNA-Liganden erzielt. Zu Beginn eines jeden SELEX-Experimentes wurden die partiell randomisierten DNA-Oligonukleotide durch PCR amplifiziert, radioaktiv markiert und aus einem nativen Polyacrylamidgel isoliert. Nach der Bindung von CopR an affine DNA-Oligonukleotide erfolgte die Trennung der gebundenen und ungebundenen DNA-Spezies durch native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Abb. 9). In jedem SELEX-Experiment wurden in der 4. Selektionsrunde $0.6 \mu\text{M}$ eines unmarkierten Wildtyp-Operator-DNA-Fragmentes (KS1, siehe Tab. 1, durch Klenow-Reaktion zum Doppelstrang aufgefüllt) zum Bindungsansatz gegeben, um DNA-Oligonukleotide mit möglichst hoher CopR-Bindungsaffinität zu selektieren. Das unmarkierte Wildtyp-Operator-DNA-Fragment enthielt keine Bindungsstellen für die PCR-Primer. So konnte sichergestellt werden, daß dieses DNA-Fragment durch die anschließende PCR nicht amplifiziert wurde. Vor der Amplifikation der selektierten Oligodesoxyribonukleotide wurde CopR durch Phenol-Extraktion von der gebundenen DNA getrennt. Auf diese Weise erfolgten jeweils insgesamt zehn SELEX-Zyklen. Nach den 10. Selektionsrunden der SELEX I-IV wurden die selektierten DNA-Fragmente amplifiziert, mit *Bam*HI und *Hind*III gespalten und in einen pUC19-Vektor ligiert. Nach der Transformation des *E. coli* - Stammes TG1 wurde die DNA von individuellen Klonen sequenziert.

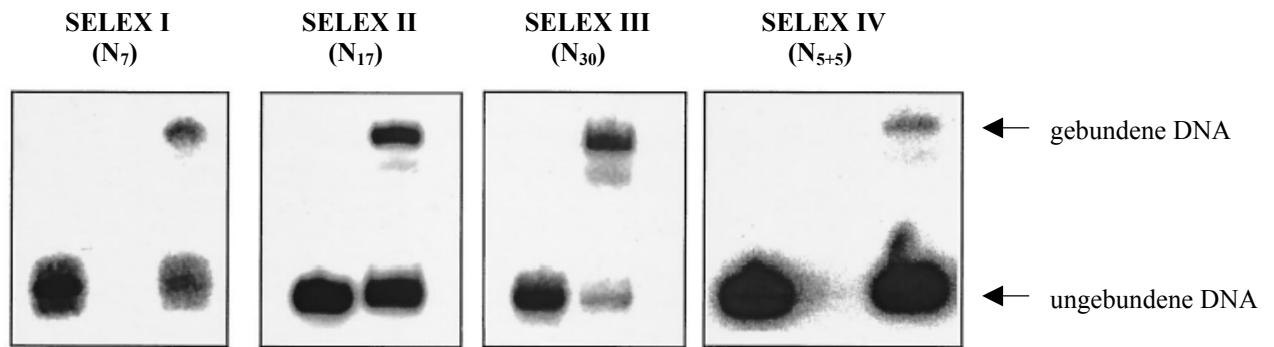


Abb. 9: *In vitro*-Selektion von Oligodesoxyribonukleotiden in vier unterschiedlichen SELEX-Experimenten. Das Autoradiogramm zeigt die EMSAs der 10. Runde von SELEX I-IV. Durch native Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die gebundenen DNA-Liganden von den ungebundenen DNA-Spezies getrennt.

Die *in vitro*-Selektion der SELEX I diente der Untersuchung der zwischen den beiden CopR-Bindungsstellen I und II befindlichen Nukleotide hinsichtlich der CopR-Bindungsaffinität. Die SELEX I wurde mit einem Gemisch aus 121 bp-langen Oligodesoxyribonukleotiden durchgeführt, die alle die beiden Wildtyp-CopR-Bindungsstellen I und II enthielten. Die Sequenz zwischen den beiden Bindungsstellen, der *spacer*, bestand aus 7 zufällig eingebauten Nukleotiden. In der SELEX I wurden anfänglich 8 pmol des Gemisches aus DNA-Oligonukleotiden eingesetzt. Das entspricht ca. 2.9×10^9 Kopien jeweils eines Oligonukleotides, das an einer der randomisierten Positionen je ein definiertes Nukleotid trägt.

Bereits in der ersten Runde der SELEX I waren die von CopR gebundenen DNA-Spezies im Polyacrylamidgel sichtbar. Nach der 10. Selektionsrunde wurden die Sequenzen von 28 Klonen sequenziert. Die Sequenzen sind in der Tab. 2 dargestellt. Abgesehen von zwei Sequenzen trugen alle Sequenzen ein Adenin oder aber ein Thymin an der Position 6 der *spacer*-Region zwischen den CopR-Bindungsstellen. In 26 Sequenzen wurde ein Thymin in Position 7 gefunden. Alle *spacer*-Sequenzen waren A-/T-reich, lediglich drei der selektierten DNA-Sequenzen wiesen mehr als zwei oder drei Guanin- bzw. Cytosin-Reste auf. Dieses Ergebnis zeigte, daß für eine effiziente Bindung von CopR eine Nukleotidabfolge zwischen den beiden Bindungsstellen I und II essentiell ist, die überwiegend aus Adeninen und Thyminen zusammengesetzt ist.

		I		II	
rs	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	- N7 -	GCACG	AAATCATGGATCC-3'
1	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	<i>TTCATAT</i>	GCACG	AAATCATGGATCC-3'
2	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	<i>GAAATTT</i>	GCACG	AAATCATGGATCC-3'
3	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	<i>GAAATTT</i>	GCACG	AAATCATGGATCC-3'
4	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	<i>GTACTAT</i>	GCACG	AAATCATGGATCC-3'
5	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	<i>TTAACTT</i>	GCACG	AAATCATGGATCC-3'
6	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	<i>CTACATT</i>	GCACG	AAATCATGGATCC-3'
7	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	<i>TCACCAT</i>	GCACG	AAATCATGGATCC-3'
8	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	<i>ACACCTT</i>	GCACG	AAATCATGGATCC-3'
9	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	<i>TTAACTT</i>	GCACG	AAATCATGGATCC-3'
10	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	<i>AAAGTAT</i>	GCACG	AAATCATGGATCC-3'
11	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	<i>TTAACTT</i>	GCACG	AAATCATGGATCC-3'
12	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	<i>TTAATAT</i>	GCACG	AAATCATGGATCC-3'
13	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	<i>GTCTTAT</i>	GCACG	AAATCATGGATCC-3'
14	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	<i>GTCTTAT</i>	GCACG	AAATCATGGATCC-3'
15	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	<i>TTAGTTT</i>	GCACG	AAATCATGGATCC-3'
16	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	<i>GTCTTAT</i>	GCACG	AAATCATGGATCC-3'
17	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	<i>ATGTCAG</i>	GCACG	AAATCATGGATCC-3'
18	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	<i>GCCTGTC</i>	GCACG	AAATCATGGATCC-3'
19	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	<i>TAATTGT</i>	GCACG	AAATCATGGATCC-3'
20	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	<i>TTTAGTT</i>	GCACG	AAATCATGGATCC-3'
21	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	<i>TTCTGTT</i>	GCACG	AAATCATGGATCC-3'
22	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	<i>TTATCTT</i>	GCACG	AAATCATGGATCC-3'
23	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	<i>TTATTAT</i>	GCACG	AAATCATGGATCC-3'
24	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	<i>TTATTAT</i>	GCACG	AAATCATGGATCC-3'
25	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	<i>TTATACT</i>	GCACG	AAATCATGGATCC-3'
26	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	<i>TTATTAT</i>	GCACG	AAATCATGGATCC-3'
27	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	<i>GTA ACTT</i>	GCACG	AAATCATGGATCC-3'
28	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	<i>AATCTTT</i>	GCACG	AAATCATGGATCC-3'
wt	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	<i>GAATAAT</i>	GCACG	AAATCATGGATCC-3'

Tab. 2: In SELEX I (N₇) selektierte Sequenzen. Die Nukleotidsequenz zwischen den CopR-Bindungsstellen I und II (fett gedruckt dargestellt), wurde randomisiert. rs:randomisierte Sequenz; wt:Wildtyp-Operatorsequenz

Um die Nukleotide innerhalb der beiden CopR-Bindungsstellen I und II zu identifizieren, die für die effiziente Bindung von CopR essentiell sind, wurde eine weitere *in vitro*-Selektion durchgeführt. Dazu wurden während der SELEX II aus einem Gemisch von

Oligodesoxyribonukleotiden, die eine 17 bp-lange randomisierte Teilsequenz beinhalteten, diejenigen selektiert, die mit hoher Affinität von CopR gebunden wurden.

Die SELEX II wurde mit 20 pmol einer 121 bp-langen randomisierten DNA-Molekülbibliothek gestartet, wodurch sich ca. 700 Kopien jeder möglichen Sequenz in dem Gemisch von Oligonukleotiden befanden. Bereits in der 3. Selektionsrunde konnten im EMSA die gebundenen DNA-Liganden durch Autoradiographie detektiert werden. Auf jedem Polyacrylamidgel wurde als Referenz ein 121 bp-langes DNA-Fragment mit Wildtyp-CopR-Operator aufgetragen, das mit CopR inkubiert wurde. Dadurch war es möglich, die gebundenen DNA-Fragmente der Selektionsrunden 1 und 2 aus dem Gel zu eliminieren, obwohl diese durch Phosphorimaging nicht detektiert werden konnten. Nach der 10. Selektionsrunde wurden die Sequenzen von insgesamt 24 Klonen sequenziert.

		I		II	
rs	5' -AAGCTTAATGATTT		- N17 -		AAATCATGGATCC-3'
1	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGC	TTCCCTAT	GCACG	AAATCATGGATCC-3' (17x)
2	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	TTCTGCT	GCACG	AAATCATGGACAG-3' (3x)
3	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	TTATCAT	GCACG	AAATCATGGATCC-3' (2x)
4	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	TTCCCTCT	GCACG	AAATCACTGATTC-3' (1x)
5	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	AAATTTT	GCACG	AAATCATGGATCC-3' (1x)
wt	5' -AAGCTTAATGATTT	CGTGT	GAATAAT	GCACG	AAATCATGGATCC-3'

Tab. 3: In SELEX II (N₁₇) selektierte Sequenzen. Die CopR-Bindungsstelle I und II und der zwischen ihnen befindliche *spacer* sind fett gedruckt dargestellt (randomisierter Sequenzbereich). Am rechten Rand sind in Klammern die Anzahl der gefundenen Klone mit der jeweiligen Sequenz aufgezeigt. rs:randomisierte Sequenz; wt:Wildtyp-Operatorsequenz

In der Tab. 3 sind die Sequenzen zusammengefaßt, die durch SELEX II angereichert wurden. Sieben von 24 Sequenzen wiesen die Wildtyp-Bindungsstelle I und II auf. 17 Klone (Sequenz 1 in Tab. 3) zeigten, daß T243 des Bindungsstellen I durch ein C ersetzt wurde. Durch diese Mutation wurden vollständig symmetrische Bindungsstellen hergestellt. Diese Operatorsequenz (KS9, siehe Tab. 1) wurde bereits früher in Gelretardierungsexperimenten analysiert, wobei festgestellt wurde, daß sie mit gleicher Affinität wie die Wildtyp-Operatorsequenz von CopR gebunden wird (Steinmetzer & Brantl, 1997). Die Nukleotidsequenz zwischen den CopR-Bindungsstellen aller 24 Sequenzen wurden überwiegend von Adeninen und Thyminen gebildet. Lediglich 2 der insgesamt 5 unterschiedlichen, angereicherten Sequenzen (Sequenzen 2 und 4) wiesen in

dieser Region 3 Cytosine bzw. Guanine auf. Alle Sequenzen beinhalteten ein T in Position 7 des *spacers*. In 19 Fällen wurde ein A in Position 6 gefunden. Dieses Ergebnis korreliert mit den Daten der SELEX I.

Die Ergebnisse der SELEX II lieferten keine Aussage über die Möglichkeit der Variabilität der Anzahl der Basenpaare zwischen den beiden Bindungsorten. Aus diesem Grund wurde eine weitere *in vitro*-Selektion durchgeführt. In der SELEX III wurden aus einer Bibliothek von 134 bp-langen Oligodesoxyribonukleotiden, die eine 30 bp-lange randomisierte Teilsequenz beinhalteten, diejenigen mit größter CopR-Bindungsaffinität selektiert. Das SELEX-Experiment wurde mit 333 pmol des Gemisches von Oligonukleotiden gestartet. Aufgrund der Länge des randomisierten Sequenzbereiches konnten die gebundenen DNA-Liganden erst in der 4. Selektionsrunde durch Autoradiographie detektiert werden. Die Sequenzen der 14 sequenzierten Klone sind in der Tab. 4 wiedergegeben.

Zwei der selektierten Sequenzen (Nr. 1 und 4) wiesen die partiell asymmetrische (Wildtyp-CopR-Operator, vom DNA-Gegenstrang in entsprechender 5'-3'-Richtung gelesen: Abb. 10), eine (Nr. 13 in Abb. 10) die symmetrische Wildtyp-Bindungsregion auf. Diese CopR-Bindungsstelle wurden ebenfalls durch die SELEX II angereichert. Die weiteren 11 Klone enthielten Bindungsregionen mit einem (Nr. 5), zwei (Nr. 2 und 3), drei (Nr. 6, 7, 8, 10, 11, 12, 14) oder sogar vier (Nr. 9) Nukleotidaustausche in den Bindungsorten I und II (Abb. 10). So wurde T243 im Bindungsort I durch ein C ersetzt, so daß symmetrische Bindungsstelle entstanden. Die anderen Austausche befanden sich im Konsensus-Bindungsmotiv 5'-CGTG. Im Bindungsort I wurde C239 durch ein T ersetzt. Im Bindungsort II wurde das C252 durch G ausgetauscht. In einer Sequenz (Nr. 9) fand sich zusätzlich das G255 durch ein A ersetzt. Interessanterweise wurde früher durch einzelne Nukleotidmutationen in den Bindungsorten gezeigt, daß Mutationen der vier Nukleotide des Konsensus-Bindungsmotiv (5'-CGTG) einen signifikanten Verlust der Bindungsaffinität von CopR bewirkten (Steinmetzer & Brantl, 1997).

Die Sequenzen zwischen den Bindungsorten ähnelten den durch SELEX I und SELEX II selektierten Sequenzen. Durch die SELEX III erfolgte ebenfalls die Selektion von A-/T-reichen *spacer*-Regionen, die bevorzugt ein A in Position 6 aufwiesen. Das Ergebnis der SELEX III zeigte, daß ausschließlich *spacer* mit einer Länge von 7 Basenpaaren angereichert wurden. CopR-Bindungsregionen mit 6 bp- oder 8 bp-langen *spacern* wurden nicht gefunden.

rs	5' -AAGCTTCATCCATA	- N30 -	TAGTCGTGGATCC-3'
1	5' -AAGCTTCATCCATA	CGTGCGTAGGAAACACGGGCCAGACCACAT	TAGTCGTGGATCC-3'
2	5' -AAGCTTCATCCATA	GAT CGTGCA TATTTAGCACACCTTTGCATT	TAGTCGTGGATCC-3'
3	5' -AAGCTTCATCCATA	TGT CGTGCA TATTTAGCACACCTTGACCGG	TAGTCGTGGATCC-3'
4	5' -AAGCTTCATCCATA	CAAT CGTGCGTAGGAAACACGGGCCAGACCC	TAGTCGTGGATCC-3'
5	5' -AAGCTTCATCCATA	GAT CGTGCA TATTTAGCACACCTTGGTCCG	TAGTCGTGGATCC-3'
6	5' -AAGCTTCATCCATA	TGCATGAAACT TGTGC ATGTATT GGACGA AT	TAGTCGTGGATCC-3'
7	5' -AAGCTTCATCCATA	AAGCTT TGTGC ATGTAT CGGACGA ATTGT	TAGTCGTGGATCC-3'
8	5' -AAGCTTCATCCATA	TGCATGAAACT TGTGC ATGTATT GGACGA AT	TAGTCGTGGATCC-3'
9	5' -AAGCTTCATCCATA	ATGAAACT TGTGC ATGTAT CGGACA ATTCAG	TAGTCGTGGATCC-3'
10	5' -AAGCTTCATCCATA	TGCATGAAACT TGTGC ATGTATT GGACG AGT	TAGTCGTGGATCC-3'
11	5' -AAGCTTCATCCATA	TGCATGAAACT TGTGC ATGTAT CGGACGA AT	TAGTCGTGGATCC-3'
12	5' -AAGCTTCATCCATA	TGCATGAAACT TGTGC ATGTAT CGGACG AGT	TAGTCGTGGATCC-3'
13	5' -AAGCTTCATCCATA	TTATCGGATGG CGTGC CTATCTT GCACGG T	TAGTCGTGGATCC-3'
14	5' -AAGCTTCATCCATA	TTCATGAAACT TGTGC ATGTAT AGGACGA AT	TAGTCGTGGATCC-3'
wt	5' -AAGCTTCATCCATA	TGATTT CGTGT GAATAAT GCACG AAATCAT	TAGTCGTGGATCC-3'

Tab. 4: In SELEX III (N₃₀) selektierte Sequenzen. Die Sequenzen der Bindungsorte I und II sind fett gedruckt dargestellt. Die kursiv dargestellten Sequenzen umfassen den randomisierten Bereich. rs:randomisierte Sequenz; wt:Wildtyp-Operatorsequenz

239 240 241 242 243		251 252 253 254 255	wt
C G T G T	G A A T A A T	G C A C G	Anzahl der Klone:
C G T G C		A C A C G	2 (Wildtyp)
C G T G <u>C</u>		G C A C G	1 (sym)
C G T G <u>C</u>		G C A C <u>A</u>	3
<u>T</u> G T G <u>C</u>		G <u>G</u> A C G	7
<u>T</u> G T G <u>C</u>		G <u>G</u> A C <u>A</u>	1
I		II	

Abb. 10: Vergleich der in SELEX III selektierten CopR-Bindungsorte mit den Wildtyp-Bindungsorten. Die sich vom Wildtyp unterscheidenden Nukleotidpositionen sind unterstrichen. wt:Wildtyp-Operatorsequenz; sym:symmetrische Operatorsequenz

Durch frühere Kompetitions-Gelretardierungsexperimente wurde gezeigt, daß DNA-Fragmente mit minimalem 17 bp-langen CopR-Operator ein DNA-Fragment, das zusätzlich die die Bindungsorte flankierenden Nukleotide enthält, nicht aus dem Komplex mit CopR verdrängen können (Steinmetzer et al., 2002). Aus diesem Grunde lag die Vermutung nah, daß CopR zusätzliche Kontakte zu Nukleotiden herstellt, die sich in unmittelbarer Nähe zu den beiden Bindungsorten befinden. In einem letzten SELEX IV-Experiment sollte die Frage geklärt werden, ob die Basenpaare, die die beiden CopR-Bindungsorte flankieren, einen sequenzspezifischen Einfluß auf die CopR-Bindungseffizienz ausüben. Dazu wurde eine Bibliothek von 121 bp-langen Oligodesoxyribonukleotiden synthetisiert. Unmittelbar stromaufwärts und stromabwärts von der CopR-Bindungsregion befand sich jeweils eine 5bp-lange randomisierte Teilsequenz.

			I	II		
rs	5' -AAGCTTAATGATTT	-N5-	CGTGT	GAATAAT	GCACG	-N5- AAATCATGGATCC-3'
1	5' -AAGCTTAATGATTT	<i>TTTGG</i>	CGTGT	GAATAAT	GCACG	<i>TAAAT</i> AAATCATGGATCC-3'
2	5' -AAGCTTAATGATTT	<i>CTTTC</i>	CGTGT	GAATAAT	GCACG	<i>TAAGA</i> AAATCATGGATCC-3'
3	5' -AAGCTTAATGATTT	<i>ACTAC</i>	CGTGT	GAATAAT	GCACG	<i>CACTA</i> AAATCATGGATCC-3'
4	5' -AAGCTTAATGATTT	<i>TTCTC</i>	CGTGT	GAATAAT	GCACG	<i>TTGAA</i> AAATCATGGATCC-3'
5	5' -AAGCTTAATGATTT	<i>GCTAC</i>	CGTGT	GAATAAT	GCACG	<i>TTAAA</i> AAATCATGGATCC-3'
6	5' -AAGCTTAATGATTT	<i>AATCT</i>	CGTGT	GAATAAT	GCACG	<i>ATTTA</i> AAATCATGGATCC-3'
7	5' -AAGCTTAATGATTT	<i>TGATG</i>	CGTGT	GAATAAT	GCACG	<i>GGTCC</i> AAATCATGGATCC-3'
8	5' -AAGCTTAATGATTT	<i>GTGCC</i>	CGTGT	GAATAAT	GCACG	<i>CTGAA</i> AAATCATGGATCC-3'
9	5' -AAGCTTAATGATTT	<i>AGCTT</i>	CGTGT	GAATAAT	GCACG	<i>CGCTG</i> AAATCATGGATCC-3'
10	5' -AAGCTTAATGATTT	<i>CTAGC</i>	CGTGT	GAATAAT	GCACG	<i>TACAT</i> AAATCATGGATCC-3'
11	5' -AAGCTTAATGATTT	<i>TGAAG</i>	CGTGT	GAATAAT	GCACG	<i>CATTA</i> AAATCATGGATCC-3'
12	5' -AAGCTTAATGATTT	<i>TAGTC</i>	CGTGT	GAATAAT	GCACG	<i>CAGGT</i> AAATCATGGATCC-3'
13	5' -AAGCTTAATGATTT	<i>AACAA</i>	CGTGT	GAATAAT	GCACG	<i>TGGCC</i> AAATCATGGATCC-3'
14	5' -AAGCTTAATGATTT	<i>CCGGG</i>	CGTGT	GAATAAT	GCACG	<i>ACCTC</i> AAATCATGGATCC-3'
wt	5' -	AAGCTTAAT	GATTT	CGTGT	GAATAAT	GCACG AAATC ATGGATCC -3'

Tab. 5: In SELEX IV (N_{5+5}) selektierte Sequenzen. Die CopR-Bindungsorte I und II und der *spacer* sind fett gedruckt dargestellt. Der randomisierte Sequenzbereich ist kursiv abgebildet. rs:randomisierte Sequenz; wt:Wildtyp-Operatorsequenz

Die Selektion wurde mit 200 pmol der partiell randomisierten Oligonukleotide gestartet. Dabei konnte davon ausgegangen werden, daß 115×10^6 Kopien jeder möglichen Sequenz

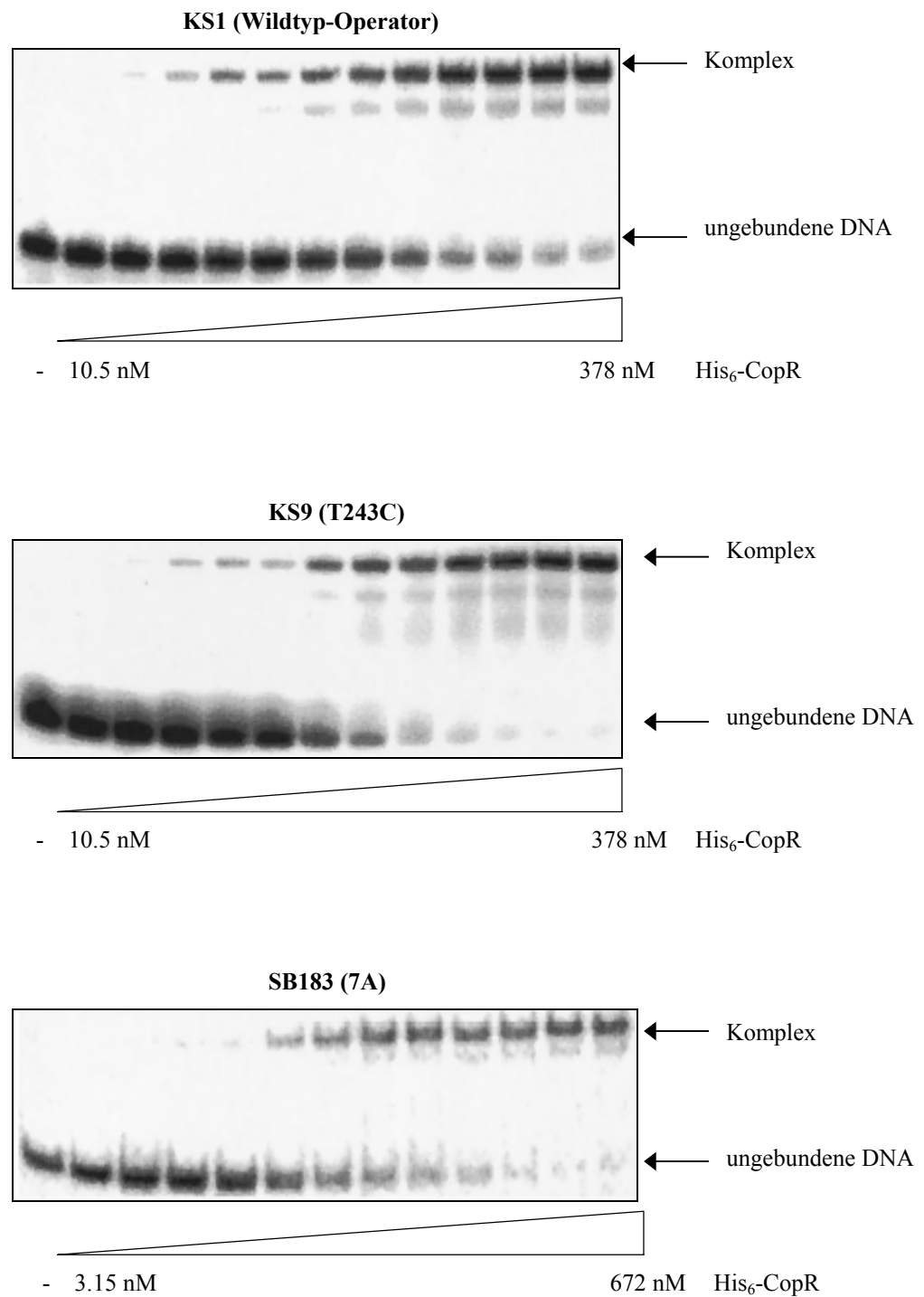
in dem Gemisch von Oligonukleotiden vertreten waren. Wie erwartet, waren bereits in der 1. SELEX-Runde die gebundenen DNA-Spezies im Gel sichtbar. In der Tab. 5 sind die Sequenzen der nach Runde 10 sequenzierten 14 Klone dargestellt. Das Ergebnis dieser SELEX IV zeigte, daß die den CopR-Bindungsstellen unmittelbar benachbarten Basenpaare keinen sequenzspezifischen Einfluß auf die CopR-Bindungsaffinität ausübten.

