

2 Material

2.1 *E. coli* Stämme

SCS1 (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*($r_K^- m_K^+$), *supE44*, *relA1*) (Hanahan, 1983) wurde als Wirt für die *telN* Überexpressionsplasmide und *telRL*-Substratplasmide benutzt.

SURE 2 ($e14^-(McrA^-)$, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)171$, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac*, *recB*, *recJ*, *sbcC*, *umuC::Tn5* (Km^r), *uvrC*, [F' *proAB*, *lacI^qZ* Δ M15, *Tn10* (Tc^r), *Amy⁺*, Cm^r]) (Greener, 1990) diente dem Plasmid mit der kompletten *telN* Substratsequenz (*tos*) als Wirt.

XL1-Blue (*endA1*, *hsdR17* (r_K^- , m_K^+), *glnV44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, $\Delta(lac)$, [F' , *proAB*, *lacI^qZ* Δ M15, *Tn10* (Tc^r)]) (Bullock *et al.*, 1987) wurde zur Vermehrung von M13 Phagen und deren Derivaten herangezogen.

Die Genotypen wurden nach Bachmann bezeichnet. (Bachmann, 1990).

2.2 Bakteriophagen, Plasmide und Nukleinsäuren

2.2.1 Bakteriophagen

M13 mp18/19, Lac^+ in XL1-Blue (Messing, 1983), wurde zur Herstellung von einzelsträngigem *telRL* Substrat benutzt.

N15 (Golub & Ravin, 1967) wurde zur Gewinnung genomischer N15 DNA benutzt. Die Phagen waren ein Geschenk von Prof. G. Dehò (Mailand).

Material

2.2.2 Plasmide

Tab. 1 In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz oder Quelle
pMS119EH	Cloning vektor; pMB1 replicon; $P_{tac}/lacI^q$; Ap^r	Balzer <i>et al.</i> , 1992
pMS470Δ8	Cloning vektor; pMB1 replicon; $P_{tac}/lacI^q$; Ap^r	Balzer <i>et al.</i> , 1992
pBR329	Cloning vektor; ColEI replicon; $P_{tac}/lacI^q$; Ap^r , Tc^r , Cm^r	Covarrubias & Bolivar, 1982
pGS002	pMS470Δ8 Δ[<i>NdeI-HindIII</i>] Ω[<i>NdeI-HindIII his₆ linker</i>]	Schröder <i>et al.</i> (in Vorbereitung)

Die Beschreibung richtet sich nach der von Novick beschriebenen Nomenklatur (Novick *et al.*, 1976).

Material

Tab. 2 Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Plasmide

Plasmid	Beschreibung	N15 bp Koordinaten ^a	Referenz oder Quelle
pBR329Δ1	pBR329 Δ[<i>Hind</i> III- <i>Bam</i> HI, 346 bp]; Ap ^r , Cm ^r , Tc ^s		Deneke <i>et al.</i> , 2002
pJD101	pMS119EH Δ[<i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III, 30 bp] Ω[PCR, N15 <i>tel</i> N, 1929 bp, <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III]	24961-26890	Deneke <i>et al.</i> , 2000
pJD101nde	pJD101 G65C, G66A, G67T	24961-26890	diese Arbeit
pJD101K401A	pJD101 A1271G, A1272C; N15 <i>tel</i> N	24961-26890	diese Arbeit
pJD101N402A	pJD101 A1274G, A1275C; N15 <i>tel</i> N	24961-26890	diese Arbeit
pJD101L413A	pJD101 C1307G, T1308C; N15 <i>tel</i> N	24961-26890	diese Arbeit
pJD101G414A	pJD101 G1311C; N15 <i>tel</i> N	24961-26890	diese Arbeit
pJD101H415A	pJD101 C1313G, A1314C; N15 <i>tel</i> N	24961-26890	diese Arbeit
pJD101D416A	pJD101 A1317C; N15 <i>tel</i> N	24961-26890	diese Arbeit
pJD101D417A	pJD101 A1320C; N15 <i>tel</i> N	24961-26890	diese Arbeit
pJD101H423A	pJD101 C1337G, A1338C; N15 <i>tel</i> N	24961-26890	diese Arbeit
pJD101Y424F	pJD101 A1341T; N15 <i>tel</i> N	24961-26890	Deneke <i>et al.</i> , 2002

Material

pJD101Y424A	pJD101 T1340G, A1341C; N15 <i>telN</i>	24961-26890	diese Arbeit
pJD101F427A	pJD101 T1349G, T1350C; N15 <i>telN</i>	24961-26890	diese Arbeit
pJD101L429A	pJD101 C1355G, T1356C; N15 <i>telN</i>	24961-26890	diese Arbeit
pJD101N431A	pJD101 A1361G, A1362C; N15 <i>telN</i>	24961-26890	diese Arbeit
pJD102	pMS470Δ8 Δ[<i>NdeI-HindIII</i> , 1375 bp] Ω[PCR, N15 <i>telN</i> , 1896 bp, <i>NdeI-HindIII</i>]	24995-26890	Deneke <i>et al.</i> , 2002
pJD102Δ1	pMS470Δ8 Δ[<i>NdeI-HindIII</i> , 1375 bp] Ω[PCR, N15 <i>telN</i> , 1727 bp, <i>NdeI-HindIII</i>]	25163-26890	diese Arbeit
pJD102Δ2	pMS470Δ8 Δ[<i>NdeI-HindIII</i> , 1375 bp] Ω[PCR, N15 <i>telN</i> , 1607 bp, <i>NdeI-HindIII</i>]	25283-26890	diese Arbeit
pJD102Δ3	pMS470Δ8 Δ[<i>NdeI-HindIII</i> , 1375 bp] Ω[PCR, N15 <i>telN</i> , 1412 bp, <i>NdeI-HindIII</i>]	25478-26890	diese Arbeit
pJD102Δ4	pMS470Δ8 Δ[<i>NdeI-HindIII</i> , 1375 bp] Ω[PCR, N15 <i>telN</i> , 1307 bp, <i>NdeI-HindIII</i>]	25583-26890	diese Arbeit
pJD102Δ5	pMS470Δ8 Δ[<i>NdeI-HindIII</i> , 1375 bp] Ω[PCR, N15 <i>telN</i> , 1148 bp, <i>NdeI-HindIII</i>]	25742-26890	diese Arbeit
pJD102Δ6	pMS470Δ8 Δ[<i>NdeI-HindIII</i> , 1375 bp] Ω[PCR, N15 <i>telN</i> , 974 bp, <i>NdeI-HindIII</i>]	25916-26890	diese Arbeit
pJD102Δ7	pMS470Δ8 Δ[<i>NdeI-HindIII</i> , 1375 bp] Ω[PCR, N15 <i>telN</i> , 779 bp, <i>NdeI-HindIII</i>]	26111-26890	diese Arbeit
pJD102Δ8	pMS470Δ8 Δ[<i>NdeI-HindIII</i> , 1375 bp] Ω[PCR, N15 <i>telN</i> , 1385 bp, <i>NdeI-HindIII</i>]	24995-26380	diese Arbeit
pJD102Δ9	pMS470Δ8 Δ[<i>NdeI-HindIII</i> , 1375 bp] Ω[PCR, N15 <i>telN</i> , 1556 bp, <i>NdeI-HindIII</i>]	24995-26551	diese Arbeit