3.2. Bindungskurven mutierter CopR-Operatoren

Ausgehend von den Resultaten der SELEX I-IV wurde durch Gelretardierungsexperimente untersucht, welchen Einfluß Mutationen in den CopR-Bindungsstellen und der *spacer*-Region auf die CopR-Bindungsaffinität haben. Daher wurden Gelretardierungsexperimente mit 61 bp-langen CopR-Operatorsequenzen mit unterschiedlichen Mutationen durchgeführt (Tab. 1). Hierbei wurden die radioaktiv markierten Oligodesoxyribonukleotide mit steigenden Mengen His₆-CopR inkubiert. Die CopR-DNA-Komplexe wurden in einem Polyacrylamidgel von den ungebundenen DNA-Liganden elektrophoretisch getrennt. Durch Gelelektrophorese bei 4 °C ist es möglich, instabile Protein-DNA-Interaktionen zu detektieren. Aus diesem Grunde erfolgten einige Elektrophoresen bei 4 °C. Anschließend wurden die Bandenintensitäten quantifiziert und entsprechende Bindungskurven erstellt (Abb. 13). Die Berechnung der Dissoziationskonstanten erfolgte wie in Steinmetzer & Brantl, 1997 beschrieben. In der Tab. 6 sind die Dissoziationskonstanten der untersuchten DNA-Fragmente zusammengefaßt.

In der SELEX II und SELEX III wurden überwiegend Operatorsequenzen mit vollständig symmetrischen CopR-Bindungsstellen selektiert. Die selektierten DNA-Sequenzen wiesen dabei die Mutation T243C im Bindungsstelle I an Position 243 auf. Es war bereits bekannt, daß ein DNA-Fragment mit dieser vollständig symmetrischen DNA-Operator-Sequenz (KS9) CopR mit gleicher Affinität wie der Wildtyp-Operator bindet (Steinmetzer *et al.*, 1998). Die Dissoziationskonstanten mutierter DNA-Fragmente KS9 und KS3, bei denen durch Mutation vollständig symmetrische Bindungsstellen hergestellt wurden, wurden bestimmt. Es zeigte sich, daß KS9 (T243C) eine 2fach niedrigere Dissoziationskonstante als KS1 (0.4 nM) mit Wildtyp-Operator-Sequenz aufwies. KS9 bindet CopR damit mit höherer Affinität als der Wildtyp-Operator mit partieller Asymmetrie in der Erkennungssequenz. Im Gegensatz dazu wurde KS3 (1.54 nM), in dem G251 im

Bindungsort II durch A ersetzt wurde und somit ebenfalls vollständige Symmetrie besitzt, von CopR schlechter als KS1 gebunden. Wahrscheinlich wurde durch die geringere Bindungsaffinität zu CopR diese symmetrische Operatorsequenz in den SELEX II und III-Experimenten nicht selektiert.



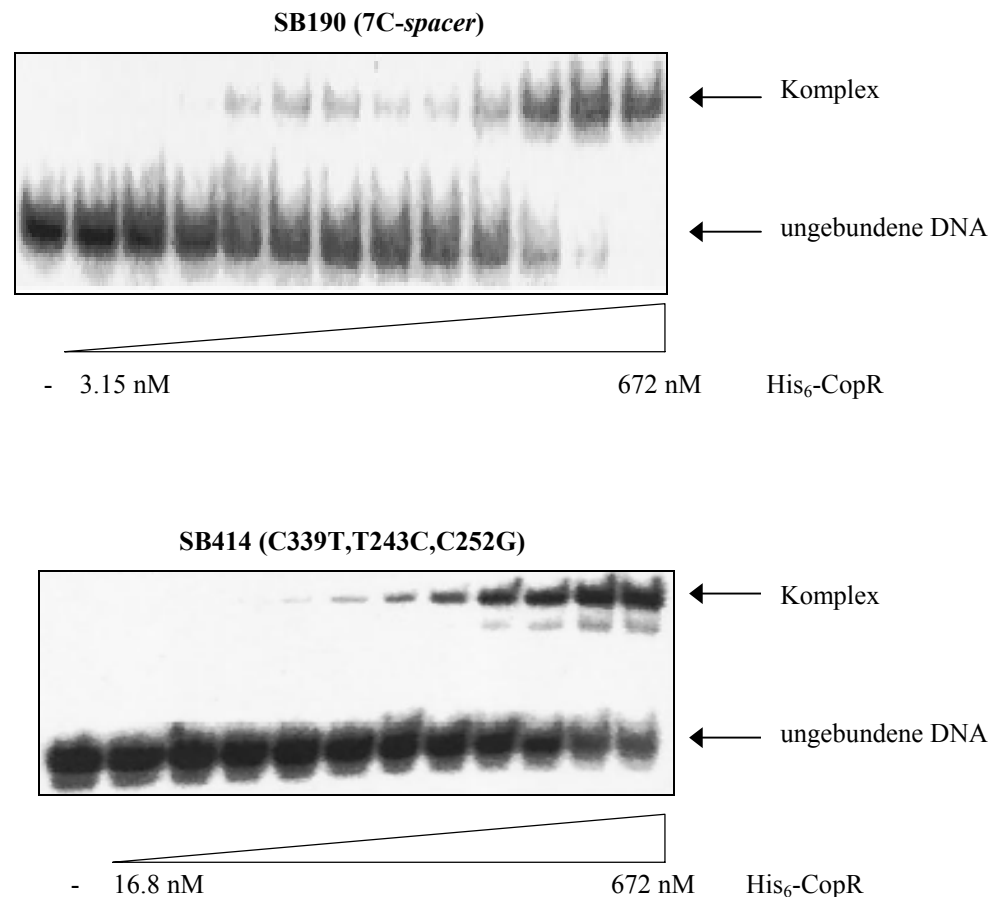


Abb. 11: Gelretardierungsexperimente mit mutierten CopR-Operatorsequenzen. Steigende Mengen His₆-CopR wurden mit 0.9 nM radioaktiv markierten Oligodesoxyribonucleotiden inkubiert. Die Bandenintensitäten ungebundener und CopR-gebundener DNA wurden quantifiziert, anschließend die in Abb. 13 dargestellten Bindungskurven erstellt.

In der SELEX III wurden ausschließlich Operatorsequenzen selektiert, die einen 7 bp-langen *spacer* zwischen den Bindungsorten I und II aufwiesen. Der Komplex aus einem DNA-Fragment mit 8 bp-langem *spacer* (SB189, siehe Tab. 1) und CopR erwies sich im Gelretardierungsexperiment als instabil, so daß er bereits nach 20 minütiger Gelelektrophorese bei 4 °C fast vollständig dissoziierte (Abb. 12). Ein Operator mit einem 6 bp-langen *spacer* (SB188, Tab. 1) wurde von CopR hingegen nicht gebunden (Daten nicht dargestellt).

Die in den SELEX I-III-Experimenten angereicherten Sequenzen zeichneten sich durch einen hohen Anteil an Adeninen und Thyminen in der *spacer*-Region aus. Durch die Bestimmung der Dissoziationskonstanten von CopR-Operatoren, deren *spacer* ausschließlich aus Adeninen (7A), Thyminen (7T), Cytosinen (7C) oder Guaninen (7G) bestehen, sollte der Einfluß der Nukleotidsequenz innerhalb der *spacer*-Region auf die

CopR-Bindungsaffinität untersucht werden. Dabei zeigte sich, daß Operatoren mit 7A- oder 7T-*spacer* mit nahezu gleicher Affinität wie der Wildtyp-Operator von CopR gebunden wurden (SB183 und SB184; Abb. 11, Tab. 6). Dagegen zeigten DNA-Fragmente mit CopR-Bindungsregionen, die einen 7C- oder 7G-*spacer* enthielten, eine 10- bis 15fache geringere Affinität zu CopR als das Wildtyp-Operator-Fragment (SB190 und SB187; Abb. 11, Tab. 6).

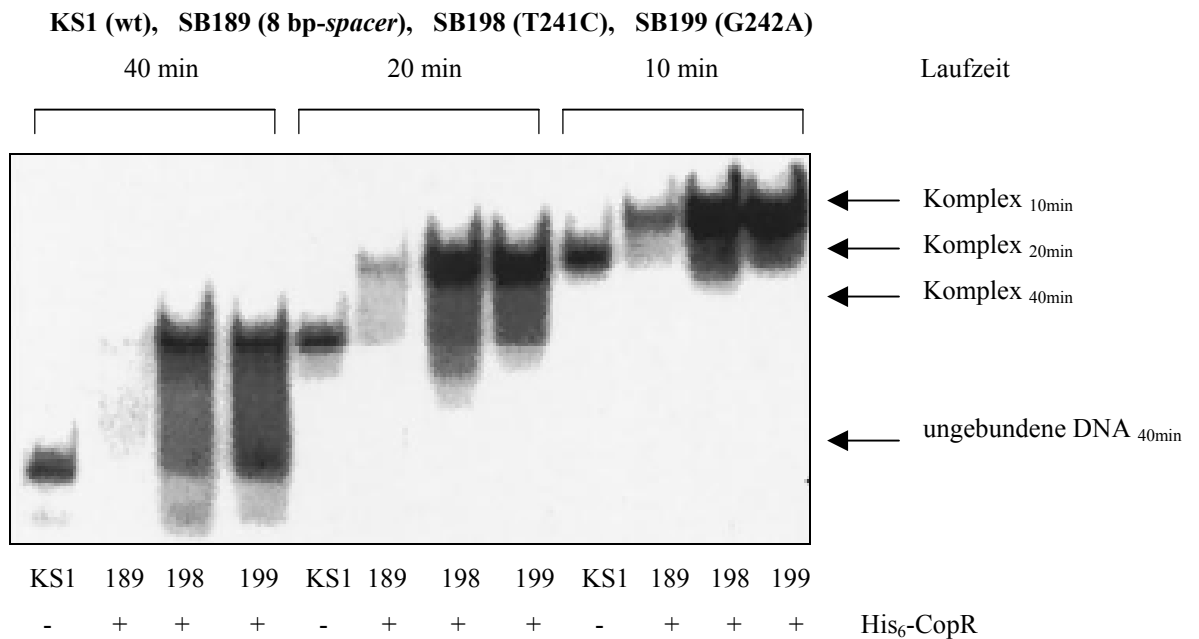


Abb. 12: Autoradiogramm eines EMSAs mit Wildtyp-CopR-Operator und mutierten CopR-Operatorsequenzen, die mit CopR instabile Komplexe bilden. Nach Inkubation von CopR mit den radioaktiv markierten Oligodesoxyribonukleotiden wurden die Komplexe in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt. Das Autoradiogramm zeigt die Komplexe nach 10, 20 und 40 minütiger Elektrophorese.

Durch die Bindung von CopR an den Operator erfolgt eine Konformationsänderung des DNA-Rückgrats (Steinmetzer *et al.*, 1998 und 2002). In Hydroxylradikal-Footprinting-Experimenten wurden durch CopR-Bindung induzierte hypersensitive Spaltpositionen in der *spacer*-Region detektiert (Steinmetzer *et al.*, 1998). Diese Positionen enthalten jeweils einen Pyrimidin-Purin-Dinukleotidschritt. Pyrimidin-Purin-Dinukleotidschritte zeichnen sich durch erhöhte Flexibilität aus, wodurch eine Konformationsänderung der DNA durch Protein-Bindung erleichtert wird (Bertrand *et al.*, 1998). Um den Einfluß der innerhalb des *spacers* gelegenen Pyrimidin-Purin-Dinukleotidschritte auf die CopR-Bindungsaffinität zu untersuchen, wurden zwei DNA-Fragmente mit Einzelmutationen im *spacer* im EMSA

getestet. Für das DNA-Fragment SB175 (T247A) wurde eine 2fach höhere Dissoziationskonstante (0.82 nM) als für das Wildtyp-DNA-Fragment (0.4 nM) berechnet. SB 174 mit der Mutation G244T band CopR mit Wildtyp-Affinität (Tab. 6). Die Zerstörung der Pyrimidin-Purin-Schritte innerhalb des *spacers* zeigte damit keinen drastischen Einfluß auf die Bindungsaffinität von CopR.

Oligodesoxyribonukleotide	K _D (nM)	eingeführte Mutation(en)
Puffer mit NaCl ^a :		
KS1	0.40 ± 0.05	Wildtyp-Operator
SB175	0.82 ± 0.05	T247A (Pyr/Pur-Schritt im <i>spacer</i>)
SB174	0.42 ± 0.05	G244T (Pyr/Pur-Schritt im <i>spacer</i>)
SB183	0.36 ± 0.04	<i>spacer</i> mit 7A
SB184	0.30 ± 0.07	<i>spacer</i> mit 7T
SB187	6.21 ± 1.90	<i>spacer</i> mit 7G
SB190	4.11 ± 0.90	<i>spacer</i> mit 7C
Puffer ohne NaCl ^b :		
KS1	0.40 ± 0.06	Wildtyp-Operator
KS9	0.18 ± 0.05	T243C
KS3	1.54 ± 0.11	G251A
SB414	1.28 ± 0.16	C239T, T243C, C252G
SB417	0.68 ± 0.07	C239T, T243C
SB418	0.30 ± 0.05	C252G; T243C

Tab. 6: Dissoziationskonstanten mutierter CopR-Operatoren. ^a Bindungs-, Elektrophoresepuffer und Polyacrylamidgele enthielten 75 mM NaCl, die Elektrophorese erfolgte bei 4 °C. ^b Die Gelretardierungsexperimente wurden ohne NaCl durchgeführt.

Weiterhin wurde die Bindungsaffinität von DNA-Fragmenten mit unterschiedlichen Einzelnukleotidaustauschen im Bindungsort I untersucht. Es zeigte sich, daß die DNA-Fragmente SB198 (T241C) und SB199 (G242A) mit CopR einen instabilen Komplex bildeten, der während kurzzeitiger Gelelektrophorese bei 4 °C zerfiel (Abb. 12). Ein DNA-Fragment mit der Mutation C239T (SB180) bildete hingegen mit CopR keinen detektierbaren Komplex (Daten nicht gezeigt). Bereits in früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß Einzelmutationen in den CopR-Bindungsstellen I und II zu einem drastischen Verlust der CopR-Bindungsaffinität führen (Steinmetzer et al., 1998).

Erstaunlich erscheint daher das Ergebnis der SELEX III, in der Sequenzen mit zwei, drei oder sogar vier Mutationen in den Bindungsorten I und II selektiert wurden. Deshalb wurden die Dissoziationskonstanten von drei DNA-Fragmenten bestimmt, die die Mutationen der selektierten Sequenzen enthielten. Das DNA-Fragment SB414 (C239T, T243C, C252G), das zwei Mutationen im Bindungort I und eine im Bindungsort II aufwies, wurde mit 3fach geringerer Affinität als das Wildtyp-DNA-Fragment KS1 gebunden (Tab. 6). SB417 (C239T, T243C) mit zwei Mutationen im Bindungsort I wies eine 1.7fach höhere Dissoziationskonstante als KS1 auf. Das DNA-Fragment SB418 (T243C, C252G) mit je einer Mutation in den beiden Bindungsorten wurde von CopR sogar mit 1.3fach größerer Affinität als KS1 (Wildtyp) gebunden (Tab. 6). Diese kombinierten Mutationen in den beiden CopR-Bindungsorten führen folglich nicht zu einer drastischen Reduzierung der CopR-Bindungsaffinität.

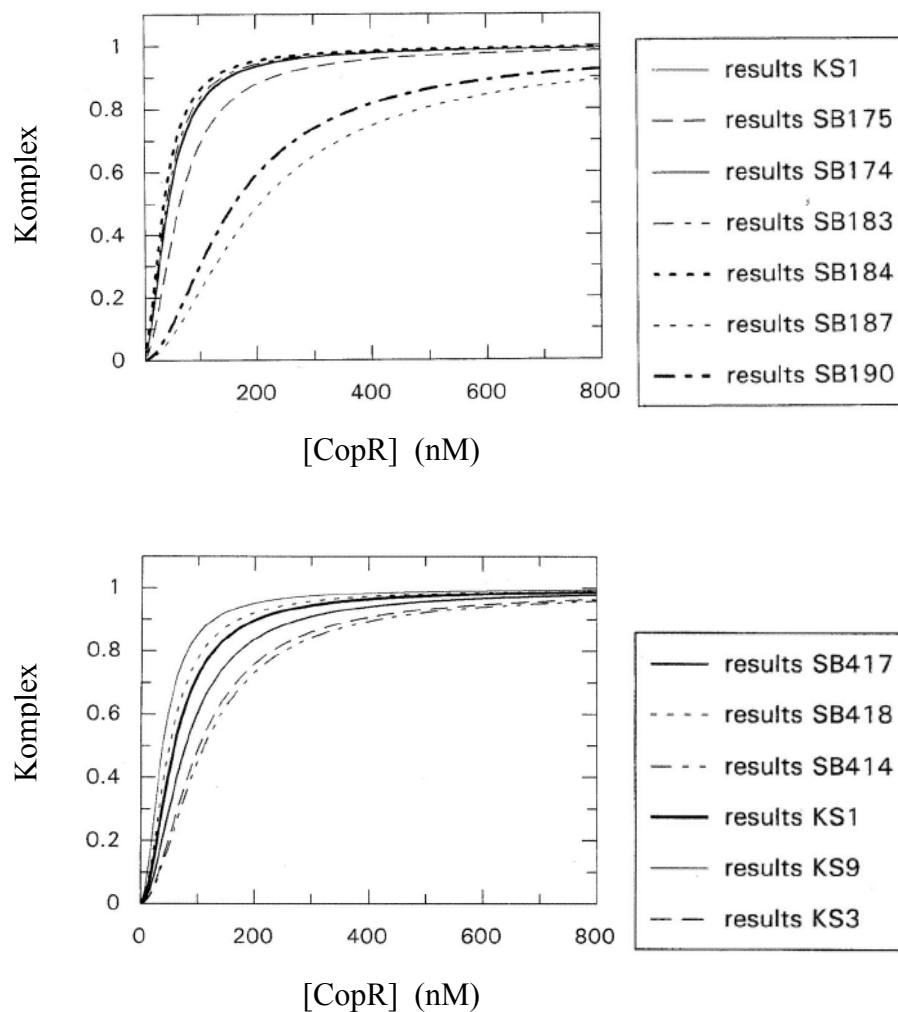


Abb. 13: Bindungskurven mutierter CopR-Operatoren. Die Bindungskurven dienten als Grundlage für die Berechnung der Dissoziationskonstanten der DNA-CopR-Komplexe.

3.3. *In vitro*-Transkription mit mutierten CopR-Operatoren

Ausgehend von den Ergebnissen der unterschiedlichen SELEX- und EMSA-Experimenten wurde der Einfluß von Mutationen in der CopR-Operator-Region auf die Repression der Transkription am Promotor pII *in vitro* untersucht. Die verwendeten 320 bp-langen DNA-Fragmente enthielten die CopR-Operator-Region, den Promotor pII des *repR*-Gens und den Promotor pIII des *rnaIII*-Gens, das die antisense-RNA (RNAIII) kodiert. Durch die Wechselwirkung von RNAII (*repR*-mRNA) und RNAIII erfolgte ein vorzeitiger Transkriptionsabbruch der *repR*-mRNA. Aus diesem Grund wurden durch die *B. subtilis* RNA-Polymerase (M. Salas, Madrid) zwei *repR*-mRNA unterschiedlicher Länge gebildet (RNAII_f und RNAII_t, siehe Abb. 14).

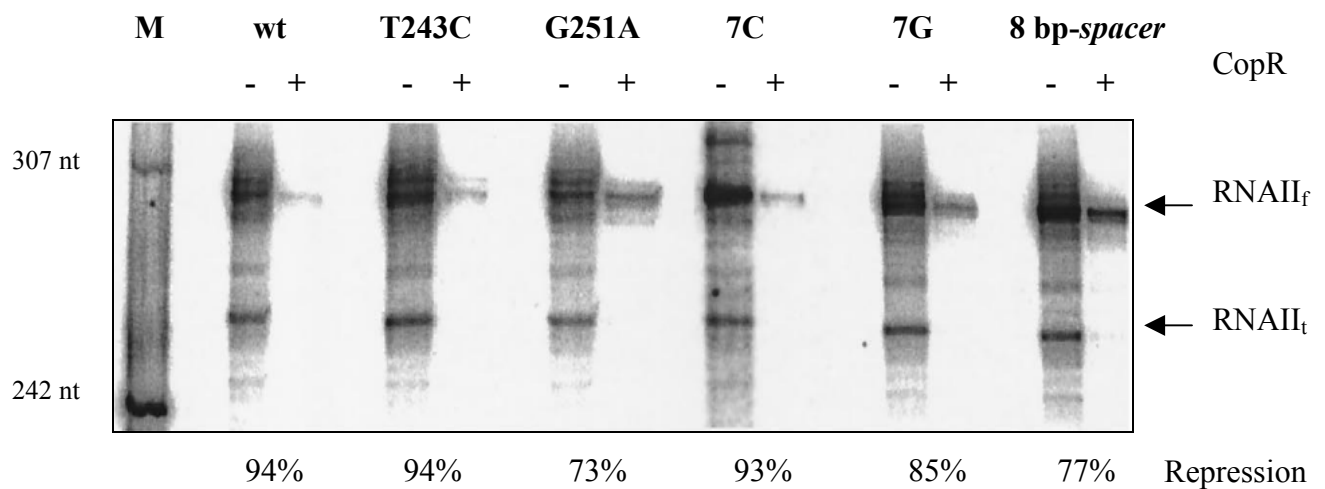


Abb. 14: *In vitro*-Transkription mit mutierten CopR-Operatoren. Der Einfluß verschiedener Mutationen in der CopR-Operatoresequenz auf die Repression der Transkription am Promotor pII wurde untersucht. 0.5 nM DNA-Fragmente wurden mit 1 µM nativem CopR inkubiert. Die Transkriptionsinitiation erfolgte nach Zugabe von 30 nM *B. subtilis* RNA-Polymerase. RNAII_f - RNAII, die durch vollständige Transkription der verwendeten DNA-Fragmente entstanden; RNAII_t - am Attenuator terminierte RNAII

Die Transkription vom Promotor pII eines DNA-Fragmentes, das den Wildtyp-CopR-Operator enthielt, wurde durch CopR um 94 % reprimiert. Die Repression der Transkription von pII eines DNA-Fragmentes mit vollständig symmetrischen CopR-Bindungsstellen, die durch die Mutation T243C (entspricht der Sequenz von KS9, siehe 3.2.) erzeugt wurden, betrug ebenfalls 94%. Dieses Ergebnis entspricht den Resultaten der EMSAs und der SELEX II und III, in denen überwiegend Sequenzen mit diesem

symmetrischen Operator selektiert wurden. Das DNA-Fragment mit der Mutation G251A im Bindungsort II (KS3) zeigte einen ca. 4fach niedrigeren Repressionseffekt als der Wildtyp-Operator. Dieses Ergebnis spiegelte sich in einem Vergleich der Dissoziationskonstanten von KS3 und KS1 wieder. KS3 bindet CopR mit 4fach niedrigerer Affinität als das Wildtyp-DNA-Fragment. Desweiteren wurde der Effekt eines 8 bp-langen *spacers* auf die durch CopR-Bindung verursachte Repression der Transkription untersucht. Dabei zeigte sich, daß diese Mutationen innerhalb der CopR-Bindungsregion eine 4fach niedrigere Transkriptionsrepression am Promotor pII bewirkte. Dieser Effekt korreliert mit dem Ergebnis des EMSAs, in dem gezeigt wurde, daß ein DNA-Fragment mit 8 bp-langem *spacer* einen instabilen Komplex mit CopR bildete. Überraschenderweise wurde die Transkription mit einem DNA-Fragment, das einen *spacer* aus 7 Cytosinen (7C) aufwies, um 93 % reprimiert. Ein ähnliches Resultat wurde mit einem aus 7 Guaninen (7G) bestehenden *spacer* beobachtet. In diesem Falle betrug die Repression 85%. Wahrscheinlich ist der hohe Repressionseffekt an diesen beiden Operatoren auf Effekte der Basenstapelung innerhalb der C- bzw. G-reichhaltigen CopR-Bindungsregion zurückzuführen. Für die *in vitro*-Transkriptionsversuche wurde natives CopR (Präparation N. Heidrich) verwendet, da ein störender Einfluß der N-terminalen Histidin-Reste des His₆-CopR auf die inhibitorische Wirkung beobachtet wurde. Vermutlich sind die N-terminalen Aminosäuren von CopR an Interaktionen mit der RNA-Polymerase während der Transkriptionsinitiation involviert.

3.4. Bindung von CopR und *B. subtilis* - RNA-Polymerase an den Promotor pII

Durch DNase I – Footprinting-Experimente wurde die Bindung von *B. subtilis*-RNA-Polymerase und CopR an die DNA-Region des Promotors pII untersucht. Dazu wurden 100 nM eines 235 bp-langen, radioaktiv markierten DNA-Fragmentes mit *B. subtilis* RNA-Polymerase (Endkonzentration 90 nM) oder His₆-CopR (Endkonzentration 4.4 µM) inkubiert. Die Protein-DNA-Komplexe wurden anschließend mit DNase I behandelt. Die gespaltene DNA wurde in einem denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt.

Der DNase I-Footprint zeigte, daß die RNA-Polymerase im offenen Initiationskomplex den Nukleotidbereich zwischen den Positionen – 46 bis + 15 (+1 Transkriptionsstartpunkt) am Promotor pII bedeckte (Abb. 15).

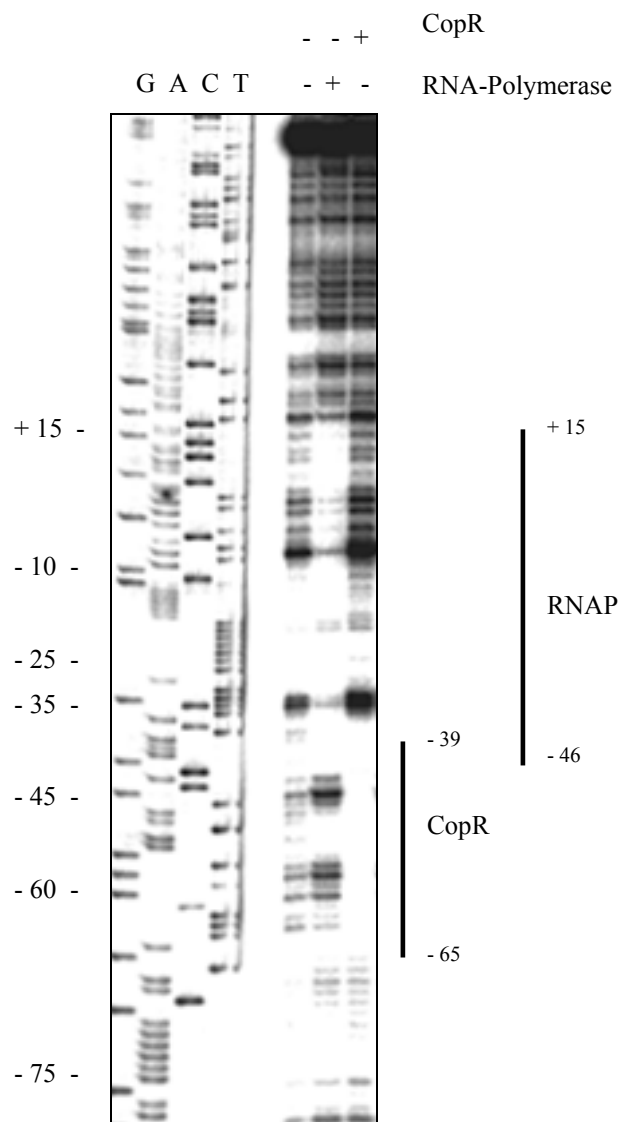


Abb. 15: DNase I – Footprinting von *B. subtilis* RNAP und CopR. Die Bindungsorte von CopR und *B. subtilis*-RNA-Polymerase am Promotor pII wurden durch DNase I-Footprinting-Experimente untersucht. Die Nukleotidpositionen am Promotor pII sind am linken Rand der Abb. gekennzeichnet. Am rechten Rand sind die von den Proteinen bedeckten DNA-Bereiche markiert.

Der Sequenzbereich zwischen den Nukleotiden –65 und –39 wurde durch die Bindung von CopR an den Operator vor Spaltung durch DNase I geschützt (Abb. 15). Das entspricht einer 27 bp-langen Nukleotidsequenz. Die minimale CopR-Erkennungssequenz umfaßt 17 Nukleotide (Steinmetzer & Brantl, 1997). Das Ergebnis zeigte, daß CopR vermutlich mit jeweils 5 unmittelbar stromaufwärts und –abwärts von der 17 bp-langen Bindungsregion befindlichen Nukleotiden wechselwirkt. Diese Nukleotide bilden mit dem Konsensusmotiv 5'-CGTG der beiden CopR-Bindungsstelle I und II eine palindromische Sequenz. Das

Ergebnis des DNase I-Footprint-Experimentes mit CopR läßt vermuten, daß zusätzliche Nukleotide außerhalb der Bindungsregion von CopR kontaktiert werden. Die Bindungsregion von CopR überdeckt damit partiell die Bindungsregion der RNA-Polymerase.

3.5. Einfluß von CopR auf die Bildung des offenen Transkriptionsinitiationskomplexes am Promotor pII

Durch KMnO₄-Footprinting können einzelsträngige DNA-Regionen detektiert werden. Mit dieser Methode wurde der Einfluß von CopR auf die Bildung des offenen Transkriptionsinitiationskomplexes am Promotor pII untersucht. Dazu wurden 100 nM eines 235 bp-langen, radioaktiv markierten DNA-Fragmentes, das den CopR-Operator und den Promotor pII umfaßt, mit 90 nM *B. subtilis* RNA-Polymerase und 2.2 bzw. 4.4 µM His₆-CopR inkubiert. Anschließend wurde der DNA-Protein-Komplex mit KMnO₄ behandelt. KMnO₄ oxidiert einzelsträngig vorliegende Pyrimidine. Thyminen werden dabei mit höherer Präferenz als Cytosinen modifiziert (Sasse-Dwight & Gralla, 1989). Die DNA wurde anschließend mittels alkalischer Hydrolyse (Piperidin als Spaltreagenz) an den modifizierten Positionen gespalten. Die Trennung der Produkte erfolgte durch Gelelektrophorese in einem denaturierenden Polyacrylamidgel. In den *in vitro*-Transkriptionsversuchen konnte ein störender Einfluß des am N-Terminus von CopR befindlichen 'Histidin-tags' auf den durch CopR bewirkten inhibitorischen Effekt auf die Transkription vom Promotor pII beobachtet werden. Aus diesem Grunde wurden die KMnO₄-Footprinting-Versuche mit His₆-CopR durchgeführt, das die zusätzlichen Histidin-Aminosäurereste am C-Terminus des Proteins aufwies (Präparation AG Bakteriengenetik). In der Abb. 16 ist das Autoradiogramm eines KMnO₄-Footprinting-Experimentes dargestellt. Das Ergebnis des KMnO₄-Footprints zeigte, daß der DNA-Bereich zwischen den Positionen -12 und -3 (+1 Transkriptionsstartpunkt) am Promotor pII durch die Bildung des offenen Transkriptionsinitiationskomplexes partiell aufgeschmolzen wurde. Eine Spaltung der DNA erfolgte an den Thyminen der Positionen -12, -10, -7 und -3 (Abb. 16). In Anwesenheit von 4.4 µM CopR wurde die Bildung dieser einzelsträngigen DNA-Region um 84 % gehemmt. Das Ergebnis des KMnO₄-Footprintings zeigte, daß durch CopR die Bildung des offenen Transkriptionsinitiationskomplexes am Promotor pII reprimiert wird.

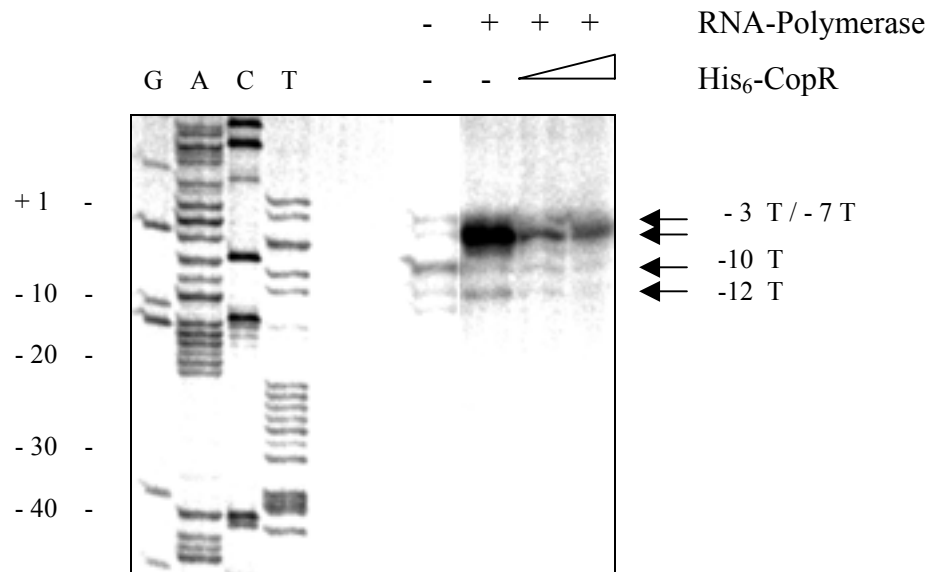


Abb. 16: Einfluß von CopR auf die Bildung des offenen Transkriptionsinitiationskomplexes am Promotor pII. Die durch KMnO_4 -Footprinting detektierten einzelsträngigen Positionen im offenen Komplex wurden durch horizontale Pfeile am rechten Rand der Abb. markiert. Es wurden 90 nM *B. subtilis*-RNAP und 2.2 bzw. 4.4 μM His₆-CopR eingesetzt.

3.6. Bindung der α -CTD-RNA-Polymerase und CopR an den Promotor pII

Von einigen wenigen bakteriellen Transkriptionsrepressoren wird vermutet, daß sie während der Transkriptionsinitiation mit der α -CTD-RNA-Polymerase in Wechselwirkung treten (Choy *et al.*, 1995; Monsalve *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 2002; Yamamoto & Ishihama, 2003). Diese Wechselwirkungen beeinflussen Vorgänge der Transkriptionsinitiation, die nach Bindung der RNA-Polymerase an die Promotor-DNA stattfinden. Letztendlich führen sie zur Repression der Transkription. Im Folgenden sollte die Bindung der α -CTD-RNA-Polymerase an den Promotor pII in An- und Abwesenheit von CopR untersucht werden. Hierzu wurde ein Gelretardierungsexperiment durchgeführt, in dem 100 nM eines 235 bp-langen, den Promotor pII umfassenden DNA-Fragmentes (siehe 2.7.) mit 4.4 μM His₆-CopR und / oder 5.8 μM His₆- α -CTD-RNA-Polymerase inkubiert wurde. Aus dem Autoradiogramm der Abb. 17 ist ersichtlich, daß das DNA-Fragment sowohl von CopR als auch von der α -CTD-RNA-Polymerase gebunden wurde. Gemeinsam bildeten die beiden Proteine mit dem DNA-Fragment einen Komplex, der sich durch eine geringere elektrophoretische Mobilität auszeichnete. Das Ergebnis zeigte

deutlich, daß CopR und α -CTD-RNA-Polymerase simultan an die DNA-Region des Promotors pII binden. Im Gegensatz dazu konnte eine Bindung der α -NTD-RNA-Polymerase an den Promotor pII nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

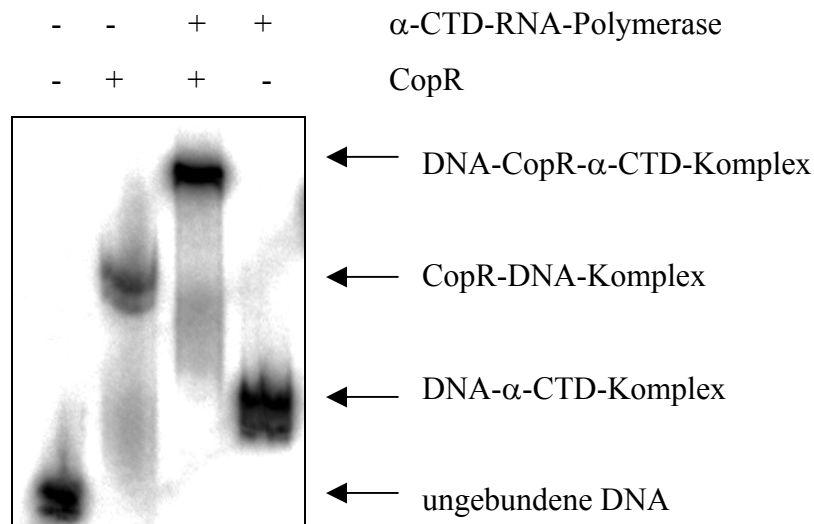


Abb. 17: Simultane Bindung von CopR und der α -CTD-RNA-Polymerase an den Promotor pII. EMSA mit 100 nM eines 235 bp-langen, radioaktiv markierten DNA-Fragmentes, 4.4 μ M CopR und/ oder 5.8 μ M α -CTD-RNA-Polymerase. Die DNA-Proteinkomplexe wurden in einem nativen Polyacrylamidgel getrennt und anschließend mittels Autoradiographie detektiert.

3.7. Bestimmung der Bindungsregion der α -CTD-RNA-Polymerase am Promotor pII

Durch ein DNase I-Footprinting-Experiment sollte daraufhin die Bindungsregion der α -CTD-RNA-Polymerase am Promotor pII bestimmt werden. Aus der Abb. 18 wird ersichtlich, daß die α -CTD-RNA-Polymerase die Sequenz zwischen den Nukleotidpositionen -87 und -69 am Promotor pII bedeckt. Diese DNA-Region zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an Adeninen aus (Abb. 19). Der Sequenzbereich zwischen den Nukleotiden der Positionen -65 und -39 wurde durch die Bindung von CopR an den Operator vor Spaltung durch DNase I geschützt. Somit befinden sich zwischen der CopR-Bindungsregion und dem davon stromaufwärts gelegenen α -CTD-RNA-Polymerase-Bindungsort lediglich drei Nukleotide. Zusätzlich konnte eine weitere, von der α -CTD-RNA-Polymerase kontaktierte Nukleotidabfolge beobachtet werden (Abb. 18). Es ist anzunehmen, daß dieser stromabwärts von der CopR-Bindungsregion, zwischen der -10-

und -35 -Region gelegene, detektierte α -CTD-RNAP-Footprint durch einen *in vitro*-Effekt verursacht wurde, da dieser DNA-Bereich des Promotors *in vivo* vom σ -Faktor der RNA-Polymerase kontaktiert wird. Es ist bekannt, daß die α -CTD-RNA-Polymerase an vielen Promotoren die DNA über stromaufwärts der -35 -Region gelegene, A-/T-reiche UP-Elemente kontaktiert (Ross *et al.*, 1993). 82 % der DNA-Basen zwischen den Nukleotidpositionen -10 und -35 des Promotors pII werden entweder durch ein Thymin oder durch ein Adenin gebildet. Somit zeichnet sich dieser DNA-Bereich durch einen hohen A-/T-Gehalt aus, der vermutlich *in vitro* zur Bindung der α -CTD-RNA-Polymerase an diese DNA-Region führte.

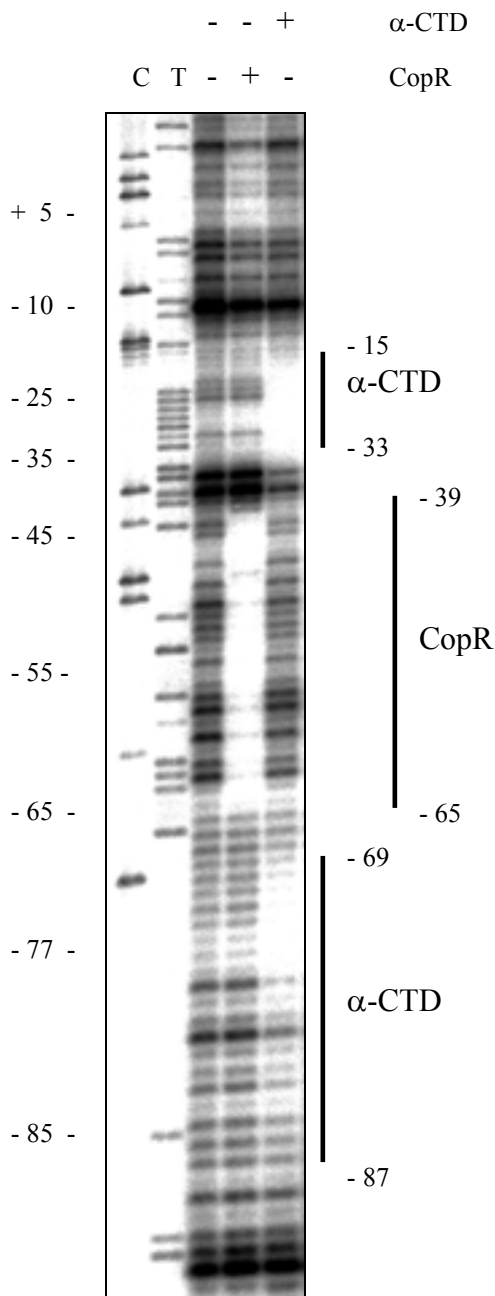


Abb.18: DNase I- Footprint der α -CTD-RNA-Polymerase und CopR. 100 nM eines 235 bp-langen, radioaktiv markierten DNA-Fragmentes wurden mit 4.4 μ M CopR bzw. 10.6 μ M α -CTD-RNA-Polymerase inkubiert. Die Protein-DNA-Komplexe wurden mit DNase I behandelt und in einem denaturierendem Polyacrylamidgel getrennt. Die Detektion der DNA erfolgte durch Autoradiographie. Die Nukleotidpositionen am Promotor pII sind am linken Rand der Abb. dargestellt. Am rechten Abbildungsrand sind die von den Proteinen bedeckten DNA-Bereiche gekennzeichnet.

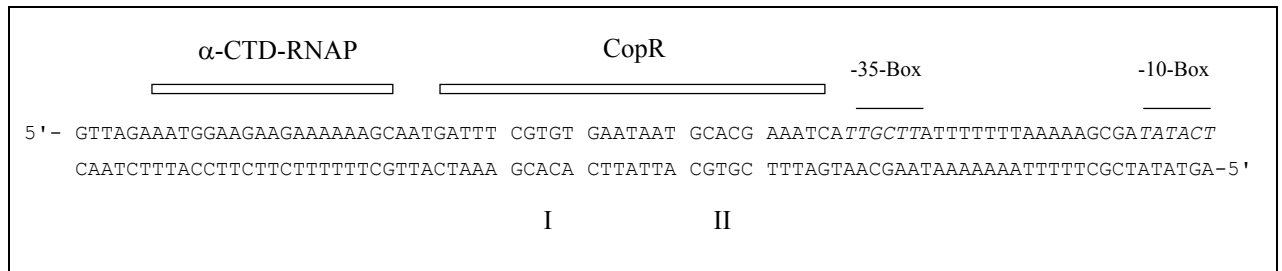


Abb. 19: Bindungsregionen von CopR und der α -CTD-RNAP am Promotor pII. Die CopR-Bindungsstelle I und II, die -35 - und -10 -Box des Promotors pII sowie die von CopR und der α -CTD-RNAP-Polymerase bedeckten DNA-Bereiche sind gekennzeichnet.

3.8. Interaktion der α -CTD-RNA-Polymerase mit CopR

Da die Bindungsstelle von CopR und der α -CTD-RNA-Polymerase am Promotor pII lediglich einige Nukleotide entfernt voneinander liegen, lag die Vermutung nahe, daß CopR die α -CTD-RNA-Polymerase während der Transkriptionsinitiation kontaktiert. Im Folgenden sollte die Interaktion der *B. subtilis* α -CTD-RNA-Polymerase mit CopR durch Glutardialdehyd-Crosslinking-Experimente untersucht werden. Glutardialdehyd fungiert als homobifunktionales Reagenz, das Aminogruppen miteinander interagierender Proteine verknüpft. Alle Protein-Komplexe wurden mit 0.05 % Glutardialdehyd behandelt und anschließend in einem 17.5 % SDS-Polyacrylamidgel getrennt. Die Detektion der Komplexe erfolgte mittels Western-Blotting durch ein polyklonales Antiserum, das eine 15 Aminosäure-lange Teilsequenz von CopR erkennt. Sämtliche in diesen Experimenten - außer CopR - verwendeten Proteine wurden durch dieses Antiserum nicht detektiert.

Um eine Komplexbildung zwischen CopR und der α -CTD- bzw. α -NTD-RNA-Polymerase nachzuweisen, wurden 8.7 μ M *B. subtilis* His₆- α -CTD- und 8.0 μ M His₆- α -NTD-RNA-Polymerase mit jeweils 8.6 μ M His₆-CopR inkubiert und anschließend mit Glutardialdehyd behandelt. Aufgrund der Vermutung, daß Aminosäuren des N-Terminus von CopR an einer Interaktion mit der RNA-Polymerase involviert sind (siehe 3.3), wurde in den Versuchen His₆-CopR mit C-terminalem 'Histidin-tag' verwendet. Aus der Abb. 21 ist zu erkennen, daß CopR-Monomere durch Glutardialdehyd kovalent miteinander zu Dimeren und Trimeren verknüpft wurden. Monomere der α -CTD-RNA-Polymerase bildeten mit CopR-Monomeren Heterodimere, die sich im Vergleich zu CopR-Dimeren durch eine größere elektrophoretische Mobilität auszeichneten (Abb. 20). Desweiteren

wurden Heterooligomere aus CopR- und α -CTD-RNA-Polymerase-Molekülen detektiert. Die Ergebnisse dieses Crosslinking-Experimentes zeigten, daß CopR und α -CTD-RNA-Polymerase *in vitro* miteinander interagieren. Dagegen konnte keine Interaktion der α -NTD-RNA-Polymerase und CopR nachgewiesen werden (Abb. 20).

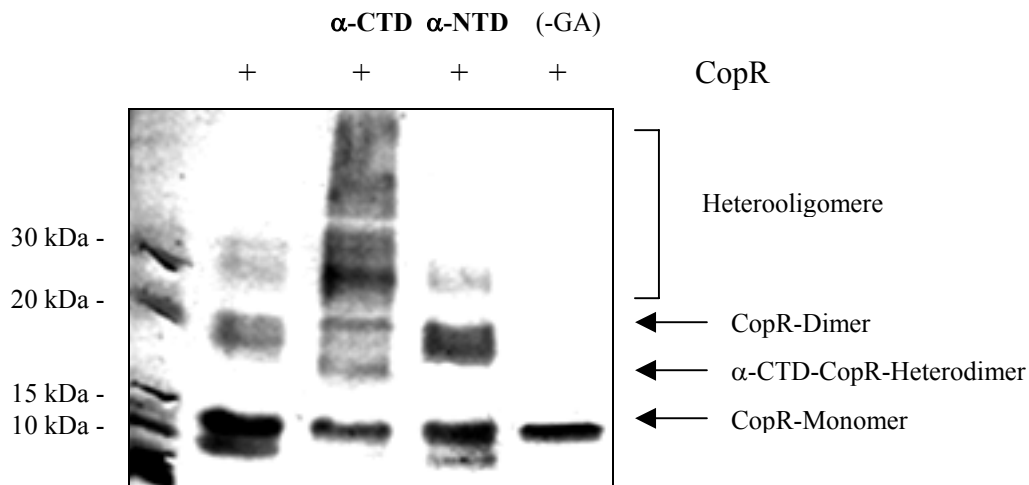


Abb. 20: Interaktion von CopR mit der C-terminalen Domäne der α -Untereinheit der *B. subtilis* RNA-Polymerase. Die Protein-Komplexe wurden mit 0.05 % Glutardialdehyd behandelt, anschließend in einem 17.5 % SDS-Polyacrylamidgel getrennt und durch Western-Blotting mit einem polyklonalem Antikörper gegen CopR detektiert. -GA: CopR wurde nicht mit Glutardialdehyd behandelt.

Nachdem eine Interaktion der *B. subtilis* α -CTD-RNA-Polymerase mit CopR nachgewiesen werden konnte, sollte der Einfluß der C-terminalen Aminosäuren der α -CTD-RNA-Polymerase auf die Interaktion mit CopR untersucht werden. Dazu wurden drei C-terminal verkürzte Mutanten der α -CTD-RNA-Polymerase, denen 15, 7 bzw. 3 Aminosäuren fehlten ($\Delta 15$ -, $\Delta 7$ - und $\Delta 3$ - α -CTD), in Glutardialdehyd-Crosslinking-Experimenten eingesetzt. Die verwendeten Proteine wurden mittels Affinitätschromatographie gewonnen. In den Versuchen wurden $8.7 \mu\text{M}$ *B. subtilis* His₆- α -CTD-RNA-Polymerase bzw. $8.2 \mu\text{M}$ *B. subtilis* $\Delta 15$ - α -CTD-, $7.3 \mu\text{M}$ $\Delta 7$ - α -CTD- und $7.1 \mu\text{M}$ $\Delta 3$ - α -CTD-RNA-Polymerase mit jeweils $8.6 \mu\text{M}$ His₆-CopR inkubiert und anschließend mit Glutardialdehyd behandelt. Die um 3 bzw. 7 Aminosäuren verkürzten α -CTD-RNA-Polymerasen bildeten mit CopR Heterodimere (Abb. 21). Dahingegen konnte

keine Heterodimerkomplexbildung von CopR- und $\Delta 15$ - α -CTD-RNAP-Monomeren detektiert werden. Die Ergebnisse lieferten einen Indiz dafür, daß Aminosäuren des C-Terminus der α -CTD-RNA-Polymerase in der Interaktion mit CopR involviert sind.

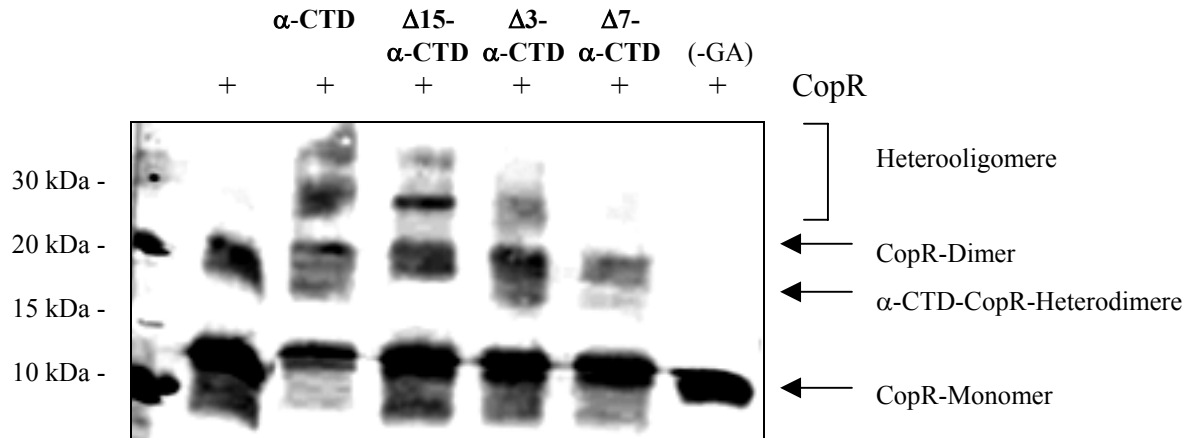


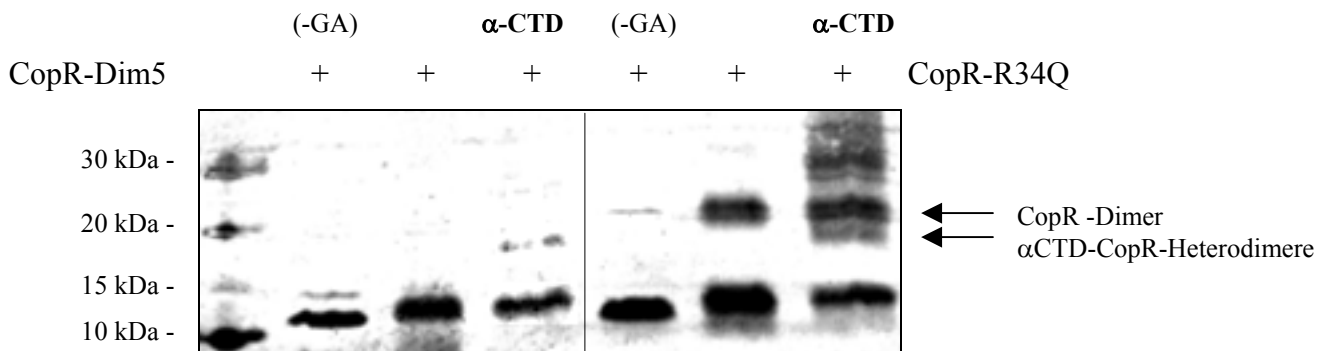
Abb. 21: Glutardialdehyd-Crosslinking mit C-terminal verkürzten Mutanten der α -CTD-RNAP und His₆-CopR. Die Detektion der Protein-Komplexe erfolgte mittels Western-Blotting. –GA: CopR wurde nicht mit Glutaraldidehyd behandelt.