Material

pJD102Δ10	pMS470Δ8 Δ[<i>NdeI-HindIII</i> , 1375 bp] Ω[PCR, N15 <i>telN</i> , 1724 bp, <i>NdeI-HindIII</i>	24995-26719	diese Arbeit
pJD102Δ11	pMS470Δ8 Δ[<i>NdeI-HindIII</i> , 1375 bp] Ω[PCR, N15 <i>telN</i> , 1820 bp, <i>NdeI-HindIII</i>	24995-26815	diese Arbeit
pJD102Δ12	pMS470Δ8 Δ[<i>NdeI-HindIII</i> , 1375 bp] Ω[PCR, N15 <i>telN</i> , 330 bp, <i>NdeI-HindIII</i>	24995-25325	diese Arbeit
pJD102Δ13	pMS470Δ8 Δ[<i>NdeI-HindIII</i> , 1375 bp] Ω[PCR, N15 <i>telN</i> , 683 bp, <i>NdeI-HindIII</i>	24995-25678	diese Arbeit
pJD102Δ14	pMS470Δ8 Δ[<i>NdeI-HindIII</i> , 1375 bp] Ω[PCR, N15 <i>telN</i> , 921 bp, <i>NdeI-HindIII</i>	24995-25916	diese Arbeit
pJD102Δ15	pMS470Δ8 Δ[<i>NdeI-HindIII</i> , 1375 bp] Ω[PCR, N15 <i>telN</i> , 1193 bp, <i>NdeI-HindIII</i>	24995-26188	diese Arbeit
pJD104	pBR329 Δ[<i>HindIII-BamHI</i> , 346 bp] Ω[PCR N15 <i>tos</i> , 563 bp, <i>HindIII-BamHI</i>]	24474-25037	Deneke <i>et al.</i> , 2000
pJD105	pBR329 Δ[<i>HindIII-BamHI</i> , 346 bp] Ω[N15 <i>telRL</i> , 56 bp, <i>HindIII-BamHI</i>]	24775-24830	Deneke <i>et al.</i> , 2000
pJD105R-sym	pJD105 A303G T305A; N15 <i>telRL</i>	24775-24830	Deneke <i>et al.</i> , 2002
pJD105A20TT21A	pJD105 A285T T286A; N15 <i>telRL</i>	24775-24830	Deneke <i>et al.</i> , 2002
pJD105AT-sym	pJD105 A285T T286A A301T T302A; N15 <i>telRL</i>	24775-24830	Deneke <i>et al.</i> , 2002
pJD105(TA) ₇	pJD105 C26T G27A C28T G29A C30T G31A; N15 <i>telRL</i>	24775-24830	Deneke <i>et al.</i> , 2002
pJD105(CG) ₇	pJD105 T22C A23G T24C A25G T32C A33G T34C A35G; N15 <i>telRL</i>	24775-24830	Deneke <i>et al.</i> , 2002
pJD105S	pJD105 Δ22-35 TATACGCGCGTATA Ω22-35 CTGGATTAATCCAG; N15 partial <i>telRL</i>	24775-24830	Deneke <i>et al.</i> , 2002