Um den an der Interaktion mit der α -CTD-RNA-Polymerase beteiligten Aminosäurebereich von CopR einzuschränken, wurden Glutardialdehyd-Crosslinking-Experimente mit mutierten CopR-Proteinen und der α -CTD-RNA-Polymerase durchgeführt. Zur Untersuchung der Komplexbildungen wurden eine Dimerisierungsmutante (CopR-Dim5), eine DNA-Bindungsmutante (CopR-R34Q) bzw. eine Stabilisierungsmutante (CopR- $\Delta 27$) von CopR verwendet. In den Versuchen wurden 9.1 μ M His₆-CopR- $\Delta 27$ (Präparation K. Kuhn), 8.4 μ M His₆-CopR-Dim5 (Präparation K. Kuhn) bzw. 8.8 μ M His₆-CopR-R34Q (Präparation Dr. K. Steinmetzer) mit 8.7 μ M *B. subtilis* His₆- α -CTD-RNA-Polymerase inkubiert, anschließend mit Glutardialdehyd behandelt.

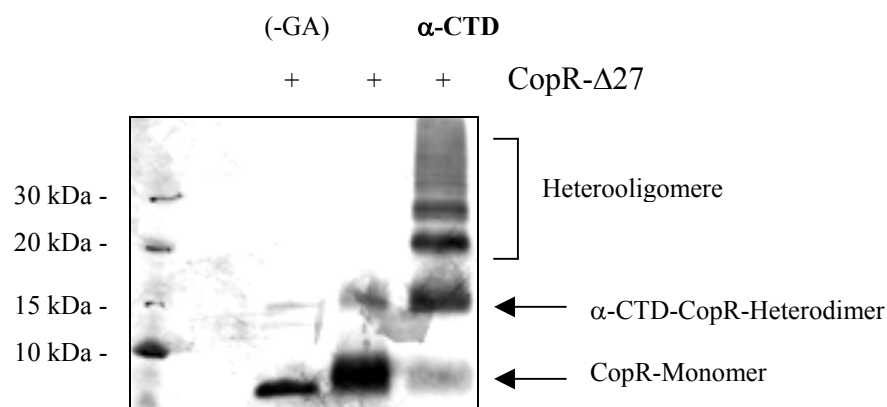
CopR-Dim5 weist die Mutationen L58D, V59S und L62D auf. Die Einführung dieser Mutationen in der Helix V bewirkt einen starken Verlust der Dimerisierungsfähigkeit von CopR (Steinmetzer et al., 2000b). Dementsprechend konnten im Glutardialdehyd-Crosslinking keine CopR-Dim5-Dimere detektiert werden (Abb. 22A). CopR-Dim5-

Monomere bildeten jedoch mit α -CTD-RNA-Polymerase-Monomeren Heterodimere. Heterooligomere wurden nicht detektiert (Abb. 22A). Offensichtlich ist für die Bildung von Heterooligomeren die Dimerisierung von CopR notwendig.

Die Punktmutation R34Q in der DNA-Bindungshelix III von CopR führt zu einer drastischen Reduktion der Bindungsaffinität von CopR an die Operator-DNA (Steinmetzer et al., 2000a). Diese Mutation übt jedoch keinen Einfluß auf die Dimerisierungsfähigkeit von CopR-Monomeren aus (Abb. 22A). CopR-R34Q komplexierte mit der α -CTD-RNA-Polymerase zu Heterodimeren und Heterooligomeren (Abb. 22A). Es ist anzunehmen, daß die in der DNA-Bindungshelix gelegenen Aminosäuren an einer Interaktion mit der α -CTD-RNA-Polymerase nicht beteiligt sind.



A



B

Abb. 22: Glutaraldehyd-Crosslinking-Experimente mit mutierten-CopR-Proteinen und der α -CTD-RNAP. A: Interaktion von CopR-Dim5 und CopR-R34Q mit der α -CTD-RNAP. B: Interaktion der C-terminal verkürzten CopR- Δ 27-Mutante mit der α -CTD. -GA: CopR-Proteine wurden nicht mit Glutaraldehyd behandelt.

Desweiteren wurde der Einfluß des aus überwiegend sauren Aminosäuren bestehende C-Terminus von CopR auf die Interaktion mit der α -CTD-RNA-Polymerase untersucht. Dazu wurde die Komplexbildung zwischen dem C-terminal um 27 Aminosäurenreste verkürzten CopR- Δ 27 und der α -CTD-RNA-Polymerase im Crosslinking-Experiment verfolgt. CopR- Δ 27-Monomere wurden lediglich zu Dimeren verknüpft (Abb. 22B). Die Glutardialdehyd-Behandlung eines Proteinkomplexes aus α -CTD-RNA-Polymerase und CopR- Δ 27 resultierte dahingegen in der Detektion von Heterooligomeren. Aufgrund der nahezu identischen Molekulargewichte von His₆-CopR- Δ 27 (8.4 kDa) und His₆- α -CTD-RNA-Polymerase (8.2 kDa) wies der Heterodimerkomplex aus den beiden Proteinen eine nur geringfügig höhere elektrophoretische Mobilität als der CopR-Dimer-Komplex auf (Abb. 21B). Identische Ergebnisse wurden unter Verwendung des C-terminal um 20 Aminosäurenreste verkürzten CopR- Δ 20 erzielt (Daten nicht dargestellt). Anhand der Ergebnisse kann ausgeschlossen werden, daß der C-Terminus von CopR an der Interaktion mit der α -CTD-RNA-Polymerase beteiligt ist. Weiterführende Experimente wären notwendig, um die an der Interaktion mit der α -CTD-RNA-Polymerase beteiligten Aminosäuren von CopR genau zu definieren.

4. Diskussion

4.1. *In vitro*-Selektion von CopR-Operatoren

Durch die Anwendung der SELEX-Methode konnten in vier unterschiedlichen *in vitro*-SELEX-Experimenten Sequenzspezifitäten und einzelne Nukleotide des CopR-Operators identifiziert werden, die für eine effiziente Bindung von CopR essentiell sind. Die Ergebnisse der SELEX-Experimente zeigten, daß für die effiziente Bindung von CopR an den Operator eine AT-reichhaltige Nukleotidabfolge zwischen den beiden Bindungsorten I und II essentiell ist. Dabei wies die Mehrzahl der selektierten Sequenzen ein Adenin oder Thymin in Position 6 der *spacer*-Region auf. In Position 7 konnte in den meisten Sequenzen ein Thymin nachgewiesen werden. Interessanterweise ist dieses Thymin Bestandteil einer der beiden TG-Dinukleotidschritte innerhalb der CopR-Bindungsregion. Aus früheren Untersuchungen wurde vermutet, daß zwei 11 Nukleotide voneinander entfernte TG-Dinukleotidschritte einen entscheidenden Beitrag zur Flexibilität des CopR-Operators leisten (Steinmetzer *et al.*, 2002). Das diesem Thymin benachbarte G251 des Bindungsortes II, das ebenfalls Bestandteil dieses TG-Dinukleotidschrittes ist, wurde unverändert in allen selektierten Operatorsequenzen gefunden. Die Mutation G251A an dieser Nukleotidposition führte zu einer 2.8fachen Zunahme der Plasmidkopiezahl (Freede & Brantl, 2004). Das deutet darauf hin, daß die Selektion *in vivo* nach maximaler Bindungsaffinität erfolgte. Der zweite TG-Dinukleotidschritt befindet sich innerhalb des Bindungsortes I (T241,G242). In keiner der selektierten Sequenzen fand sich an diesen Positionen eine Abweichung von der Sequenz des Wildtyp-Operators.

In der SELEX III wurden ausschließlich Operatoren mit einem 7 bp-langen *spacer* selektiert. Mittels *in vitro*-Transkription konnte ein deutlich verminderter Repressionseffekt auf die Transkription vom Promotor pII durch die Einführung eines zusätzlichen Nukleotids zwischen den beiden CopR-Bindungsorten detektiert werden. Durch die Bestimmung der Kopiezahl eines pIP501-Derivates mit 8 bp-langem *spacer* konnte eine 1.5fach höhere Kopiezahl, d.h. eine geringere Repressionsaktivität von CopR als für den Wildtyp-Operator mit 7 bp-langem *spacer* ermittelt werden (Freede & Brantl, 2004). Diese Ergebnisse zeigten, daß ein Abstand von 7 Nukleotiden zwischen den beiden CopR-Bindungsorten für eine effiziente Bindung von CopR und eine effiziente Repression der Transkription vom Promotor pII durch CopR essentiell ist.

Die Gesamtheit aller selektierten CopR-Operatorsequenzen wies vom Wildtyp-Operator unverändert die beiden Guanine der Positionen 240 und 254 auf. Aus Gelretardierungsexperimenten war bereits bekannt, daß ein Austausch dieser beiden Guanine zu einem drastischen Verlust der CopR-Bindungsaffinität führt (Steinmetzer & Brantl, 1997). Nach dem Strukturmodell von CopR werden G242, G251 von R34 und G240, G254 von R29 der DNA-Erkennungshelix von CopR spezifisch kontaktiert (Steinmetzer *et al.*, 2000a). Interessanterweise fand sich an keiner dieser Nukleotidpositionen in keiner der angereicherten Operatorsequenzen eine Mutation. Es ist daher anzunehmen, daß die Basenpaare G/C240 und G/C254 einen entscheidenden Einfluß auf die CopR-Bindungsaffinität ausüben.

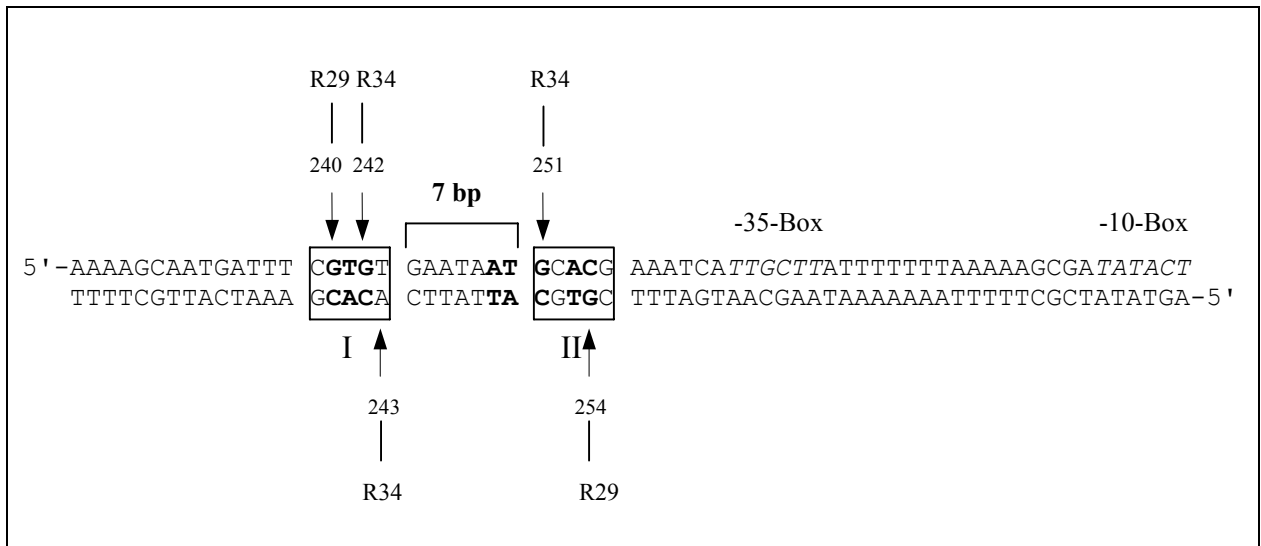


Abb. 23. CopR-Operatorsequenz am Promotor pII. Die für die CopR-Bindung essentiellen Basenpaare sind fettgedruckt dargestellt. Die Pfeile kennzeichnen die Nukleotide in den Bindungsstellen I und II, die von CopR spezifisch kontaktiert werden.

Die beiden von CopR kontaktierten Bindungsstellen enthalten das Sequenzmotiv 5'-CGTG. Sie weisen jedoch, obwohl in einem 'inverted repeat' lokalisiert, eine partielle Asymmetrie auf, da sie teilweise in den nicht mehr symmetrischen *spacer* reichen. An Stelle des Basenpaares G/C251 im Bindungsstelle II ist im Bindungsstelle I das Basenpaar A/T243 zu finden. Die Mehrzahl der in den SELEX II- und SELEX III-Experimenten selektierten Operatorsequenzen wies durch die Mutation T243C im Bindungsstelle I eine vollständig symmetrische CopR-Bindungsregion auf. Anhand des Strukturmodells von CopR wurde vermutet, daß diese Nukleotidposition durch R34 der DNA-Erkennungshelix von CopR spezifisch kontaktiert wird. Außerdem wurde vermutet, daß die Bindung zwischen CopR

und der DNA durch die Mutation T243C begünstigt wäre (Steinmetzer *et al.*, 2000a). Wahrscheinlich wiesen aus diesem Grund 70 % der in der SELEX II angereicherten Sequenzen die Mutation T243C auf. Die Dissoziationskonstante eines Komplexes aus CopR und diesem DNA-Fragment war 2fach niedriger als die des CopR-Wildtyp-Operator-Komplexes. Das deutet darauf hin, daß die Selektion *in vitro* nach maximaler Bindungsaffinität erfolgte.

In der SELEX III wurden Operatorsequenzen mit zwei, drei oder sogar vier Mutationen innerhalb der beiden CopR-Bindungsstelle selektiert. Dieses Ergebnis scheint überraschend, da gezeigt wurde, daß Einzelnukleotidmutationen in den Bindungsstellen zu einem drastischen Verlust der CopR-Bindungsaffinität führen (Steinmetzer & Brantl, 1997). Die selektierten Mutationen befanden sich jedoch nicht an Nukleotidpositionen, die laut dem Strukturmodell von CopR sequenzspezifisch kontaktiert werden (Steinmetzer *et al.*, 2000a). Die Mutationen C239T, T243C und C252G führten zu einer 2.9fachen Zunahme der Plasmidkopiezahl (Freede & Brantl, 2004), also zu einem drastischen Verlust der Transkriptionsrepression am Promotor pII, obwohl 50% aller in der SELEX III selektierten Sequenzen diese Mutationen in den Bindungsstellen aufwiesen. Es ist deshalb anzunehmen, daß die *in vivo*-Selektion des CopR-Operators während der Evolution nach maximaler Bindungsaffinität erfolgte. Anhand der SELEX IV-Resultate wurde gezeigt, daß die Basenpaare, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu den beiden Bindungsstellen befinden, keinen sequenzspezifischen Einfluß auf die Bindungsaffinität von CopR ausüben. Die *in vitro*-Selektion von CopR-Operatorsequenzen in vier unterschiedlichen SELEX-Experimenten zeigte, daß die Evolution der Nukleotidsequenz des CopR-Operators nach maximaler CopR-Bindungsaffinität erfolgte. Das SELEX-Verfahren diente hierbei als Methode zur Bestimmung der Nukleotide, die für eine effiziente Bindung von CopR an die Operator-DNA des Promotors pII essentiell sind.

4.2. Vergleich der Bindungskurven der durch SELEX angereicherten Operatorsequenzen

Um die CopR-Bindungsaffinitäten der Operatorsequenzen zu bestimmen, die in den SELEX-Experimenten angereichert wurden, wurde eine Reihe von Gelretardierungsexperimenten durchgeführt. Nach einer quantitativen Auswertung dieser Versuche konnten Bindungskurven erstellt werden, mittels derer anschließend die Dissoziationskonstanten der jeweiligen CopR-DNA-Komplexe ermittelt wurden.

Mit den Resultaten der SELEX-Experimente konnte gezeigt werden, daß eine A-/T-reiche *spacer*-Region für die effiziente Bindung von CopR an den Operator essentiell ist. Eine ausschließlich Adeninen oder aber Thyminen bestehende Nukleotidabfolge zwischen den Bindungsorten wirkte sich in den Gelretardierungsversuchen nicht vermindern auf die CopR-Bindungsaffinität aus. Die Ergebnisse korrelieren mit denen der SELEX I-III, in denen überwiegend Sequenzen mit A-/T-reichhaltigen *spacern* angereichert wurden. Ein zwischen den beiden CopR-Bindungsorten befindlicher 7 bp-langer *spacer*, der ausschließlich aus Cytosinen oder Guaninen besteht, reduzierte dagegen die Bindungsaffinität von CopR drastisch. Überraschenderweise wich die Transkriptionsrate in der *in vitro*-Transkription von Operatoren mit 7C- bzw. 7G-*spacer* nur geringfügig von der des Wildtyp-Operators ab. Diese Beobachtung ist vermutlich auf Basenstapel-Effekte innerhalb der *spacer*-Region zurückzuführen. Ein Vergleich der β -Glukosidase-Aktivitäten chromosomaler *repR-lacZ*-Fusionen ergab, daß die Aktivität eines *B. subtilis*-Stammes mit 7C-*spacer* in Abwesenheit von CopR 2.5fach niedriger ist als bei einem Stamm mit Wildtyp-Operator (Freede & Brantl, 2004). Wahrscheinlich verringert eine stromaufwärts der -35-Region von pII befindliche C-reiche *spacer*-Region die Transkriptionseffizienz der RNA-Polymerase. Der durch die Bindung von CopR verursachte Repressionseffekt wurde durch einen 7C-*spacer* 4fach vermindert. Das Ergebnis deutet darauf hin, daß die Bindung von CopR *in vivo* durch Überspiralisierung der Operator-DNA beeinflusst wird. Wurde die Nukleotidsequenz zwischen den beiden CopR-Bindungsorten um ein Nukleotid verkürzt, war CopR nicht in der Lage, die Operator-DNA zu binden. Eine Erweiterung des *spacers* um ein Nukleotid führte zur Bildung eines instabilen CopR-DNA-Komplexes. Ein derartiger 8 bp-langer *spacer* bewirkte eine Verringerung der reprimierenden Wirkung von CopR auf die Transkription vom Promotor pII. In der SELEX III wurden aus diesem Grund ausschließlich CopR-Operatoren mit 7 bp-langem *spacer* angereichert. Ein Abstand von 7 Nukleotiden zwischen den beiden CopR-Bindungsorten ist daher für die effiziente Bindung von CopR essentiell. Wurde der TG-Dinukleotidschritt innerhalb des Bindungsortes I (T241C, G242A) durch Mutationen zerstört, bildete CopR mit der Operator-DNA einen instabilen Komplex. Aus diesem Grunde wurden derartige Operatorsequenzen während der *in vitro*-Selektion nicht selektiert. Die Zerstörung des TG-Dinukleotidschrittes zwischen *spacer* und Bindungsort II (T250, G251) führte in jedem Fall zur Verringerung der CopR-Bindungsaffinität. So führte die Mutation G251A zu einer verminderten Bindungsaffinität, in der *in vitro*-Transkription zu einer verminderten Repressionsaktivität von CopR und zu einer erhöhten

Plasmidkopiezahl gegenüber dem Wildtyp-Operator (Freede & Brantl, 2004). Diese Sequenz wurde dementsprechend durch *in vitro*-Selektion nicht angereichert.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der SELEX-Experimente kann den beiden TG-Dinukleotidschritten innerhalb der Bindungsorte I und II eine entscheidende Bedeutung für die effiziente Bindung von CopR zugeordnet werden. Offensichtlich leisten sie einen wichtigen Beitrag zur Flexibilität des CopR-Operators. Die Flexibilität der DNA ist dabei für die durch CopR-Bindung verursachte Konformationsänderung des Operators von tragender Bedeutung. Pyrimidin-Purin-Dinukleotidschritte zeichnen sich generell durch eine erhöhte Flexibilität aus, wodurch eine Konformationsänderung der DNA durch Protein-Bindung erleichtert wird (Bertrand *et al.*, 1998). Durch die Bindung von CopR an den Operator erfolgt eine Konformationsänderung des DNA-Rückgrats (Steinmetzer *et al.*, 1998 und 2002). In Hydroxylradikal-Footprinting-Experimenten wurden durch CopR-Bindung induzierte hypersensitive Spaltpositionen in der *spacer*-Region detektiert (Steinmetzer *et al.*, 1998). Diese Positionen enthalten jeweils einen Pyrimidin-Purin-Dinukleotidschritt. Es wurde deshalb vermutet, daß diese Nukleotide für eine effiziente Bindung von CopR essentiell sind. Durch die Bestimmung der Dissoziationskonstanten entsprechend mutierter DNA-Fragmente konnte jedoch festgestellt werden, daß die beiden Pyrimidin-Purin-Dinukleotidschritte zwischen den beiden Bindungsorten keinen Einfluß auf die Bindungsaffinität von CopR ausübten.

4.3. Vergleich des CopR-Operators mit den Operatoren der verwandten Transkriptionsrepressoren CopF und CopS

Die Nukleotidsequenzen der zur *inc18*-Familie gehörenden Plasmide pIP501, pAM β 1 und pSM19035 weisen mit 97 % einen hohen Grad an Sequenzhomologie auf. Ein Vergleich der entsprechenden Operatorsequenzen von CopR, CopF und CopS zeigt, daß die Operatoren identische Bindungsorte I und II aufweisen (Ceglowski *et al.*, 1993; Swinfield *et al.*, 1990). Die einzigen Unterschiede zwischen den CopR- und CopS-Operatoren sind in der *spacer*-Region (G244A, T247A) zu finden. Zwischen den CopR- und CopF-Operatoren sind lediglich an zwei Nukleotidpositionen außerhalb der beiden Cop-Bindungsorte Unterschiede zu finden (T236G, A261G). Durch die SELEX IV konnte gezeigt werden, daß die Nukleotide außerhalb der beiden Bindungsorte keinen sequenzspezifischen Einfluß auf die Bindung von CopR ausüben. Die Ergebnisse der

SELEX I und der Gelretardierungsversuche mit DNA-Fragmenten mutierter *spacer*-Regionen zeigten, daß die beiden Nukleotidpositionen, in denen sich die CopS- vom CopR-Operatoren voneinander unterscheiden (G244A, T247A), für eine effiziente Bindung und Regulation nicht bedeutsam sind.

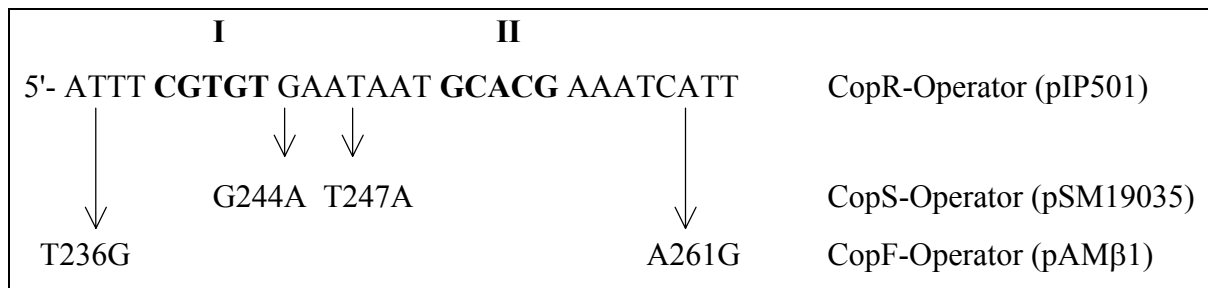


Abb. 24: Vergleich der Operatorsequenzen von CopR, CopF und CopS.

Die für die effiziente Bindung von CopR essentiellen Nukleotide sind in allen drei Operatoren zu finden. So entstanden während der Evolution in drei verschiedenen Plasmiden identische Cop-Bindungsstellen. Die Anwendung der SELEX bewies sich damit im Falle der Untersuchung der Bindungsregion eines einfachen Transkriptionsrepressors als eine Methode zur Untersuchung evolutionärer Fragen.

4.4. Bindung von CopR an den Operator

Die für die CopR-DNA-Bindung essentiellen Basen bzw. Phosphatreste des DNA-Rückgrates wurden durch vier unterschiedliche SELEX-Experimente detektiert. Die CopR-Bindungsregion wurde auf eine 17 bp-lange-DNA-Sequenz begrenzt (Steinmetzer & Brantl, 1997). Der DNase I-Footprint zeigte, daß CopR den DNA-Bereich von C234 bis G260 (entspricht den Pos. -65 bis -39 relativ zum *repR*-mRNA-Transkriptionsstart) bedeckte. Damit erstreckte sich die CopR-Bindungsregion über 27 Nukleotide, wobei weitere 5 Nukleotide stromaufwärts und -abwärts von der 17 bp-langen minimalen Bindungsregion gebunden wurden. Hydroxylradikal-Footprinting-Experimente ergaben, daß CopR außerhalb der 17-bp-Bindungsregion zusätzliche Basenpaare kontaktiert (Steinmetzer *et al.*, 2002). In Gelretardierungsexperimenten wurde gezeigt, daß ein 17 bp-langes CopR-Operator-DNA-Fragment ein 61 bp-langes DNA-Fragment nicht aus dem Komplex mit CopR verdrängen kann (Steinmetzer *et al.*, 2002). Dagegen jedoch wirkt ein

31 bp-langes DNA-Fragment als Kompetitor eines Komplexes aus 61 bp-langem Fragment und CopR. Die Ergebnisse des DNase I-Footprintings und der SELEX IV zeigten, daß CopR mit DNA-Basen wechselwirkt, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu den beiden CopR-Bindungsstellen gelegen sind, obwohl sie offensichtlich keinen sequenzspezifischen Einfluß auf die CopR-Bindungsaffinität ausüben. Vermutlich dienen diese sequenzspezifischen Wechselwirkungen der Stabilisierung der Bindung von CopR an die Promotor pII-DNA.

4.5. Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor pII

Die Bindungsregion der RNA-Polymerase am Promotor pII wurde durch DNase I-Footprinting-Experimente ermittelt. Der DNA-Bereich, der von der RNA-Polymerase bedeckt wird, erstreckt sich zwischen den Nukleotidpositionen -46 bis +15. CopR bindet an den unmittelbar stromaufwärts von der RNAP-Bindungsregion befindlichen Operator. Durch DNase I-Footprinting-Experimente konnte ebenfalls gezeigt werden, daß die Bindungsregion von CopR die RNAP-Bindungsregion partiell überdeckt. Dieser partiell überlappende DNA-Bereich umfaßt die stromabwärts der Minimal-CopR-Operatorsequenz befindlichen Nukleotide, mit denen CopR wahrscheinlich sequenzspezifisch wechselwirkt. An dieser Stelle sei daraufhingewiesen, daß DNase I-Footprintings keine Aussagen über die Lage von Proteinen an der DNA liefern. So ist es möglich, daß CopR und die RNA-Polymerase die DNA an entgegengesetzten Seiten binden. Eine simultane Bindung von CopR und der RNAP an den Promotor pII konnte durch Gelretardierungsversuche nicht nachgewiesen werden. Aufgrund des geringen Molekulargewichtes von CopR (His₆-CopR 11.6 kDa) war es nicht möglich, elektrophoretisch einen RNAP-CopR-DNA-Komplex sichtbar von einem RNAP-DNA-Komplex zu trennen.

Es ist bekannt, daß Transkriptionsrepressoren die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor auf zwei unterschiedlichen Wegen verhindern können: Einerseits können sie die DNA über einen direkt innerhalb der Promotorregion liegenden Operator binden. Auf diese Weise führt die Bindung des Repressors zu einer sterischen Behinderung der RNA-Polymerase. Eine Verhinderung der RNAP-Bindung an die Promotor-DNA kann andererseits auch indirekt erfolgen, indem die Bindung des Repressors zu einer drastischen Änderung der Promotor-DNA-Struktur führt. Da sich der CopR-Operator stromaufwärts

und nicht innerhalb der pII-Promotorregion befindet, ist zu vermuten, daß die Bindung von CopR die Bindung der RNAP an den Promotor sterisch nicht behindert. Ebenso verursacht die Bindung von CopR an den Operator keine drastische Änderung der Promotor-DNA-Struktur, wie sie beispielsweise durch die Bindung von CytR am *deo*-Promotor in *E. coli* verursacht wird (Shin *et al.*, 2001). Die Bindung von CopR an den Operator induziert lediglich eine leichte Biegung der DNA, die nicht als Ursache einer Behinderung der RNAP-Bindung angenommen werden kann (Steinmetzer *et al.*, 2002). Es kann angenommen werden, daß die durch CopR-Bindung verursachte Repression der Transkription vom Promotor pII nicht auf eine Blockierung der RNAP-Bindung zurückzuführen ist. Allerdings lassen die vorhandenen Daten keine definitive Aussage darüber zu.

4.6. Repression der Bildung eines offenen Transkriptionsinitiationskomplexes am Promotor pII durch CopR

Repressorproteine können die Transkription von Genen hemmen, indem sie (i) die Bindung der RNA-Polymerase an die Promotor-DNA durch sterische Behinderung verhindern, (ii) die Bildung eines offenen Transkriptionsinitiationskomplexes blockieren und/oder (iii) die RNA-Polymerase am Verlassen der Promotor-DNA hindern (siehe Übersichtsartikel von Rojo, 1999). Durch KMnO₄-Footprinting-Experimente konnte gezeigt werden, daß während der Bildung eines offenen Transkriptionsinitiationskomplexes am Promotor pII ein partielles Aufschmelzen der DNA zwischen den Nukleotidpositionen -12 und -3 erfolgt. Durch CopR wird die Trennung des doppelsträngigen DNA-Bereiches dieser Region drastisch reprimiert. Somit hemmt CopR die Bildung eines offenen Transkriptionsinitiationskomplexes am Promotor pII. Für die durch Transkriptionsrepressoren verursachte Inhibition der Bindung eines offenen Initiationskomplexes gibt es generell zwei mögliche strukturelle Erklärungen: Einerseits ist es möglich, daß die Repression durch inhibitorische Wechselwirkungen zwischen RNAP und dem Repressorprotein verursacht wird. Andererseits kann durch die Bindung eines Repressors eine schwerwiegende Änderung der Promotor-DNA-Struktur erfolgen, so daß die für die Bildung eines stabilen offenen Initiationskomplexes essentielle Umstrukturierung der RNA-Polymerase verhindert wird. Durch FRET-Experimente früherer Studien konnte eine durch CopR-Bindung induzierte leichte Biegung der

Promotor-DNA nachgewiesen werden (Steinmetzer *et al.*, 2002). Hydroxylradikal-Footprinting-Versuche (Steinmetzer *et al.*, 2002) sowie die in dieser Arbeit dargestellten DNase I-Footprinting-Experimente zeigten, daß nach CopR-Bindung keine hypersensitiven Spaltstellen an der Promotor-DNA detektierbar sind. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß durch CopR-Bindung an den Operator keine drastische Konformationsänderung des DNA-Rückgrats der Promotor-DNA erfolgt. Es ist zu vermuten, daß die durch CopR verursachte Repression der Bildung eines offenen Transkriptionsinitiationskomplexes am Promotor pII durch inhibitorische Kontakte mit der RNA-Polymerase verursacht wird. Eine inhibitorische Wirkung von CopR auf das Verlassen der RNAP von der Promotor-DNA könnte beispielsweise durch 'single-round'-*in vitro* Transkriptionsexperimente untersucht werden. Eine Repression der Bildung eines offenen Transkriptionsinitiationskomplexes konnte ebenfalls für den Phagen 434 Repressor am Promotor O_{R2} nachgewiesen werden (Xu & Koudelka, 2001). Ebenso inhibiert das TyrR-Repressorprotein aus *E. coli* die Bildung eines offenen Initiationskomplexes an den Promotoren *aroP* P2 und *tyrB* (Yang *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2002).

4.7. Interaktion der α -CTD-RNA-Polymerase und CopR

Mit Hilfe von Glutardialdehyd-Crosslinking-Experimenten wurde die Interaktion der α -CTD-RNA-Polymerase und CopR untersucht. Die Resultate dieser Experimente zeigten, daß CopR *in vitro* mit der α -CTD-RNA-Polymerase Heterodimere und Heterooligomere bildet, die auf eine Interaktion dieser beiden Proteine deuten. Die Deletion der 27 C-terminal endständigen Aminosäuren von CopR verursachte keinen hemmenden Effekt auf die Heterodimerkomplexbildung zwischen CopR und der α -CTD-RNA-Polymerase. Demzufolge ist der für die Stabilität essentielle, überwiegend aus sauren Aminosäuren bestehende C-Terminus von CopR nicht an einer Interaktion mit der α -CTD-RNA-Polymerase involviert. Die Ergebnisse der Glutaraldehyd-Crosslinking-Experimente mit zwei weiteren CopR-Mutanten deuten darauf hin, daß die Helices, die für die DNA-Bindung und Dimerisierung von CopR verantwortlich sind, ebenfalls nicht an der Interaktion mit der α -CTD-RNA-Polymerase beteiligt sind. Es ist daher anzunehmen, daß die N-terminal gelegenen, einschließlich die die Helix I bildenden Aminosäuren von CopR an einer Interaktion mit der α -CTD-RNA-Polymerase involviert sind. Während die Helix II von CopR die DNA-Erkennungshelix, die Helix III die DNA-Bindungshelix, Helix IV

und V die Dimerisierungshelices bilden, konnte der Helix I bisher keine Funktion zugeordnet werden. Es ist daher durchaus denkbar, daß CopR die RNA-Polymerase über diese Helix kontaktiert, wobei diese Kontakte letztendlich zur Repression der Transkription vom Promotor pII führen. Um den Einfluß des C-Terminus der α -Untereinheiten der RNA-Polymerase auf die Interaktion mit CopR zu untersuchen, wurden Crosslinking-Experimente mit C-terminal verkürzten Varianten der α -CTD-RNA-Polymerase und CopR durchgeführt. Während die Deletion der letzten 3 bzw. 7 C-terminalen Aminosäuren der α -CTD-RNA-Polymerase keinen Einfluß auf die Heterodimerkomplexbildung ausübten, führte der Verlust der letzten 15 Aminosäuren zu einer vollständigen Inhibition der Komplexbildung zwischen CopR und α -CTD-RNA-Polymerase. Dieses Ergebnis zeugt nicht zwingend davon, daß die an der Interaktion beteiligten Aminosäuren zwischen den C-terminalen Resten 7 und 15 gelegen sind, sondern vielmehr von einer durch die $\Delta 15$ -Mutation verursachte Zerstörung des Strukturmotivs, das an der Interaktion mit CopR beteiligt ist. Durch die Deletion dieser 15 Aminosäurereste wurde die C-terminale Hälfte der *B. subtilis* α -CTD-RNA-Polymerase entfernt (Monsalve *et al.*, 1996). Folglich kann davon ausgegangen werden, daß Aminosäurereste des C-Terminus der α -CTD-RNA-Polymerase in der Interaktion mit CopR involviert sind. Weiterführende Experimente, wie z.B. ein Alanin-scanning, wären für eine Detektion einzelner, an einer derartigen Protein-Protein-Interaktion beteiligten Aminosäuren des C-Terminus der α -CTD-RNAP unerlässlich.

Bisher liegen nur wenige Kenntnisse über die Wechselwirkungen zwischen Transkriptionsrepressoren und der α -Untereinheit der RNA-Polymerase vor, die schließlich zur Repression der Transkription führen. Aus der Literatur sind lediglich vier Beispiele von bakteriellen Transkriptionsrepressoren bekannt, deren Wirkungen auf Wechselwirkungen mit der C-terminalen Domäne der α -Untereinheiten der RNA-Polymerase zurückzuführen sind: Das Protein p4 aus dem *B. subtilis* Phagen $\phi 29$ reprimiert die Transkription am frühen Promotor A2c. Während p4 stromaufwärts vom Promotor A2c und der RNA-Polymerase bindet, bildet sich eine Wechselwirkung zwischen p4 und der α -CTD-RNA-Polymerase aus. Diese Interaktion stabilisiert die Bindung der RNA-Polymerase am Promotor, so daß die RNAP am Verlassen der Promotor-DNA gehindert wird (Monsalve *et al.*, 1996; Monsalve *et al.*, 1998). GalR fungiert als Transkriptionsrepressor am Promotor P1 des *gal*-Operons in *E. coli*. Für die reprimierende Wirkung an diesem Promotor ist eine Interaktion zwischen GalR und der α -CTD-RNA-

Polymerase essentiell (Choy *et al.*, 1995). Die inhibitorische Wirkung von GalR auf die Transkription am Promotor P1 ist auf die Inhibition der Bildung eines offenen Initiationskomplexes zurückzuführen (Roy *et al.*, 2004). Das PhoP-Protein wirkt als Repressor der Transkription am Promotor *treRP3* in *E. coli*. Die α CTD-RNA-Polymerase ist für diesen inhibitorischen Effekt erforderlich, so daß eine Wechselwirkung von PhoP und α CTD-RNA-Polymerase vermutet wird (Yamamoto *et al.*, 2002). Ein weiterer Transkriptionsrepressor, von dem vermutet wird, daß er mit der α CTD-RNA-Polymerase wechselwirkt, ist der Repressor IcIR des *aceBAK*-Operons aus *E. coli*. Die Bindung von IcIR an die IcIR-Box I, die nahe der Bindungsregion der α CTD-RNA-Polymerase gelegen ist, führt zur Dissoziation des offenen Transkriptionsinitiationskomplexes. Dadurch folgt eine Repression der Transkription vom *aceB*-Promotor. Die Interaktion von IcIR und der α -CTD-RNA-Polymerase führt vermutlich zur Repression am *aceB*-Promotor (Yamamoto & Ishihama, 2003).

4.8. Simultane Bindung von CopR und der α -CTD-RNA-Polymerase an den Promotor pII

Durch Gelretardierungsversuche konnte gezeigt werden, daß CopR und die α -CTD-RNA-Polymerase simultan an die DNA-Region des Promotors pII binden. Die Bindungsregion der α -CTD-RNA-Polymerase am Promotor pII wurde durch DNase I-Footprinting-Versuche bestimmt. Dabei wurde gezeigt, daß die α -CTD-RNA-Polymerase die unmittelbar stromaufwärts von den CopR-Bindungsstellen gelegene DNA-Region zwischen den Nukleotidpositionen -69 und -87 bedeckt. Diese Region zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an Adeninen und Thyminen aus. Es ist bekannt, daß A-/T-reiche Nukleotidsequenzen, die sich stromaufwärts von der -35-Region von Promotoren befinden (UP-Elemente), als Bindungsstelle der α -CTD-RNA-Polymerase in *E. coli* fungieren (Ross *et al.*, 1993). Meist liegen diese UP-Elemente nur ein oder aber zwei DNA-Helix-Windungen von der -35-Box des Promotors entfernt (Estrem *et al.*, 1999). Der flexible 'linker', der die α -CTD- und die α -NTD-RNA-Polymerase miteinander verbindet, ist jedoch für eine enorme Plastizität der α -CTD-RNA-Polymerase verantwortlich, so daß sie mit der DNA und/oder Regulatorproteinen an verschiedenen gelegenen, stromaufwärts der -35-Box befindlichen DNA-Regionen interagieren kann (Jeon *et al.*, 1997). Der Bindungsort der α -CTD-RNA-Polymerase am Promotor A2b des *B. subtilis* Phagen ϕ 29 liegt

beispielsweise drei helikale DNA-Windungen stromaufwärts von der zugehörigen -35 -Region (Meijer & Salas, 2004).

CopR bindet an die DNA-Region zwischen den Nukleotidpositionen -39 und -65 und somit zwischen den Bindungsstellen der α -CTD-RNA-Polymerase und der anderen Untereinheiten der RNA-Polymerase. Die α -CTD-RNA-Polymerase dient oft als Interaktionspartner für Transkriptionsaktivatoren in *E. coli*, die stromaufwärts der -35 -Region binden. Durch die entstehenden Wechselwirkungen zwischen den Proteinen resultiert eine Aktivierung der Transkription (Hochschild & Dove, 1998). Es ist anzunehmen, daß durch die Interaktion von CopR und der α -CTD-RNA-Polymerase die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor pII überstabilisiert wird und folglich die Bildung eines offenen Initiationskomplexes verhindert wird.

Während die Interaktion von α -CTD-RNA-Polymerase und UP-Elementen in *E. coli* bereits näher charakterisiert wurden (zusammengefaßt in Gourse *et al.*, 2000), ist relativ wenig über UP-Elemente von *B. subtilis* Promotoren bekannt. Es kann jedoch angenommen werden, daß die α -CTD-RNA-Polymerase aus *E. coli* und *B. subtilis* ähnliche DNA-Sequenzen binden, da sich die Protein-Sequenzen bakterieller α -CTD-RNA-Polymerasen durch einen hohen Homologiegrad auszeichnen (Estrem *et al.*, 1998; Meijer & Salas, 2004).

4.9. Weiterführende Experimente

Nachdem durch die Anwendung der SELEX-Technik der CopR-Operator detailliert charakterisiert wurde, eine Inhibition der Bildung eines offenen Transkriptionsinitiationskomplexes am Promotor pII durch CopR und eine Interaktion von CopR mit der α -CTD-RNA-Polymerase nachgewiesen werden konnte, bestünde nun das Interesse darin, einzelne Aminosäuren bzw. Aminosäurebereiche von CopR und der α -CTD-RNA-Polymerase zu detektieren, die an dieser Protein-Protein-Wechselwirkung beteiligt sind. Es ist zu vermuten, daß die in der Wechselwirkung mit der α -CTD-RNA-Polymerase involvierten Aminosäuren von CopR in der Helix I lokalisiert sind. Durch Aminosäureaustauschexperimente könnte der Einfluß einzelner, innerhalb der Helix I von CopR befindlichen Aminosäuren auf die Repression der Transkription vom Promotor pII untersucht werden. Die Interaktion von entsprechend mutierten CopR-Proteinen mit der α -

CTD-RNA-Polymerase könnte z.B. durch Crosslinking-Versuche, Co-Immunopräzipitations- oder 'two-hybrid-system'-Experimente untersucht werden.

Die an der Wechselwirkung mit CopR involvierten Aminosäuren der α -CTD-RNA-Polymerase könnten durch ein Alanin-scanning bestimmt werden. Von den wenigen bakteriellen Transkriptionsrepressoren, von denen bekannt ist, daß eine Wechselwirkung zwischen Repressorprotein und der α -CTD-RNA-Polymerase während der Transkriptionsinitiation erfolgt, wurde lediglich die Interaktion von GalR und der α -CTD-RNA-Polymerase so detailliert untersucht, daß die Aminosäuren der α -CTD-RNA-Polymerase, die an einer Interaktion mit GalR beteiligt sind, bestimmt wurden (Choy *et al.*, 1997).

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wechselwirkung des plasmidkodierten Transkriptionsrepressors CopR mit der DNA untersucht. Durch die Anwendung der SELEX-Technik konnten in vier unterschiedlichen *in vitro*-Selektionsexperimenten die DNA-Basen innerhalb der CopR-Bindungsregion bestimmt werden, die für eine effiziente Bindung von CopR essentiell sind. Die Ergebnisse der SELEX-Experimente zeigten, daß (i) eine überwiegend aus Adeninen und Thyminen zusammengesetzte Nukleotidabfolge zwischen den beiden CopR-Bindungsstellen I und II, (ii) ein Adenin oder Thymin in Position 6 und ein Thymin in Position 7 der *spacer*-Region, (iii) ein Abstand von 7 Basenpaaren zwischen den beiden CopR-Bindungsstellen, (iv) die Basen G240, T241, G242 innerhalb des Bindungsstellen I und G251, A253, C254 des Bindungsstellen II für eine effiziente Bindung von CopR essentiell sind und daß (v) die den CopR-Bindungsstellen unmittelbar benachbarten Basenpaare keinen sequenzspezifischen Einfluß auf die CopR-Bindungsaffinität ausüben.

Durch Gelretardierungsexperimente mit mutierten CopR-Operatorsequenzen wurde die Bedeutung von einzelnen innerhalb der CopR-Bindungsregion befindlichen Basenpaare für die Komplexstabilität bestimmt. Durch *in vitro*-Transkriptionsversuche wurde der Einfluß von einzelnen Mutationen innerhalb der CopR-Operatorregion auf die Repression der Transkription vom Promotor pII untersucht. Die detaillierte Untersuchung der CopR-Bindungsregion ergab, daß die Evolution der Nukleotidsequenz des CopR-Operators am Promotor pII nach maximaler CopR-Bindungsaffinität erfolgte. Ein Vergleich der Cop-Operatorsequenzen der verwandten Plasmide pIP501, pSM19035 und pAM β 1 zeigte, daß während der Evolution in drei verschiedenen Plasmiden identische Cop-Bindungsstellen entstanden.

In dieser Arbeit konnte darüber hinaus durch KMnO₄-Footprinting-Experimente gezeigt werden, daß CopR die Bildung eines offenen Transkriptionsinitiationskomplexes am Promotor pII blockiert. Durch Gelretardierungsversuche wurde eine simultane Bindung von CopR und α -CTD-RNA-Polymerase an die DNA des Promotors pII nachgewiesen. DNase I-Footprinting-Experimente zeigten, daß die α -CTD-RNA-Polymerase die DNA unmittelbar stromaufwärts von der CopR-Bindungsregion bindet. Außerdem konnte durch Glutardialdehyd-Crosslinking-Versuche eine Interaktion von α -CTD-RNA-Polymerase und CopR nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, daß Aminosäuren des C-Terminus der α -CTD-RNA-Polymerase an der Interaktion mit CopR beteiligt sind. Anhand der

Ergebnisse von Deletionsversuchen kann eine Beteiligung des überwiegend aus sauren Aminosäuren bestehenden C-Terminus von CopR an der Interaktion mit der α -CTD-RNA-Polymerase ausgeschlossen werden. Vermutlich wird durch die Interaktion von CopR und der α -CTD-RNA-Polymerase die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor pII überstabilisiert und folglich die Bildung eines offenen Transkriptionsinitiationskomplexes verhindert.

CopR gehört somit zu den wenigen gut charakterisierten Transkriptionsregulatorproteinen aus grampositiven Bakterien. Die Mehrheit der intensiv untersuchten Transkriptionsrepressoren bzw. -aktivatoren stammt aus *E. coli* oder aber aus *E. coli* infizierenden Bakteriophagen. Außerdem sind bisher nur wenige Beispiele für an der Plasmidkopiezahlregulation beteiligte Transkriptionsrepressoren beschrieben worden. Neben dem vom Streptokokkenplasmid pLS1 kodierten CopG stellt CopR das am intensivsten untersuchte Regulationsprotein dar. Mit den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen stellt CopR das bisher einzige an der Regulation der Plasmidkopiezahl beteiligte Protein dar, für das Daten zur Aufklärung des Repressionsmechanismus vorliegen. Bis jetzt gibt es zudem wenige Kenntnisse über Protein-Protein-Interaktionen zwischen der RNA-Polymerase und Repressoren. Interaktionen zwischen der α -CTD-RNA-Polymerase und Transkriptionsrepressoren wurden bisher nur für wenige Proteine wie für das Protein p4 des Phagen ϕ 29 (Monsalve *et al.*, 1996), PhoP (Yamamoto *et al.*, 2002) sowie IcIR (Yamamoto & Ishihama, 2003) und GalR aus *E. coli* (Choy *et al.*, 1995, Roy *et al.*, 2004) vermutet.

6. Literaturverzeichnis

Andreola ML, Pileur F, Calmels C, Ventura M, Tarrago-Litvak L, Toulme JJ, Litvak S. (2001). DNA aptamers selected against the HIV-1 RNase H display in vitro antiviral activity. *Biochemistry*. Aug 28;40(34):10087-94.

Behnke D, Malke H, Hartmann M, Walter F. (1979). Post-transformational rearrangement of an in vitro reconstructed group-A streptococcal erythromycin resistance plasmid. *Plasmid*. Oct;2(4):605-16.

Bertrand-Burggraf E, Hurstel S, Daune M, Schnarr M. (1987). Promoter properties and negative regulation of the *uvrA* gene by the LexA repressor and its amino-terminal DNA binding domain. *J Mol Biol*. Jan 20;193(2):293-302.

Bianchi A, Stansel RM, Fairall L, Griffith JD, Rhodes D, de Lange T. (1999). TRF1 binds a bipartite telomeric site with extreme spatial flexibility. *EMBO J*. Oct 15;18(20):5735-44.

Blatter EE, Ross W, Tang H, Gourse RL, Ebright RH. (1994). Domain organization of RNA polymerase alpha subunit: C-terminal 85 amino acids constitute a domain capable of dimerization and DNA binding. *Cell*. Sep 9;78(5):889-96.

Blomberg P, Nordstrom K, Wagner EG. (1992). Replication control of plasmid R1: RepA synthesis is regulated by CopA RNA through inhibition of leader peptide translation. *EMBO J*. Jul;11(7):2675-83

Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. May 7;72:248-54.

Brantl S, Behnke D. (1992a). Copy number control of the streptococcal plasmid pIP501 occurs at three levels. *Nucleic Acids Res*. Feb 11;20(3):395-400.

Brantl S, Behnke D. (1992b). The amount of RepR protein determines the copy number of plasmid pIP501 in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*. Aug;174(16):5475-8.

- Brantl S, Birch-Hirschfeld E, Behnke D. (1993). RepR protein expression on plasmid pIP501 is controlled by an antisense RNA-mediated transcription attenuation mechanism. *J Bacteriol.* Jul;175(13):4052-61.
- Brantl S, Wagner EG. (1994). Antisense RNA-mediated transcriptional attenuation occurs faster than stable antisense/target RNA pairing: an in vitro study of plasmid pIP501. *EMBO J.* Aug 1;13(15):3599-607.
- Brantl S, Wagner EG. (1997). Dual function of the copR gene product of plasmid pIP501. *J Bacteriol.* Nov;179(22):7016-24.
- Brantl S. (1994). The copR gene product of plasmid pIP501 acts as a transcriptional repressor at the essential repR promoter. *Mol Microbiol.* Nov;14(3):473-83.
- Brantl S. (2002). Antisense RNAs in plasmids: control of replication and maintenance. *Plasmid.* Nov;48(2002):165-173.
- Brown, N. L., Stoyanov, J. V., Kidd, S. P. & Hobman, J. L. (2003). The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 145-163
- Browning DF, Busby SJ. (2004). The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Microbiol.* Jan;2(1):57-65.
- Busby S, Ebright RH. (1997). Transcription activation at class II CAP-dependent promoters. *Mol Microbiol.* Mar;23(5):853-9.
- Busby S, Ebright RH. (1999). Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J Mol Biol.* Oct 22;293(2):199-213.
- Camacho A, Salas M. (2001). Repression of bacteriophage phi 29 early promoter C2 by viral protein p6 is due to impairment of closed complex. *J Biol Chem.* Aug 3;276(31):28927-32.

Ceglowski P, Lurz R, Alonso JC. (1993). Functional analysis of pSM19035-derived replicons in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett.* May 15;109(2-3):145-50.

Choy HE, Park SW, Aki T, Parrack P, Fujita N, Ishihama A, Adhya S (1995). Repression and activation of transcription by Gal and Lac repressors: involvement of alpha subunit of RNA polymerase. *EMBO J.* Sep 15;14(18):4523-9.

Choy HE, Hanger RR, Aki T, Mahoney M, Murakami K, Ishihama A, Adhya S. (1997). Repression and activation of promoter-bound RNA polymerase activity by Gal repressor. *J Mol Biol.* Sep 26;272(3):293-300.

Clewell DB, Yagi Y, Dunny GM, Schultz SK. (1974). Characterization of three plasmid deoxyribonucleic acid molecules in a strain of *Streptococcus faecalis*: identification of a plasmid determining erythromycin resistance. *J Bacteriol.* Jan;117(1):283-9.

Cortay JC, Negre D, Galinier A, Duclos B, Perriere G, Cozzone AJ. (1991). Regulation of the acetate operon in *Escherichia coli*: purification and functional characterization of the IclR repressor. *EMBO J.* Mar;10(3):675-9.

Costa M, Sola M, del Solar G, Eritja R, Hernandez-Arriaga AM, Espinoza M, Gomis-Rüth FX, CollM. (2001). Plasmid transcriptional repressor CopG oligomerises to render helical superstructures unbound and in complexes with oligonucleotides. *J Mol Biol.* Jul 6;310(2):403-17

Cui Y, Wang Q, Stormo GD, Calvo JM. (1995). A consensus sequence for binding of Lrp to DNA. *J Bacteriol.* Sep;177(17):4872-80.

Dame RT, Wyman C, Wurm R, Wagner R, Goosen N. (2002). Structural basis for H-NS-mediated trapping of RNA polymerase in the open initiation complex at the *rrnB* P1. *J Biol Chem.* Jan 18;277(3):2146-50.

Ebright, RH. (1993). Transcription activation at Class I CAP-dependent promoters. *Mol. Microbiol.* 43, 355-370.

Ellington AD, Szostak JW. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*. Aug 30;346(6287):818-22.

Emmerich R, Strehler P, Hennecke H, Fischer HM. (2000). An imperfect inverted repeat is critical for DNA binding of the response regulator RegR of *Bradyrhizobium japonicum*. *Nucleic Acids Res*. Nov 1;28(21):4166-71.

Estrem ST, Ross W, Gaal T, Chen ZW, Niu W, Ebright RH, Gourse RL (1999). Bacterial promoter architecture: subsite structure of UP elements and interactions with the carboxy-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit. *Genes Dev*. Aug 15;13(16):2134-47.

Estrem ST, Gaal T, Ross W, Gourse RL. (1998). Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 18;95(17):9761-6.

Freede P, Brantl S. (2004). Transcriptional Repressor CopR: use of SELEX to study the copR operator indicates that evolution was directed at maximal binding affinity. *J Bacteriol*. Sep;186(18):6254-64.

Gomis-Rüth FX, Sola M, Acebo P, Parraga A, Guasch A, Eritja R, Gonzalez A, EspinosaM, del Solar G, Coll M. (1998). The structure of plasmid-encoded transcriptional repressor CopG unliganded and bound to its operator. *EMBO J*. 1998 Dec 15;17(24):7404-15

Goodman SD, Velten NJ, Gao Q, Robinson S, Segall AM. (1999). In vitro selection of integration host factor binding sites. *J Bacteriol*. May;181(10):3246-55.

Gourse RL, Ross W, Gaal T. (2000). UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition. *Mol Microbiol*. Aug;37(4):687-95.

Greene EA, Spiegelman GB. (1996). The Spo0A protein of *Bacillus subtilis* inhibits transcription of the *abrB* gene without preventing binding of the polymerase to the promoter. *J Biol Chem.* May 10;271(19):11455-61.

Gui L, Sunnarborg A, Pan B, LaPorte DC. (1996). Autoregulation of *iclR*, the gene encoding the repressor of the glyoxylate bypass operon. *J Bacteriol.* Jan;178(1):321-4.

Hawley DK, Johnson AD, McClure WR. (1985). Functional and physical characterization of transcription initiation complexes in the bacteriophage lambda OR region. *J Biol Chem.* Jul 15;260(14):8618-26.

He YY, Stockley PG, Gold L. (1996). In vitro evolution of the DNA binding sites of *Escherichia coli* methionine repressor, MetJ. *J Mol Biol.* Jan 12;255(1):55-66.

Heltzel A, Lee IW, Totis PA, Summers AO. (1990). Activator-dependent preinduction binding of sigma-70 RNA polymerase at the metal-regulated *mer* promoter. *Biochemistry.* Oct 16;29(41):9572-84.

Hochschild A, Dove SL. (1998). Protein-protein contacts that activate and repress prokaryotic transcription. *Cell.* Mar 6;92(5):597-600.

Horodniceanu T, Bouanchaud DH, Bieth G, Chabbert YA. (1976). R plasmids in *Streptococcus agalactiae* (group B). *Antimicrob Agents Chemother.* Nov;10(5):795-801.

Huffman JL, Brennan RG. (2002). Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix-turn-helix motif. *Curr Opin Struct Biol.* Feb;12(1):98-106.

Igarashi K, Ishihama A. (1991). Bipartite functional map of the *E. coli* RNA polymerase alpha subunit: involvement of the C-terminal region in transcription activation by cAMP-CRP. *Cell.* Jun 14;65(6):1015-22.

Jackson L, Blake T, Green J. (2004). Regulation of *ndh* expression in *Escherichia coli* by Fis. *Microbiology.* Feb;150(Pt 2):407-13.

Jeon YH, Yamazaki T, Otomo T, Ishihama A, Kyogoku Y. (1997). Flexible linker in the RNA polymerase alpha subunit facilitates the independent motion of the C-terminal activator contact domain. *J Mol Biol.* Apr 11;267(4):953-62.

Joyce GF. (1994). In vitro evolution of nucleic acids. *Curr Opin Struct Biol.*4:331-6.

Kuhn K, Steinmetzer K, Brantl S. (2001). Transcriptional repressor CopR: dissection of stabilizing motifs within the C terminus. *Microbiology.* Dec;147(Pt 12):3387-92.

Kuhn K, Steinmetzer K, Brantl S. (2000). Transcriptional repressor CopR: the structured acidic C terminus is important for protein stability. *J Mol Biol.* Jul 28;300(5):1021-31.

Le Chatelier E, Ehrlich SD, Janniere L. (1994). The pAM beta 1 CopF repressor regulates plasmid copy number by controlling transcription of the repE gene. *Mol Microbiol.* Nov;14(3):463-71.

Lewis DE, Adhya S. (2002). In vitro repression of the gal promoters by GalR and HU depends on the proper helical phasing of the two operators. *J Biol Chem.* 2002 Jan 25;277(4):2498-504.

Light J, Molin S. (1982). The sites of action of the two copy number control functions of plasmid R1. *Mol Gen Genet.*;187(3):486-93.

Martinez-Antonio A, Collado-Vides J. (2003). Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Curr Opin Microbiol.* Oct;6(5):482-9.

Meccas J, Cowing DW, Gross CA. (1991). Development of RNA polymerase-promoter contacts during open complex formation. *J Mol Biol.* Aug 5;220(3):585-97.

Meijer WJ, Salas M. (2004). Relevance of UP elements for three strong *Bacillus subtilis* phage phi29 promoters. *Nucleic Acids Res.* Feb 18;32(3):1166-76.

- Monsalve M, Calles B, Mencia M, Rojo F, Salas M. (1998). Binding of phage phi29 protein p4 to the early A2c promoter: recruitment of a repressor by the RNA polymerase. *J Mol Biol.* Oct 30;283(3):559-69.
- Monsalve M, Mencia M, Salas M, Rojo F. (1996). Protein p4 represses phage phi 29 A2c promoter by interacting with the alpha subunit of Bacillus subtilis RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 20;93(17):8913-8.
- Murakami KS, Masuda S, Campbell EA, Muzzin O, Darst SA. (2002). Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. *Science.* May 17;296(5571):1285-90.
- Negre D, Cortay JC, Galinier A, Sauve P, Cozzone AJ. (1992). Specific interactions between the IclR repressor of the acetate operon of Escherichia coli and its operator. *J Mol Biol.* Nov 5;228(1):23-9.
- Nickels BE, Dove SL, Murakami KS, Darst SA, Hochschild A. (2002). Protein-protein and protein-DNA interactions of sigma70 region 4 involved in transcription activation by lambdaCI. *J Mol Biol.* Nov 15;324(1):17-34.
- Perez-Rueda E, Collado-Vides J. (2000). The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in Escherichia coli K-12. *Nucleic Acids Res.* Apr 15;28(8):1838-47.
- Pittard J, Camakaris H, Yang J. (2005). The TyrR regulon. *Mol Microbiol.* Jan;55(1):16-26.
- Riise E, Molin S. (1986). Purification and characterization of the CopB replication control protein, and precise mapping of its target site in the R1 plasmid. *Plasmid.* May;15(3):163-71.
- Robertson DL, Joyce GF. (1990). Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature.* Mar 29;344(6265):467-8.

Rojo F, Salas M.A (1991). DNA curvature can substitute phage phi 29 regulatory protein p4 when acting as a transcriptional repressor. *EMBO J.* Nov;10(11):3429-38.

Rojo F. (1999). Repression of transcription initiation in bacteria. *J Bacteriol.* May;181(10):2987-91.

Ross W, Gosink KK, Salomon J, Igarashi K, Zou C, Ishihama A, Severinov K, Gourse RL. (1993). A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. *Science.* Nov 26;262(5138):1407-13.

Roy S, Semsey S, Liu M, Gussin GN, Adhya S. (2004). GalR represses galP1 by inhibiting the rate-determining open complex formation through RNA polymerase contact: a GalR negative control mutant. *J Mol Biol.* Nov 26;344(3):609-18.

Sambrook J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sanderson A, Mitchell JE, Minchin SD, Busby SJ. (2003). Substitutions in the Escherichia coli RNA polymerase sigma70 factor that affect recognition of extended -10 elements at promoters. *FEBS Lett.* Jun 5;544(1-3):199-205.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology.* 1992;24:104-8.

Sasse-Dwight S, Gralla JD. (1991). Footprinting protein-DNA complexes in vivo. *Methods Enzymol.*;208:146-68.

Schlax PJ, Capp MW, Record MT Jr. (1995). Inhibition of transcription initiation by lac repressor. *J Mol Biol.* Jan 27;245(4):331-50.

Schröder O, Wagner R. (2000). The bacterial DNA-binding protein H-NS represses ribosomal RNA transcription by trapping RNA polymerase in the initiation complex. *J Mol Biol.* May 19;298(5):737-48.

- Shin M, Kang S, Hyun SJ, Fujita N, Ishihama A, Valentin-Hansen P, Choy HE. (2001). Repression of deoP2 in *Escherichia coli* by CytR: conversion of a transcription activator into a repressor. *EMBO J.* Oct 1;20(19):5392-9.
- Silbaq FS, Ruttenberg SE, Stormo GD. (2002). Specificity of Mnt 'master residue' obtained from in vivo and in vitro selections. *Nucleic Acids Res.* Dec 15;30(24):5539-48.
- Smith TL, Sauer RT. (1996). Dual regulation of open-complex formation and promoter clearance by Arc explains a novel repressor to activator switch. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 20;93(17):8868-72.
- del Solar G, Espinosa M. (1992). The copy number of plasmid pLS1 is regulated by two trans-acting plasmid products: the antisense RNA II and the repressor protein, RepA. *Mol Microbiol.* Jan;6(1):83-94
- del Solar G, Acebo P, Espinosa M. (1995). Replication control of plasmid pLS1: efficient regulation of plasmid copy number is exerted by the combined action of two plasmid components, CopG and RNA II. *Mol Microbiol.* Dec;18(5):913-24
- del Solar G, Espinosa M. (2000). Plasmid copy number control: an ever-growing story. *Mol Microbiol.* Aug;37(3), 492-500.
- Spassky A, Kirkegaard K, Buc H. (1985). Changes in the DNA structure of the lac UV5 promoter during formation of an open complex with *Escherichia coli* RNA polymerase. *Biochemistry.* May 21;24(11):2723-31.
- Steinmetzer K, Behlke J, Brantl S, Lorenz M. (2002). CopR binds and bends its target DNA: a footprinting and fluorescence resonance energy transfer study. *Nucleic Acids Res.* May 1;30(9):2052-60.
- Steinmetzer K, Behlke J, Brantl S. (1998). Plasmid pIP501 encoded transcriptional repressor CopR binds to its target DNA as a dimer. *J Mol Biol.* Oct 30;283(3):595-603.

Steinmetzer K, Brantl S. (1997). Plasmid pIP501 encoded transcriptional repressor CopR binds asymmetrically at two consecutive major grooves of the DNA. *J Mol Biol.* Jun 27;269(5):684-93.

Steinmetzer K, Hillisch A, Behlke J, Brantl S. (2000a). Transcriptional repressor CopR: structure model-based localization of the deoxyribonucleic acid binding motif. *Proteins.* Mar 1;38(4):393-406.

Steinmetzer K, Hillisch A, Behlke J, Brantl S. (2000b). Transcriptional repressor CopR: amino acids involved in forming the dimeric interface. *Proteins.* Jun 1;39(4):408-16.

Sunnarborg A, Klumpp D, Chung T, LaPorte DC. (1990). Regulation of the glyoxylate bypass operon: cloning and characterization of iclR. *J Bacteriol.* May;172(5):2642-9.

Swinfield TJ, Oultram JD, Thompson DE, Brehm JK, Minton NP. (1990). Physical characterisation of the replication region of the *Streptococcus faecalis* plasmid pAM beta 1. *Gene.* Mar 1;87(1):79-90.

Tapias A, Fernandez S, Alonso JC, Barbe J. (2002). *Rhodobacter sphaeroides* LexA has dual activity: optimising and repressing recA gene transcription. *Nucleic Acids Res.* Apr 1;30(7):1539-46.

Tuerk, C., and L. Gold. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249:505-510.

Valentin-Hansen P, Sogaard-Andersen L, Pedersen H. (1996). A flexible partnership: the CytR anti-activator and the cAMP-CRP activator protein, comrades in transcription control. *Mol Microbiol.* May;20(3):461-6.

Wen JD, Gray DM. (2002) The Ff gene 5 single-stranded DNA-binding protein binds to the transiently folded form of an intramolecular G-quadruplex. *Biochemistry.* Sep 24;41(38):11438-48.

Williams DR, Motallebi-Veshareh M, Thomas CM. (1993). Multifunctional repressor KorB can block transcription by preventing isomerization of RNA polymerase-promoter complexes. *Nucleic Acids Res.* Mar 11;21(5):1141-8.

Wilson DS, Szostak JW. (1999). In vitro selection of functional nucleic acids. *Annu Rev Biochem.* 68:611-47.

Wintjens R, Rooman M. (1996). Structural classification of HTH DNA-binding domains and protein-DNA interaction modes. *J Mol Biol.* Sep 20;262(2):294-313.

Xu J, Koudelka GB. (2001). Repression of transcription initiation at 434 P(R) by 434 repressor: effects on transition of a closed to an open promoter complex. *J Mol Biol.* Jun 8;309(3):573-87.

Yamamoto K, Ishihama A. (2003). Two different modes of transcription repression of the Escherichia coli acetate operon by IclR. *Mol Microbiol.* Jan;47(1):183-94.

Yang J, Wang P, Pittard AJ. (1999). Mechanism of repression of the aroP P2 promoter by the TyrR protein of Escherichia coli. *J Bacteriol.* Oct;181(20):6411-8.

Yang J, Camakaris H, Pittard J. (2002). Molecular analysis of tyrosine-and phenylalanine-mediated repression of the tyrB promoter by the TyrR protein of Escherichia coli. *Mol Microbiol.* Sep;45(5):1407-19.

Yang J, Hwang JS, Camakaris H, Irawaty W, Ishihama A, Pittard J. (2004). Mode of action of the TyrR protein: repression and activation of the tyrP promoter of Escherichia coli. *Mol Microbiol.* Apr;52(1):243-56.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
C	Cytosin
CD	Circulardichroismus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
G	Guanin
HS	high-salt-Puffer
HTH-Motiv	Helix-Turn-Helix-Motiv
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
IR	inverted repeat
kDa	Kilodalton
KMnO ₄	Kaliumpermanganat
nt	Nukleotide
OD	Extinktion
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNAP	RNA-Polymerase
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SELEX	systematic evolution of ligands by exponential enrichment
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylethylendiamid

Anhang

Freede P, Brantl S. (2004).: Transcriptional Repressor CopR: use of SELEX to study the copR operator indicates that evolution was directed at maximal binding affinity. *J Bacteriol. Sep*;186(18):6254-64.

Transcriptional Repressor CopR: Use of SELEX To Study the *copR* Operator Indicates that Evolution Was Directed at Maximal Binding Affinity

Peggy Freede and Sabine Brantl*

Biologisch-Pharmazeutische Fakultät, AG Bakteriengenetik, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena, Germany

Received 27 April 2004/Accepted 18 June 2004

CopR is one of the two copy number control elements of the streptococcal plasmid pIP501. It represses transcription of the *repR* mRNA encoding the essential replication initiator protein about 10- to 20-fold by binding to its operator region upstream of the *repR* promoter pII. CopR binds at two consecutive sites in the major groove of the DNA that share the consensus motif 5'-CGTG. Previously, the minimal operator was narrowed down to 17 bp, and equilibrium dissociation constants for DNA binding and dimerization were determined to be 0.4 nM and 1.4 μ M, respectively. In this work, we used a SELEX procedure to study *copR* operator sequences of different lengths in combination with electrophoretic mobility shift assays of mutated *copR* operators as well as copy number determinations to assess the sequence requirements for CopR binding. The results suggest that in vivo evolution was directed at maximal binding affinity. Three simultaneous nucleotide exchanges outside the bases directly contacted by CopR only slightly affected CopR binding in vitro or copy numbers in vivo. Furthermore, the optimal spacer sequence was found to comprise 7 bp, to be AT rich, and to need an A/T and a T at the 3' positions, whereas broad variations in the sequences flanking the minimal 17-bp operator were well tolerated.

Replication of the streptococcal plasmid pIP501 is regulated by two components that act in concert: the transcriptional repressor CopR (10.6 kDa) and the antisense RNA RNAIII (136 nucleotides [nt]) (5). Whereas RNAIII exerts its inhibitory effect by premature termination (attenuation) of the essential *repR* mRNA (6, 8), CopR has a dual function. On the one hand, it represses transcription from the essential *repR* promoter pII about 10- to 20-fold (7); on the other hand, it prevents convergent transcription from pII and pIII (antisense promoter), thereby indirectly increasing transcription initiation at pIII (9). Previously, it was found that CopR contacts the DNA asymmetrically at two consecutive major grooves that share the consensus motif 5'-CGTG (28). Thus, the outermost G residues were found to be most important for CopR binding, whereas exchanges of nucleotides adjacent (3') to the CGTG motif only slightly altered DNA binding. The operator sequence was narrowed down to 17 bp. Furthermore, it was found that CopR binds exclusively as a dimer, and the equilibrium dissociation constants for the CopR dimers and the CopR-DNA complex were calculated to be 0.4 nM and 1.4 μ M, respectively (29). A three-dimensional model of the N-terminal 63 amino acids of CopR was built and was used to identify amino acids involved in DNA binding and dimerization (30, 31, 32). By this means, it was found that amino acids R29 and R34, located in the recognition helix (helix III) of the helix-turn-helix motif, make specific contacts to the DNA at G240 (binding site I) and G254 (binding site II) or G242/T243 (site I) and G251 (site II), respectively. Water-mediated contacts were suggested for E35 interacting with the outermost C

residues in both binding sites. Unspecific DNA contacts via the sugar-phosphate backbone were proposed for K10 in α -helix I and S28 in the recognition helix (30). Furthermore, it was established that the structured acidic C terminus of CopR that forms a β -strand is necessary for stabilization of the protein (22, 23). A fluorescence energy study revealed that CopR bends the operator DNA slightly (20 to 25°) upon binding, and it was proposed that two pyrimidine-purine dinucleotide steps in the operator sequence that are separated by one helical turn are required for bendability (33). With all these data on hand, we asked whether the *copR* operator found in nature (on plasmid pIP501) was optimized for strong DNA binding or whether it would be possible to find an operator that is bound more efficiently by CopR and, if so, how such an operator would function in copy number control in vivo.

In 1990, the SELEX procedure was developed independently by two laboratories (13, 36). This procedure uses randomized sequences (DNA or RNA) to select for different criteria, like binding of certain proteins or small metabolites or the ability to perform enzymatic reactions, followed by PCR amplification and further rounds of selection. SELEX not only yielded impressive results that supported the RNA world hypothesis, e.g., selection of RNA molecules that were able to carry out templated RNA polymerization (21) or amino acylation of tRNAs (24) or selection of high-affinity RNA ligands to parasite target molecules (18), but was also employed successfully to study a broad variety of protein-DNA interactions. Examples of the uses of SELEX include the in vitro selection of binding sites for the *Escherichia coli* *trp* repressor (12), methionine repressor MetJ (19), integration host factor (IHF) (17), a response regulator of *Bradyrhizobium japonicum* (14), and bacteriophage Ff gene 5 protein, a single-strand binding protein (37). Consensus sequences for a UP element for bacterial promoters (15) or for embryonic heat shock factor 2 (25)

* Corresponding author. Mailing address: Friedrich-Schiller-Universität Jena, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät, AG Bakteriengenetik, Hans-Knoll-Str. 2, Jena D-07745, Germany. Phone 49-3641-657507. Fax: 49-3641-657520. E-mail: Sabine.Brantl@rz.uni-jena.de.

were defined. Furthermore, sequence requirements for efficient termination of conjugation in the *oriT* gene of *E. coli* plasmid R1162 were determined (2), and the promoter discrimination between σ^s and σ^{70} RNA polymerases of *E. coli* was investigated (16). SELEX revealed an unusual DNA binding mode for TRF1, a key player of telomere length regulation (3). In the case of proteins that do not seem to recognize strongly defined consensus sequences, like topoisomerase II, in vitro evolution identified preferred DNA cleavage sites (10). Additionally, SELEX was used for applicative purposes like the selection of DNA aptamers against human immunodeficiency virus type 1 RNase H that display in vitro antiviral activity (1). All these examples demonstrate the power of in vitro selection for the analysis of DNA-protein interactions.

To answer the questions mentioned above, we applied the SELEX procedure with *copR* operator sequences of different lengths in combination with electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) with mutated operator fragments, copy number determinations, and in vitro transcription. Our results demonstrate that in vivo evolution of the *copR* operator sequence was directed at maximal binding affinity. Furthermore, we defined sequence and length requirements for the spacer and regions adjacent to the two binding sites.

MATERIALS AND METHODS

DNA preparation, manipulation, and copy number determination. Plasmid DNA was isolated from *Bacillus subtilis* as reported previously (5). DNA manipulations such as restriction enzyme cleavage and ligation were carried out under the conditions specified by the manufacturer or according to standard protocols (26). A PCR kit from Roche was used for PCR amplifications. DNA sequencing was performed according to the dideoxy chain termination method (27) with a Sequenase kit from Amersham Bioscience. Copy numbers of pIP501 derivatives in *B. subtilis* were determined as described previously (5), except that gel photographs were scanned and band intensities were quantified with the PCBAS 2.0 program.

Construction of *E. coli*-*B. subtilis* shuttle vectors containing mutations in the *copR* operator. Plasmid pPRC333 containing the wild-type *copR* operator region was constructed as follows. First, a PstI site was created at position 582 (4) to facilitate the subsequent construction of mutations in the leader region; a BamHI/PstI fragment spanning nt 160 to 582 was obtained by PCR on pPR1 as a template by using the primer combinations shown below and inserted into the pUC19 BamHI/PstI vector, resulting in plasmid pUC333. The BamHI/PstI fragment of plasmid pUC333 and the PstI/EcoRI fragment of plasmid pUCR3 (20) were jointly cloned into the pPR4 BamHI/EcoRI vector (5), yielding plasmid pPRP333. Subsequently, the *copR* gene was inserted as a 549-bp EcoRI fragment derived from plasmid pCOP1B2 (7) into the unique EcoRI site of plasmid pPRP333, and the plasmid containing *copR* in the same direction as the *repR* gene was designated pPRC333. All PCR-generated fragments were confirmed by sequencing.

Mutated operator sequences were constructed by the same procedure using the following primers in combination with primer SB214 (5'-TAG AAG CTA CGA TCA AAG TTG AA); pPRC333-SB333 (5'-AATTGGATCCGATTTTCGTG TGAATAATGCA), pPRC334-SB334 (5'-AATTGGATCCGATTTTCGTGCGAA TAATGCACGAAATCATT), pPRC221-SB221 (5'-AATTGGATCCAAAAGCA ATGATTTTCGTGTCCTCCCGACGAAATCATTGCTTAT), pPRC222-SB222 (5'-AATTGGATCCAAAAGCAATGATTTTCGTGTGAAAAAAGCACGAAA TCATTGCTTAT), pPRC227-SB227 (5'-AATTGGATCCGATTTTCGTGTGAAA AATGCACGAAATCATTGCTTAT), pPRC228-SB228 (5'-AATTGGATCCGA TTTTCGTGTGAAATTAATGCACGAAATCATTGCTT), pPRC292-SB292 (5'-AA TTGGATCCGATTTTCGTGTGGGGGGCACGAAATCATTGCTTAT), pPRC2 94-SB294 (5'-AATTGGATCCGATTTTCGTGTGAAATAATACAGAAATCA TTGCTTAT), and pPRC416-SB416 (5'-AATTGGATCCGATTTTCGTGCATGT ATTGCACGAAATCATTGCTTATTTT).

Construction of *lacZ* fusion vectors and determination of β -galactosidase activity. Plasmids pUC333 (wild type), pUC334 (symmetric operator), and pUC221 (spacer with 7C) were used for the isolation of EcoRI/HindIII blunt fragments comprising promoter pII with the upstream *copR* operator region,

promoter pIII, attenuator, and 130 bp downstream (Table 1). These fragments were inserted into the EcoRI/BamHI blunt vector pAC6 (34) to generate transcriptional fusions with the promoterless *lacZ* gene. The resulting vectors, pAC333, pAC334, and pAC221, were linearized with ScaI, and the corresponding *lacZ* fusions were integrated into the *amyE* locus of the *B. subtilis* chromosome of strain DB104 by double crossover. To provide CopR in *trans*, the corresponding integrant strains were transformed with plasmid pCOP9 (5), and Cm^r Pm^r transformants were selected. These strains were used for the determination of β -galactosidase activity as described previously (7).

Construction of vector pBTYC11 for overexpression and purification of native CopR. A promoterless *copR* gene generated by PCR with primers SB203 (5'-GGT GGT TGC TCT TCC AAC ATG GAA CT GCA TTT AGA GAA) and C-951-30 (5'-GAA TTC CTG CAG TCA CAC GAA ATC ATT GCT) on plasmid pCOP7C as a template and subsequently digested with SapI and PstI was inserted into vector pTYB11 (New England Biolabs) digested with the same pair of enzymes. *E. coli* strain TG1 was used for transformation of the ligation mixture, and Amp^r transformants were screened for the presence of recombinant pTYB11. The resulting vector was designated pTYBC11, and the inserted *copR* gene was confirmed by sequencing. In pTYBC11, the N-terminal codons of CopR are fused to the intein tag and hence the C-terminal codons of the chitin binding domain. Expression strain ER2566 (IMPACT-CN protein purification system; New England Biolabs) was transformed with pTYBC11 and used for the overexpression of native CopR.

Preparation of labeled wild-type and mutant CopR targets. Oligodeoxyribonucleotides listed in Table 6 were 5' end labeled with [γ -³²P]ATP (26) and purified from 8% denaturing polyacrylamide gels. Double-stranded CopR targets were generated in a Klenow reaction with oligodeoxyribonucleotide SB176 (5'-CCC CTT AAA AAA ATA AGC) and, in the case of SB414, SB417, and SB418, oligodeoxyribonucleotide SB415 (5'-TCGCTGAACATTCGATCTA) as primers.

Overexpression and purification of His₆ CopR and native CopR. Plasmid pQEC1 was used for overexpression and purification of His₆ CopR as described previously (28, 29). For the preparation of native CopR, strain ER2566 (pTYBC11) was used. After induction with IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) at an optical density at 560 nm of 1.0, the strain was grown at 12°C overnight until an optical density at 560 nm of 1.8 to 1.9 was reached, to prevent the accumulation of insoluble protein. Afterwards, cells were pelleted and sonicated. The supernatant was centrifuged at 4°C for 10 min at 13,000 rpm in a Beckman J2-21M centrifuge, bound with chitin for 40 min at 4°C with constant stirring, and subsequently filled into a column. After two washing steps, self-cleavage of the fusion proteins by the intein domain was induced by the addition of 50 mM dithiothreitol in a buffer containing 500 mM NaCl and 20 mM Tris-HCl (pH 9.0) and incubation at room temperature for 16 h. Afterwards, the native CopR protein was eluted with 500 mM NaCl and 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), and the first two 250- μ l fractions containing native CopR were stored with glycerol (final concentration, 50%) at -20°C.

CopR-DNA binding reaction and band shift assay. Binding reactions were performed in a final volume of 20 μ l containing 0.5 \times Tris-borate-EDTA (TBE) buffer (pH 8.0), 0.9 nM of end-labeled DNA fragment, and 3 to 150 nM His₆ CopR. Herring sperm DNA (0.1 μ g/ μ l) was added as a nonspecific competitor. After incubation at 30°C for 30 min, the reaction mixtures were separated on 8% native polyacrylamide gel runs at room temperature for 1.5 h (16 V/cm) in 0.5 \times TBE buffer. Visualization and quantification of the bands were performed on a Fuji PhosphorImager. In some cases, 75 mM NaCl was included in the reaction mixture, the gel, and the electrophoresis buffer.

In vitro selection (SELEX) procedure. To generate double-stranded templates for SELEX I, SELEX II, and SELEX IV, between 8 and 333 pmol of the following 61-bp oligodeoxyribonucleotides containing random sequences flanked by fixed regions were used as templates in a primer extension reaction employing an 18-bp primer, SB179 (5' GAT GCA TGG ATC CAT GAT), complementary to the 3' end of randomized DNA pools: SB206 (I) [5'-ACAGGAAACAGCT ATGACCATGATTACGCCGATGGAATTCAGCTTAATGATTTTCGTGT (N₂)GCACGAAATCATGGATCCATGCATCACTGGCCGTCGTTTTACAA CGTC-GTGACTG], SB265 (II) [5'-ACAGGAAACAGCTATGACCATGATT ACGCCGATGGAATTCAGCTTAATGATTT(N₁₇)AAATCATGGATGCCA TGATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTG], SB369 (III) [5'-T ACGGTAACCTGGACTGCATAACGATGCATTTGACTCATTCAGCTTC ATCCATA(N₃₀)TAGTCGTGGATCCTTGACATGACAGGATGTAGTCA TAAGCATTGACAA], and SB330 (IV) [5'-ACAGGAAACAGCTATGACC ATGATTACGCCGATGGAATTCAGCTTAAT(N₅)CGTGTGAAATAATG CACG(N₅)ATGGATCCATGCATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTC-G TGACTG].

For construction of the double-stranded randomized DNA pool for SELEX

TABLE 1. Plasmids used in this study

Plasmid	Description ^a	Reference or Source
pUC19	<i>E. coli</i> cloning vector; Ap ^r ; MCS	26
pPR1	Shuttle vector; pIP501 derivative; Ap ^r Pm ^r	5
pCOP9	pPR1 derivative with <i>copR</i> gene and defect in pIII	5
pCOP1B2	pPR1 with <i>copR</i> gene downstream from <i>oriR</i> ; Pm ^r	7
pUCR3	pUC19 derivative comprising the pUCR1 PstI/Hind fragment and the pPR1 EcoRI/HindIII fragment	20
pTYB11	Vector for expression of N-terminal fusion protein with chitin binding domain and intein tag; Amp ^r	New England Biolabs
pTYBC11	pTYB11 with <i>copR</i> gene as SapI/PstI fragment	This study
pUC333	pUC19 derivative comprising nt 229–580 of the pIP501 replicon as BamHI/PstI fragment	This study
pUC334	As pUC333, but with T243C	This study
pUC221	As pUC333, but with 7C spacer	This study
pUC222	As pUC333, but with 7A spacer	This study
pUC292	As pUC333, but with 7G spacer	This study
pUC294	As pUC333, but with G512A	This study
pUC227	As pUC333, but with T247A	This study
pUC228	As pUC333, but with 8-bp spacer	This study
pUC416	As pUC333, but with C239T, T243C, C252G	This study
pPRP333	pPR4 derivative carrying the pUC333 BamHI/PstI fragment and the pUCR3 PstI/EcoRI fragment	This study
pPRC333	pPRP333 with a 549-bp <i>copR</i> fragment from pCOP1B2	This study
pPRC334	pPRC333 derivative with pUC334 mutation	This study
pPRC221	pPRC333 derivative with pUC333 spacer mutation	This study
pPRC222	pPRC333 derivative with pUC221 spacer mutation	This study
pPRC227	pPRC333 derivative with pUC227 spacer mutation	This study
pPRC228	pPRC333 derivative with pUC228 spacer mutation	This study
pPRC292	pPRC333 derivative with pUC292 spacer mutation	This study
pPRC294	pPRC333 derivative with pUC294 mutation	This study
pPRC416	pPRC333 derivative with pUC416 mutation	This study
pAC6	Vector for intergration of transcriptional <i>lacZ</i> fusions	34
pAC333	pAC6 with wild-type EcoRI/BamHI fragment (nt 229–362)	This study
pAC334	pAC6 with KS9 EcoRI/BamHI fragment (nt 229–362)	This study
pAC221	pAC6 with 7C EcoRI/BamHI fragment (nt 229–362)	This study

^a Nucleotide numbering is according to Brantl et al. (4). MCS, multiple cloning site.

III, instead of SB179, primer SB370 (5'-ATG TCA AGG ATC CAC GAC) was used. Subsequently, the DNA pools were amplified by PCR with primers SB223 (5'-CAG TCA CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT GAT GCA TGG ATC CAT GAT) and SB224 (5'-ACA GGA AAC AGC TAT GAC CAT GAT TAC GCC GAT GGA ATT CAA GCT TAA TG) in the cases of SELEX I, II, and IV and primers SB371 (5'-TAC GGT AAC TGG ACT GCA TAA CGA TGC ATT TGA CTC ATT CAA GCT TCAT C) and SB372 (5'-TTG CTA AGT GCT TAT GAC TAC ATA CTT GTC ATG TCA AGG ATC CAC GAC) in the case of SELEX III. Primers carry an overhang to obtain longer PCR products (121 bp for SELEX I, II, and IV and 134 bp for SELEX III). After phenol-chloroform extractions and ethanol precipitation, the PCR products were 5' end labeled with 10 μ Ci of [γ -³²P]ATP. The radioactively labeled DNA fragments were purified from 8% native polyacrylamide gels, visualized by phosphorimaging, excised, eluted two times in elution buffer containing 1 mM EDTA (pH 8.0), 500 mM NaAc, 10 mM MgAc, and 0.1% sodium dodecyl sulfate for 1 h at 50°C, and precipitated with ethanol afterwards.

Binding reactions were performed in a final volume of 20 μ l containing the labeled DNA fragment and 84 nM His₆ CopR in 0.5 \times TBE buffer. In all cases, incubation without His₆ CopR was used for comparison. As a reference for the excision of the shifted CopR target, which was not visible in the first round of selection with SELEX II and III, primers with wild-type operator sequence but that were the same length as the SELEX primer were used in each SELEX experiment and treated in the same way (Klenow reaction, PCR amplification, labeling, and EMSA). After round 3 of each SELEX procedure, a 0.6 μ M wild-type DNA fragment (KS1) (28), which has no binding sites for amplification primers, was added as a competitor in each binding reaction to promote selection towards a high-affinity and high-specificity pool. After 30 min at 30°C, bound and unbound DNA species were separated on 8% native polyacrylamide gels at 230 V. Band shifts were detected by phosphorimaging. The bound species were excised and eluted in elution buffer (see above) followed by phenol-chloroform extractions to remove the CopR protein and ethanol precipitation.

The recovered bound ligand sequences were dissolved in water and subsequently PCR amplified by using primers SB225 (5'-CAG TCA CGA CGT TGT

AAA) and SB226 (5'-ACA GGA AAC AGC TAT GAC) for SELEX I, SELEX II, and SELEX IV products and primers SB372 (5'-TAC GGT AAC TGG ACT GCA) and SB374 (5'-TTG CTA AGT GCT TAT GAC) for SELEX III products. Twenty cycles of PCR amplification were performed for 30 s each at 95, 52, and 72°C. PCR products were phenol-chloroform extracted and precipitated with ethanol followed by 5' labeling as described above. These steps were repeated 10 times. After the 10th round of SELEX, amplification products were digested with BamHI and HindIII and inserted into the pUC19 BamHI/HindIII vector. After transformation of *E. coli* strain TG1, the DNA of individual white transformants was sequenced.

In vitro transcription with *B. subtilis* RNA polymerase. Linear templates for in vitro transcription were generated by PCR from the corresponding pUC derivatives pUC333, pUC334, pUC294, pUC292, pUC221, and pUC228 with primer SB214 and the universal sequencing primer and gel purified. In vitro transcription assays were performed in a final volume of 20 μ l containing 60 mM Tris HCl (pH 7.8), 12 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, and 1 ng of different linear DNA templates as well as 200 μ M (each) ATP, GTP, and CTP; 20 μ M UTP; 5 μ Ci of [α -³²P]UTP; and 240 ng of native CopR. After incubation at 30°C for 15 min, 0.5 μ l of *B. subtilis* RNA polymerase (0.24 μ g) was added, and the incubation continued at 30°C for 30 min. Transcription was stopped by phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation, and the products were dissolved in water and 50% formamide loading dye, heat denatured for 5 min at 95°C, and separated on a 6% denaturing polyacrylamide gel. Dried gels were analyzed and quantitated in a Fuji PhosphorImager.

RESULTS AND DISCUSSION

Use of SELEX to study the spacer region reveals two consensus positions at the 3' end. To answer the question of whether there are any sequence preferences in the spacer region between the two CopR binding sites, in a first SELEX approach (SELEX I), an operator sequence that was random-

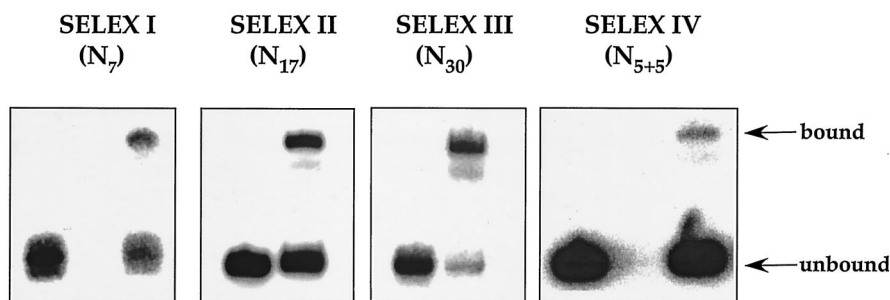


FIG. 1. In vitro selection (SELEX) with four different randomized sequences. Autoradiograms of the EMSAs in the 10th round of in vitro selection are shown for all four randomized targets used in the SELEX I to IV experiments. Bound DNA fragments were excised and, after removal of CopR, were PCR amplified and subcloned into pUC19 to obtain individual operator fragments for sequencing as described in Materials and Methods.

ized at the 7-bp spacer region but that contained wild-type binding sites I and II was used. The SELEX experiment was started with 8 pmol of the randomized sequence, which corresponds to $\approx 2.9 \times 10^9$ copies of every possible sequence, and this pool was amplified by PCR prior to labeling as described in Materials and Methods. As expected, a shifted band was already visible in round 1 (Fig. 1). After round 10, the selected DNA fragments were amplified by PCR, digested with BamHI and HindIII, and inserted into the pUC19 vector. Twenty-eight clones were sequenced, and the results are shown in Table 2. In all but one case, spacers were found with an A or T at position 6, and in all but two cases, a T in position 7 flanked by otherwise random sequences in positions 1 to 5 was found. However,

all spacers were AT rich, with only three of them having more than two G or C residues.

The results of SELEX I show that an optimal spacer region should comprise 7 bp, be AT rich, and contain preferably an A or a T in position 6 and a T in position 7. This is in agreement with a previous fluorescence resonance energy transfer study which revealed a slight (20 to 25°) bend of the *copR* operator region upon binding of the CopR protein (33). We argued that two pyrimidine-purine steps one helical turn apart might be required for flexibility and hence bendability. SELEX I seems to confirm this argument; one of these pyrimidine-purine steps is at the boundary between the spacer and binding site II and requires the T in position 7 of the spacer which indeed was also

TABLE 2. Sequences selected with SELEX I (N₇)

Clone ^a	Sequence ^b
RS	5'-AAGCTTAATGATTT CGTGT (N ₇) GCACG AAATCATGGATCC-3'
1	5'-AAGCTTAATGATTT CGTGT TTCATAT GCACG AAATCATGGATCC-3'
2	5'-AAGCTTAATGATTT CGTGT GAAATTT GCACG AAATCATGGATCC-3'
3	5'-AAGCTTAATGATTT CGTGT GAAATTT GCACG AAATCATGGATCC-3'
4	5'-AAGCTTAATGATTT CGTGT GTACTAT GCACG AAATCATGGATCC-3'
5	5'-AAGCTTAATGATTT CGTGT TTAAGTT GCACG AAATCATGGATCC-3'
6	5'-AAGCTTAATGATTT CGTGT CTACATT GCACG AAATCATGGATCC-3'
7	5'-AAGCTTAATGATTT CGTGT TCACCAT GCACG AAATCATGGATCC-3'
8	5'-AAGCTTAATGATTT CGTGT ACACCTT GCACG AAATCATGGATCC-3'
9	5'-AAGCTTAATGATTT CGTGT TTAAGTT GCACG AAATCATGGATCC-3'
10	5'-AAGCTTAATGATTT CGTGT AAAGTAT GCACG AAATCATGGATCC-3'
11	5'-AAGCTTAATGATTT CGTGT TTAAGTT GCACG AAATCATGGATCC-3'
12	5'-AAGCTTAATGATTT CGTGT TTAATAT GCACG AAATCATGGATCC-3'
13	5'-AAGCTTAATGATTT CGTGT GTCTTAT GCACG AAATCATGGATCC-3'
14	5'-AAGCTTAATGATTT CGTGT GTCTTAT GCACG AAATCATGGATCC-3'
15	5'-AAGCTTAATGATTT CGTGT TTAGTTT GCACG AAATCATGGATCC-3'
16	5'-AAGCTTAATGATTT CGTGT GTCTTAT GCACG AAATCATGGATCC-3'
17	5'-AAGCTTAATGATTT CGTGT ATGTCAG GCACG AAATCATGGATCC-3'
18	5'-AAGCTTAATGATTT CGTGT GCCTGTC GCACG AAATCATGGATCC-3'
19	5'-AAGCTTAATGATTT CGTGT TAATTGT GCACG AAATCATGGATCC-3'
20	5'-AAGCTTAATGATTT CGTGT TTTAGTT GCACG AAATCATGGATCC-3'
21	5'-AAGCTTAATGATTT CGTGT TTCTGTT GCACG AAATCATGGATCC-3'
22	5'-AAGCTTAATGATTT CGTGT TTATCTT GCACG AAATCATGGATCC-3'
23	5'-AAGCTTAATGATTT CGTGT TTATTAT GCACG AAATCATGGATCC-3'
24	5'-AAGCTTAATGATTT CGTGT TTATTAT GCACG AAATCATGGATCC-3'
25	5'-AAGCTTAATGATTT CGTGT TTATACT GCACG AAATCATGGATCC-3'
26	5'-AAGCTTAATGATTT CGTGT TTATTAT GCACG AAATCATGGATCC-3'
27	5'-AAGCTTAATGATTT CGTGT GTAAGTT GCACG AAATCATGGATCC-3'
28	5'-AAGCTTAATGATTT CGTGT AATCTTT GCACG AAATCATGGATCC-3'
WT	5'-AAGCTTAATGATTT CGTGT GAATAAT GCACG AAATCATGGATCC-3'

^a RS, randomized sequence; WT, wild-type sequence.

^b Boldface type indicates binding sites I and II.

TABLE 3. Sequences selected with SELEX II (N_{17})

Clone	Sequence ^a				No. of clones containing indicated sequence
RS	5'-AAGCTTAATGATT	N₁₇	AAATCATGGATCC-3'		
1	5'-AAGCTTAATGATT	CGTGC TTCTTAT GCACG	AAATCATGGATCC-3'		17
2	5'-AAGCTTAATGATT	CGTGT TTCTGCT GCACG	AAATCATGGACAG-3'		3
3	5'-AAGCTTAATGATT	CGTGT TTATCAT GCACG	AAATCATGGATCC-3'		2
4	5'-AAGCTTAATGATT	CGTGT TTCCTCT GCACG	AAATCACTGATTC-3'		1
5	5'-AAGCTTAATGATT	CGTGT AAATTTT GCACG	AAATCATGGATCC-3'		1
WT	5'-AAGCTTAATGATT	CGTGT GAATAAT GCACG	AAATCATGGATCC-3'		

^a Boldface type indicates the randomized region.

found with SELEX II (see below) and found to be a T or C in 9 of 14 sequenced clones by SELEX III (see below). The other pyrimidine-purine step is provided by T241 and G242 in binding site I, which was not found to be altered in any SELEX-derived sequence.

Use of SELEX to study a randomized 17-mer sequence selects both the asymmetric wild-type operator sequence and an operator sequence with perfect symmetry. To find out whether binding sites that are bound more efficiently by CopR than by the wild-type operator exist, a randomized sequence of 17 bp, the minimal wild-type operator length, was used in the SELEX II experiment. This SELEX II experiment was started with 20 pmol of the randomized sequence, corresponding to ≈ 700 copies of every possible sequence, which was PCR amplified and labeled prior to selection (see above). Selection was performed for the first three rounds without a competitor, and after a shifted band emerged in round 3 (Fig. 1), the nonlabeled wild-type operator was added as a competitor and seven additional rounds of selection were performed. After 10 rounds, selected fragments were cloned into the pUC19 vector as described above, and 24 independent clones were sequenced. The results (Table 3) show that all selected sequences contained wild-type binding sites I and II. Furthermore, the 3' nucleotide of binding site I, which is a T in the wild-type site, was in 17 of 24 sequences replaced by a C, making both binding sites perfectly symmetric. Such a perfectly symmetric operator sequence with T243C (Fig. 2), termed KS9, had been analyzed previously (28) and was found to be bound at least as efficiently as the wild-type sequence. Our three-dimensional model of the N-terminal 63 amino acids of CopR (30) predicts that this nucleotide position in binding site

I is contacted by R34 of the recognition helix (Fig. 2) and that the contact would be stronger with a C instead of a T.

Interestingly, the spacer regions of all 24 clones were AT rich (in 22 of 24 cases, ≤ 2 G's or C's were found) and contained a T in position 7 and, in 18 cases, an A in position 6. The latter data are in agreement with the results described above.

Use of SELEX to study a 30-mer sequence selects the symmetric and the asymmetric wild-type operator sequence and a novel sequence with three nucleotide exchanges. Since in vitro selection of a 17-bp randomized sequence neither allows extended spacer lengths to be found nor is able to obtain any information on the variability of the flanking sequences, a randomized 30-mer sequence was used in a third SELEX (SELEX III) experiment. This experiment was started with 333 pmol (8 μ g) of randomized oligodeoxyribonucleotide SB369, which was PCR amplified and labeled prior to selection. Here, in round 4, a bound fraction appeared, and the next rounds were again performed in the presence of a competitor sequence. After 10 rounds, 14 independent clones were sequenced as described above. Table 4 presents the results. Interestingly, whereas the asymmetric wild-type binding sites in two cases (numbers 1 and 4) and the symmetric binding sites in one case (number 13) were found to be similar to those in SELEX II, the other 11 clones contained binding sites with one (number 5), two (numbers 2 and 3), three (numbers 6, 7, 8, 10, 11, 12, and 14), or even four (number 9) nucleotide exchanges. One of these exchanges was the C in position 243 found in the symmetric wild-type operator by SELEX II. However, the other exchanges were within the consensus binding motif 5'-CGTG (Fig. 2). In binding site I, the C in wild-type position 239 was replaced by a T, and in binding site II, the C in

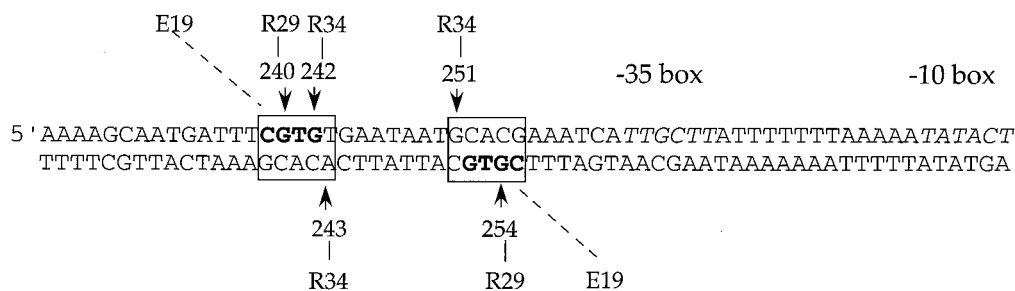


FIG. 2. Wild-type *copR* operator sequence. Binding sites I and II are boxed, and the consensus binding motif 5'-CGTG is highlighted in boldface type. The -35 box and the -10 box of the *repR* promoter pII are shown in italics. Arrows indicate nucleotides contacted specifically by the corresponding amino acids (shown in the one-letter code) of the recognition helix of CopR. Dashed lines indicate water-mediated contacts. The minimal operator sequence comprises 17 bp, i.e., binding sites I and II with their spacer regions.

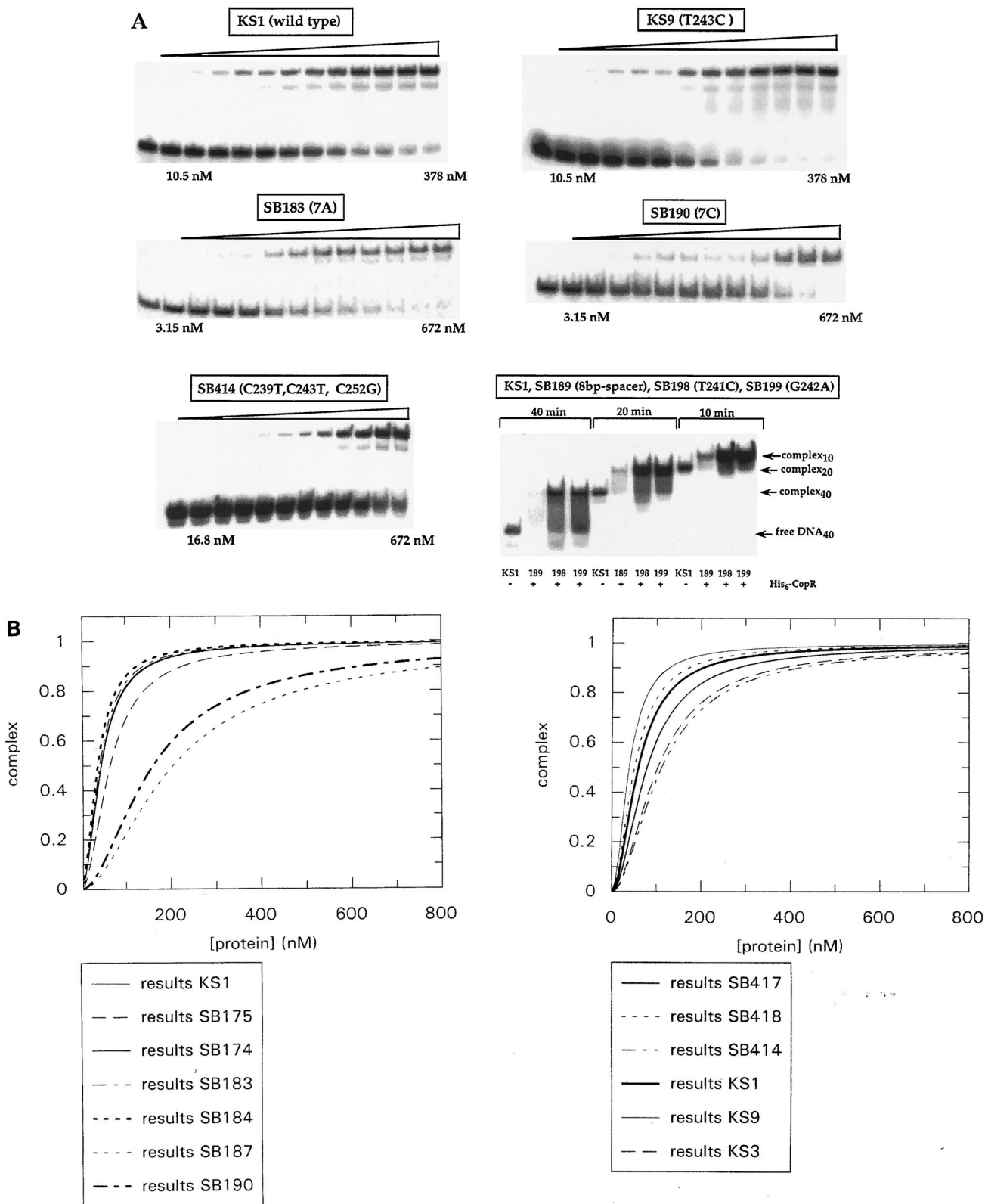


FIG. 4. Binding curves with mutated operator sequences. (A) Autoradiograms of the EMSAs with the wild type and the indicated mutated targets are shown. Below each autoradiogram, the lowest and highest concentrations of purified His₆-tagged CopR used in the experiments are indicated. In the case of SB189, SB198, and SB199, the protein was added to the DNA, complex formation was allowed for 30 min, and the complexes were subsequently loaded onto the gel at different time points (0, 20, and 30 min). Consequently, the autoradiograms show the complexes after 40, 20, and 10 min (left, center, and right, respectively) of migration through the native polyacrylamide gel. A significant portion of the protein-DNA complexes dissociate during gel electrophoresis, indicating unstable complex formation. (B) Binding curves of the wild type and mutated targets. These binding curves were used for the calculation of the K_d values of the CopR-DNA complexes (as described in reference 29) shown in Table 7.

TABLE 7. Equilibrium dissociation rate constants of mutated *copR* operators

Buffer and Oligodeoxyribonucleotide	K_d (nM)	Nucleotide alteration(s)
Buffer with NaCl ^a		
KS1	0.40 ± 0.05	Wild type
SB175	0.82 ± 0.05	T247A (pyrimidine-purine step in spacer)
SB174	0.42 ± 0.05	G244T (pyrimidine-purine step in spacer)
SB183	0.36 ± 0.04	Spacer containing 7A
SB184	0.30 ± 0.07	Spacer containing 7T
SB187	6.21 ± 1.90	Spacer containing 7G
SB190	4.11 ± 0.90	Spacer containing 7C
Buffer without NaCl ^b		
KS1	0.40 ± 0.06	Wild type
KS9	0.18 ± 0.05	T243C
KS3	1.54 ± 0.11	G251A
SB414	1.28 ± 0.16	C239T, T243C, C252G
SB417	0.68 ± 0.07	C239T, T243C
SB418	0.30 ± 0.05	C252G

^a Binding buffer, electrophoresis buffer, and gel contained 75 mM NaCl.

^b EMSAs were performed in the absence of NaCl.

(twofold) in the K_d values do not result in significant effects. In contrast, the copy number of pPRC416 carrying three mutations, the T243C and 1-bp exchanges in binding sites I and II, was about threefold higher, which was in correlation with the K_d value that was threefold higher than that of the asymmetric

TABLE 8. Comparison of copy numbers of wild-type and mutant pIP501 derivatives in *B. subtilis*

Plasmid	Relative copy no.	Nucleotide alteration(s)
pPRC333	1.0	Wild type
pPRC334	0.9	T243C (KS9)
pPRC227	0.9	T247A (spacer without pyrimidine-purine)
pPRC294	2.8	G251A (KS3)
pPRC221	0.8	Spacer with 7C
pPRC222	1.3	Spacer with 7A
pPRC292	0.6	Spacer with 7G
pPRC228	1.5	8-bp spacer
pPRC416	2.9	C239T, T243C, C252G

wild-type and a K_d value even sixfold higher than that of the symmetric wild-type operator, and hence, CopR binding was slightly impaired. From these data, it can be concluded that evolution in vivo was directed at maximal binding. A direct correlation between binding and regulation was also apparent from the analysis of the other symmetric operator variant and supported the importance of G251 in binding site II; the 3- to 4-fold-higher K_d value of KS3 was accompanied by a 2.8-fold-higher copy number of pPRC294, i.e., impaired regulation in vivo.

Some of the pIP501 derivatives that carried mutations in the spacer region showed somewhat unexpected results. Whereas pPRC228 that has an 8-bp spacer, for which unstable binding was observed, replicated at a 1.5-fold-higher copy number than pPRC333, and pPRC derivatives with only A or T residues in the spacer behaved like those of the wild type, pPRC292 carrying only G residues and pPRC221 carrying only C residues replicated at even lower copy numbers than did the wild type, which was in strong contrast to the calculated 16- or 10-fold-higher K_d values that indicated significantly impaired binding. Stacking effects within the spacer region or supercoiling effects (see below) might be responsible for this unexpected behavior.

In vitro transcription with *B. subtilis* RNA polymerase confirmed the in vivo data. In order to find out whether the unexpected results of the copy number determinations with only G or C spacers were due to interaction effects with RNA polymerase, in vitro transcription experiments were performed with *B. subtilis* RNA polymerase in the presence or absence of purified native CopR. Figure 6 demonstrates that repression was performed equally well for the wild type and the T243C mutation (KS9), which coincides with the results of the EMSAs and in vivo copy number determinations (Table 8). For G251A (KS3), a four- to five-fold-lower repression effect was found, which again was in correlation with the results of the EMSA (K_d fourfold higher than that for the wild-type) and copy number determination (\approx 2.8-fold-higher copy numbers) (Table 8). On the other hand, an operator with only C in the spacer region behaved like the wild type with only 7% transcriptional read-through upon CopR binding. This coincides with the copy number regulation, which was also like that of the wild type. Here, factors other than simple binding apparently play a role, since the 10-fold-higher K_d value indicates that binding of CopR is significantly impaired. The same holds true for the operator with the spacer with G only, which is only 2-fold worse in repression in the in vitro transcription assay and even

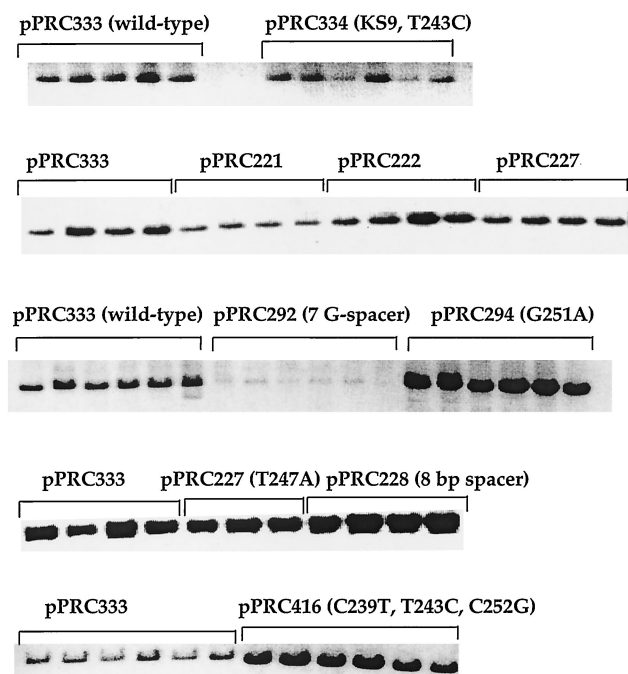


FIG. 5. Copy number determination of pIP501 derivatives with mutated operator sequences. BamHI-linearized aliquots of undiluted plasmid DNAs separated on 1% agarose gels were prepared from 1-ml culture volumes of *B. subtilis* strains containing wild-type or mutant pIP501 derivatives grown to the same optical density in late logarithmic phase. In all cases, four to six transformants grown in parallel were used for plasmid preparations. Gel photos were scanned and quantified by using PCBAS 2.0 software. The results are shown in Table 8.

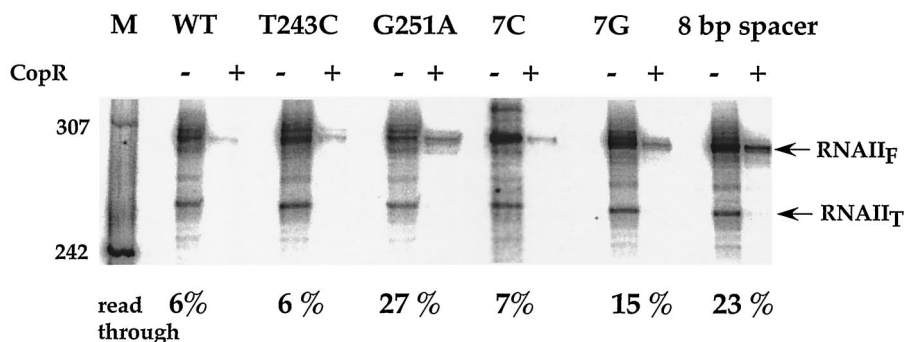


FIG. 6. In vitro transcription with DNA fragments containing mutated *copR* operators. In vitro transcription in the presence or absence of native CopR was performed with *B. subtilis* RNA polymerase as described in Materials and Methods. Above the lanes, the mutations in the operator sequences are indicated. RNAII_F, full-length RNAII (to the end of the used DNA template fragment), RNAII_T, terminated RNAII terminated at the attenuator. Bands were quantitated after phosphorimaging with the PCBAS 2.0 program, and the percentage of read-through in the presence of CopR was calculated (shown below the gel). WT, wild type; M, marker.

shows an approximately 2-fold-lower copy number than that of the wild type but has a 16-fold-higher K_d value significantly impaired in CopR binding. As the reasons for these discrepancies, supercoiling effects cannot be excluded, which are not considered in EMSA or SELEX, where linear templates are used. The operator with an 8-bp spacer showed about a four-fold decrease in repression, in line with the formation of an unstable complex in the EMSA (Fig. 4A).

LacZ fusions indicate that discrepancies between K_d values and copy numbers are due to supercoiling effects. To analyze the role of supercoiling for repression in vivo versus that of repression in vitro (EMSA, SELEX, and in vitro transcription), transcriptional *lacZ* fusions of the *repR* promoter pII containing either wild-type or mutated operators were constructed and integrated into the *amyE* locus of the *B. subtilis* chromosome. Resulting *B. subtilis* integrant strains DB104::pAC333 (wild type), DB104::pAC334 (T243C, symmetric operator), and DB104::pAC221 (7C spacer) were transformed with plasmid pCOP9 to provide CopR in *trans*, and β -galactosidase activities were determined as described previously (7). The results are shown in Table 9. A comparison of β -galactosidase activities determined in the absence and presence of CopR revealed different degrees of repression. In the wild-type case (pAC333), about 17-fold repression was observed, whereas the repression effect was slightly higher (23-fold) in the case of pAC334 containing the symmetric operator which was selected with SELEX II. This result is in agreement with the calculated copy numbers, which were identical in both

cases, and indicates that the twofold difference in the K_d values determined with linear templates is overcome by the supercoiling effect on a circular template in vivo. For pAC221 comprising the 7C spacer region, *lacZ* values in the absence of CopR were about 2.5-fold lower than those of pAC333 and pAC334. This finding suggests that the C-rich spacer region upstream of the -35 box of pII might lower the transcription efficiency by the RNA polymerase. On the other hand, the four- to sixfold-lower repression effect compared to those of the wild-type and symmetric operator was in accordance with the calculated 10-fold-higher K_d value for this operator determined with EMSA. Apparently, supercoiling effects are responsible for the decrease of the expected (from the K_d values) difference in repression. With these data, the surprising discrepancies between K_d values and copy numbers for the 7C spacer variant could be explained. The results of the *lacZ* measurements indicate that efficient binding in vivo is affected by supercoiling and that the copy numbers are influenced by both the K_d value and supercoiling effects.

Evolutionary considerations. One instrument to adjust the copy number of pIP501 is the K_d value of the CopR operator complex. Evolution of the *copR* operator in vivo apparently resulted in a low copy number of the corresponding plasmid pIP501 (approximately 5 copies). This copy number, however, is not the lowest that can be obtained, as shown with pPRC221 and pPRC292. However, in these two cases, copy numbers are lower than those of the wild-type, since the mutated pII promoters with C- or G-rich upstream regions are less efficient than the wild-type promoter per se (see above), and the reduced repression effect on these weak promoters due to high K_d values of the mutated Cop operator complexes is, in a supercoiled context, still sufficient to decrease replication efficiency slightly below the wild-type level.

As demonstrated previously with a series of pIP501 derivatives, there seems to be both an upper and a lower limit for copy numbers found in vivo since no derivative could be constructed that replicated at more than 50 to 100 copies/cell with *B. subtilis* as one of its gram-positive hosts (5). When pIP501 evolved in its original host, *Streptococcus agalactiae*, which was living under certain physiological conditions, selection was apparently for low, but not the lowest possible, copy number, which proved to be optimal under the environmental condi-

TABLE 9. β -Galactosidase activities of chromosomal *lacZ* fusions^a

Strain	CopR in <i>trans</i> ^b	β -Galactosidase activity (Miller units)	Repression effect (fold)
DB104::pAC333	–	467 \pm 49	
DB104::pAC333	+	27.7 \pm 6.7	17
DB104::pAC334	–	438 \pm 62	
DB104::pAC334	+	19.3 \pm 1	23
DB104::pAC221	–	180 \pm 29	
DB104::pAC221	+	42.6 \pm 11	4

^a The values are average values derived from three independent determinations with independently grown cultures.

^b β -Galactosidase activity was determined in the presence (+) and absence (–) of CopR.

tions encountered by this host. This finding is supported by the independent *in vivo* selection of three different (but identical in the binding sites) operators of the three representatives of the *inc18* family of streptococcal plasmids that replicate via the theta mechanism in a broad range of gram-positive bacteria (4): pIP501, pSM19035, and pAM β 1. These plasmids are 97% identical on the nucleotide level, and their replication regions reveal the same modular structure: 5' *cop* gene, *rep* gene, and origin. The *cop* genes (*copR* [pIP501], *copF* [pAM β 1], and *copS* [pSM19035]) encode almost identical proteins that differ only in a few amino acids in the C terminus. Furthermore, the *cop* operators contain identical binding sites I and II (11, 35). The only differences between the *copR* and *copS* operators are found in the spacer region (G244A and T247A) and between the *copR* and *copF* operators in the regions flanking the binding sites (T236G and A260G). These data suggest that during evolution, identical Cop binding sites emerged in three independent plasmids. The results of SELEX I, EMSAs with spacer mutations, and copy number determinations with pPRC227 (T247A) confirmed that the two positions in the spacer region that are different in the *copS* operator are not required for efficient binding or regulation *in vivo*. Additionally, the results of SELEX IV demonstrated that the sequences of the flanking regions of the *cop* operator can vary widely so that the differences between *copR* and *copF* operator are negligible, too.

In summary, *in vitro* selection of the *copR* operator proved to result in the same sequences as those found with *in vivo* selection and demonstrated that evolution was directed at maximal binding affinity. From our experience, SELEX may be, at least in the case of simple transcriptional repressors, a powerful method to answer evolutionary questions.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank E. Birch-Hirschfeld (Institut für Virologie, Jena) for synthesizing the oligodeoxyribonucleotides; Margarita Salas, Madrid, Spain, for kindly providing us with purified *B. subtilis* RNA polymerase; and Nadja Heidrich (AG Bakteriengenetik) for the purification of native CopR.

This work was supported by grants BR1552/4-2 and BR1552/4-3 from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (to S.B.).

REFERENCES

- Andreola, M.-L., F. Pileur, C. Calmels, M. Ventura, L. Tarrago-Litvak, J.-J. Toulmé, and S. Litvak. 2001. DNA aptamers selected against the HIV-1 RNase H display *in vitro* antiviral activity. *Biochemistry* **40**:10087–10094.
- Becker, E. C., and R. J. Meyer. 2000. Recognition of *oriT* for DNA processing at termination of a round of conjugal transfer. *J. Mol. Biol.* **30**:1067–1077.
- Bianchi, A., R. M. Stansel, L. Fairall, J. D. Griffith, D. Rhodes, and T. de Lange. 1999. TRF1 binds a bipartite telomeric site with extreme spatial flexibility. *EMBO J.* **18**:5735–5744.
- Brantl, S., D. Behnke, and J. C. Alonso. 1990. Molecular analysis of the replication region of the conjugative *Streptococcus agalactiae* plasmid pIP501 in *Bacillus subtilis*. Comparison with plasmids pAM β 1 and pSM19035. *Nucleic Acids Res.* **18**:4783–4790.
- Brantl, S., and D. Behnke. 1992. Copy number control of the streptococcal plasmid pIP501 occurs at three levels. *Nucleic Acids Res.* **20**:395–400.
- Brantl, S., E. Birch-Hirschfeld, and D. Behnke. 1993. RepR protein expression on plasmid pIP501 is controlled by an antisense RNA-mediated transcription attenuation mechanism. *J. Bacteriol.* **175**:4052–4061.
- Brantl, S. 1994. The CopR protein of plasmid pIP501 acts as transcriptional repressor at the essential *repR* promoter. *Mol. Microbiol.* **14**:473–483.
- Brantl, S., and E. G. H. Wagner. 1994. Antisense RNA-mediated transcriptional attenuation occurs faster than stable antisense/target RNA pairing: an *in vitro* study of plasmid pIP501. *EMBO J.* **13**:3599–3607.
- Brantl, S., and E. G. H. Wagner. 1997. Dual function of the *copR* gene product of plasmid pIP501. *J. Bacteriol.* **179**:7016–7024.
- Burden, A. D., and N. Osheroff. 1999. *In vitro* evolution of preferred topoisomerase II DNA cleavage sites. *J. Biol. Chem.* **274**:5227–5235.
- Ceglowski, P., R. Lurz, and J. C. Alonso. 1993. Functional analysis of pSM19035-derived replicons in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **109**:145–150.
- Czernik, P. J., D. S. Shin, and B. K. Hurlburt. 1994. Functional selection and characterization of DNA binding sites for *trp* repressor of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**:27869–27875.
- Ellington, A. D., and J. W. Szostak. 1990. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**:818–822.
- Emmerich, R., P. Strehler, H. Hennecke, and H.-M. Fischer. 2000. An imperfect inverted repeat is critical for DNA binding of the response regulator RegR of *Bradyrhizobium japonicum*. *Nucleic Acids Res.* **28**:4166–4171.
- Estrem, S. T., T. Gaal, W. Ross, and R. L. Gourse. 1998. Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters. *Biochemistry* **95**:9761–9766.
- Gaal, T., W. Ross, S. T. Estrem, L. H. Nguyen, R. R. Burgess, and R. L. Gourse. 2001. Promoter recognition and discrimination by Eo^S RNA polymerase. *Mol. Microbiol.* **42**:939–954.
- Goodman, S. D., N. J. Velten, Q. Gao, S. Robinson, and A. M. Segall. 1999. *In vitro* selection of integration host factor binding sites. *J. Bacteriol.* **181**:3246–3255.
- Göringer, H. U., M. Homann, and M. Lorger. 2003. *In vitro* selection of high-affinity nucleic acid ligands to parasite target molecules. *Int. J. Parasitol.* **33**:1309–1317.
- He, Y.-Y., P. G. Stockley, and L. Gold. 1996. *In vitro* evolution of the DNA binding sites of *Escherichia coli* methionine repressor, MetJ. *J. Mol. Biol.* **255**:55–66.
- Heidrich, N., and S. Brantl. 2003. Antisense-RNA mediated transcriptional attenuation: importance of a U-turn loop structure in the target RNA of plasmid pIP501 for efficient inhibition by the antisense-RNA. *J. Mol. Biol.* **333**:917–929.
- Johnston, W. K., P. J. Unrau, M. S. Lawrence, M. E. Glasner, and D. P. Bartel. 2001. RNA-catalyzed RNA polymerization: accurate and general RNA-templated primer extension. *Science* **292**:1319–1325.
- Kuhn, K., K. Steinmetzer, and S. Brantl. 2000. Transcriptional repressor CopR: the structured acidic C terminus is important for protein stability. *J. Mol. Biol.* **300**:1021–1031.
- Kuhn, K., K. Steinmetzer, and S. Brantl. 2001. Transcriptional repressor CopR: dissection of stabilizing motifs within the C terminus. *Microbiology* **147**:3387–3392.
- Lee, N., Y. Bessho, K. Wei, J. W. Szostak, and H. Suga. 2000. Ribozyme-catalyzed tRNA aminoacylation. *Nat. Struct. Biol.* **7**:28–33.
- Manuel, M., M. Rallu, M.-T. Loones, V. Zimarino, V. Mezger, and M. Morange. 2002. Determination of the consensus binding sequence for the purified embryonic heat shock factor 2. *Eur. J. Biochem.* **269**:2527–2537.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463–5467.
- Steinmetzer, K., and S. Brantl. 1997. Plasmid pIP501 encoded transcriptional repressor CopR binds asymmetrically at two consecutive major grooves of the DNA. *J. Mol. Biol.* **269**:684–693.
- Steinmetzer, K., J. Behlke, and S. Brantl. 1998. Plasmid pIP501 encoded transcriptional repressor CopR binds to its target DNA as a dimer. *J. Mol. Biol.* **283**:595–603.
- Steinmetzer, K., A. Hillisch, J. Behlke, and S. Brantl. 2000. Transcriptional repressor CopR: structure model-based localization of the deoxyribonucleic acid binding motif. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **38**:393–406.
- Steinmetzer, K., A. Hillisch, J. Behlke, and S. Brantl. 2000. Transcriptional repressor CopR: amino acids involved in forming the dimeric interface. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **39**:408–416.
- Steinmetzer, K., K. Kuhn, J. Behlke, R. Golbik, and S. Brantl. 2002. Transcriptional repressor CopR: single amino acids involved in dimerization are also important for folding of the monomer. *Plasmid* **47**:201–209.
- Steinmetzer, K., J. Behlke, S. Brantl, and M. Lorenz. 2002. CopR binds and bends its target DNA: a footprinting and fluorescence resonance energy transfer study. *Nucleic Acids Res.* **30**:2052–2060.
- Stülke, J., I. Martin-Verstraete, M. Zagorec, M. Rose, A. Klier, and G. Rapoport. 1997. Induction of the *Bacillus subtilis* *ptsGHI* operon by glucose is controlled by a novel antiterminator, GlcT. *Mol. Microbiol.* **25**:65–78.
- Swinfield, T. J., J. D. Oultram, D. E. Thompson, J. K. Brehm, and N. P. Minton. 1990. Physical characterisation of the replication region of the *Streptococcus faecalis* plasmid pAM β 1. *Gene* **87**:79–90.
- Tuerk, C., and L. Gold. 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**:505–510.
- Wen, J.-D., C. W. Gray, and D. M. Gray. 2001. SELEX selection of high-affinity oligonucleotides for bacteriophage Ff gene 5 protein. *Biochemistry* **40**:9300–9310.

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle Frau Doz. Dr. Sabine Brantl dafür danken, daß sie mir die Arbeit an diesem interessanten Thema überließ. Ich danke ihr für die Betreuung während der Anfertigung der praktischen Arbeiten und für ihre immerwährende Diskussionsbereitschaft. Ich danke herzlich Herrn Dr. Alberto Chinali für die vielen konstruktiven wissenschaftlichen Diskussionen. Mein herzlicher Dank gilt außerdem Herrn Dr. E. Birch-Hirschfeld für die sorgfältige Synthese sämtlicher in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide. Kornelia Kuhn und Dr. Katrin Steinmetzer danke ich für ihre dieser vorliegenden Arbeit vorangegangenen Arbeiten. Ferner bedanke ich mich bei N. Heidrich für die Reinigung des nativen CopR-Proteins sowie Christina und Jana für die Reinigung des C-His₆-CopR-Proteins. Frau Prof. Dr. M. Salas danke ich für die Bereitstellung der in dieser Arbeit verwendeten *B. subtilis* RNA-Polymerase. Herrn Dr. S. Künzel und Herrn Dr. A. Spohner danke ich für ihre freundschaftlichen Unterstützungen. Außerdem gilt mein Dank meiner Familie und meinen lieben Freunden.

Lebenslauf

Name: Peggy Freede
Geburtsdatum: 24.02.1976
Nationalität: deutsch
Geburtsort: Luckenwalde
Familienstand: ledig

1982-1990: Polytechnische Oberschule "Fritz Schmenkel", Luckenwalde
1990-1995: Gymnasium Luckenwalde
1995: Allgemeine Hochschulreife
1995-2001: Studium der Biochemie an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena
im März 2001: Abschluß als Diplom-Biochemikerin, Thema der Diplomarbeit: "Funktionelle Interaktion der DNA-Polymerase α /Primase mit dem Tumorsuppressorprotein p53 und dem Einzelstrang-DNA-Bindungsprotein RPA"
August 2001-Februar 2005: Doktorandin am ehemaligen Institut für Molekularbiologie der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der FSU Jena in der AG Bakteriengenetik; Thema der Dissertation: "Biochemische Charakterisierung des Transkriptionsrepressors CopR und Evolution des CopR-Operators"

Publikation:

Freede P, Brantl S. (2004). Transcriptional Repressor CopR: use of SELEX to study the copR operator indicates that evolution was directed at maximal binding affinity. *J Bacteriol.* Sep;186(18):6254-64.

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Jena, den 24. Oktober 2005

Erklärung zur Bewerbung

Ich erkläre, daß ich mich mit der vorliegenden Arbeit an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad Dr. rer. nat. beworben habe und daß ich weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung eines Verfahrens zum Erwerb des obengenannten akademischen Grades an einer anderen Hochschule beantragt habe.

Jena, den 24. Oktober 2005