Material

pJD105scram	pJD105 Δ22-35 TATACGCGCGTATA Ω22-35 CGAGTCGGTCCATG; N15 partial <i>telRL</i>	24775-24830	Deneke <i>et al.</i> , 2002
pJD105Δ8	pBR329 Δ[<i>HindIII-BamHI</i> , 346 bp] Ω[N15 partial <i>telRL</i> , 39 bp, <i>HindIII-BamHI</i>]	24792-24830	Deneke <i>et al.</i> , 2002
pJD105Δ8.1	pBR329 Δ[<i>HindIII-BamHI</i> , 346 bp] Ω[N15 partial <i>telRL</i> , 38 bp, <i>HindIII-BamHI</i>]	24793-24830	Deneke <i>et al.</i> , 2002
pJD105Δ8.2	pBR329 Δ[<i>HindIII-BamHI</i> , 346 bp] Ω[N15 partial <i>telRL</i> , 37 bp, <i>HindIII-BamHI</i>]	24794-24830	Deneke <i>et al.</i> , 2002
pJD105Δ8.3	pBR329 Δ[<i>HindIII-BamHI</i> , 346 bp] Ω[N15 partial <i>telRL</i> , 35 bp, <i>HindIII-BamHI</i>]	24795-24830	diese Arbeit
pJD105Δ8.4	pBR329 Δ[<i>HindIII-BamHI</i> , 346 bp] Ω[N15 partial <i>telRL</i> , 33 bp, <i>HindIII-BamHI</i>]	24798-24830	diese Arbeit
pJD105Δ8.5	pBR329 Δ[<i>HindIII-BamHI</i> , 346 bp] Ω[N15 partial <i>telRL</i> , 31 bp, <i>HindIII-BamHI</i>]	24800-24830	diese Arbeit
pJD105Δ8.6	pBR329 Δ[<i>HindIII-BamHI</i> , 346 bp] Ω[N15 partial <i>telRL</i> , 29 bp, <i>HindIII-BamHI</i>]	24802-24830	diese Arbeit
pJD105Δ8.7	pBR329 Δ[<i>HindIII-BamHI</i> , 346 bp] Ω[N15 partial <i>telRL</i> , 28 bp, <i>HindIII-BamHI</i>]	24803-24830	Deneke <i>et al.</i> , 2002
pJD105R5	pBR329 Δ[<i>HindIII-BamHI</i> , 346 bp] Ω[N15 partial <i>telRL</i> , 51 bp, <i>HindIII-BamHI</i>]	24780-24830	diese Arbeit
pJD105RL5	pBR329 Δ[<i>HindIII-BamHI</i> , 346 bp] Ω[N15 partial <i>telRL</i> , 46 bp, <i>HindIII-BamHI</i>]	24780-24825	diese Arbeit
pJD105RL5ΔA36	pBR329 Δ[<i>HindIII-BamHI</i> , 346 bp] Ω[N15 partial <i>telRL</i> , 45 bp, <i>HindIII-BamHI</i>]	24780-24825	diese Arbeit
pJD105RL8	pBR329 Δ[<i>HindIII-BamHI</i> , 346 bp] Ω[N15 partial <i>telRL</i> , 40 bp, <i>HindIII-BamHI</i>]	24783-24822	diese Arbeit
pJD105RL9	pBR329 Δ[<i>HindIII-BamHI</i> , 346 bp] Ω[N15 partial <i>telRL</i> , 39 bp, <i>HindIII-BamHI</i>]	24784-24822	diese Arbeit

Material

pJD105RL10	pBR329 Δ [<i>HindIII-BamHI</i> , 346 bp] Ω [N15 partial <i>telRL</i> , 36 bp, <i>HindIII-BamHI</i>]	24785-24820	diese Arbeit
pJD105RL11	pBR329 Δ [<i>HindIII-BamHI</i> , 346 bp] Ω [N15 partial <i>telRL</i> , 35 bp, <i>HindIII-BamHI</i>]	24786-24820	diese Arbeit
pJD105RL13	pBR329 Δ [<i>HindIII-BamHI</i> , 346 bp] Ω [N15 partial <i>telRL</i> , 29 bp, <i>HindIII-BamHI</i>]	24788-24816	diese Arbeit
pJD106	pBR329 Δ [<i>HindIII-BamHI</i> , 346 bp] Ω [N15 partial <i>telRL</i> , 22 bp, <i>HindIII-BamHI</i>]	24792-24813	Deneke <i>et al.</i> , 2000
pJD107	pBR329 Δ [<i>HindIII-BamHI</i> , 346 bp] Ω [PY54 <i>telRL</i> , 42 bp, <i>HindIII-BamHI</i>]		diese Arbeit
pJD108	pJD105 Δ [<i>AatII-NspV</i> , 189 bp] Ω [N15 <i>telRL</i> , 56 bp, <i>AatII-NspV</i>]	24775-24830	diese Arbeit
pJD109	pGS002 Δ [<i>NdeI-HindIII</i> , 12 bp] Ω [Fragm. (pJD102), N15 <i>telN</i> , 1896 bp, <i>NdeI-HindIII</i>]	24995-26890	diese Arbeit

Nukleotidaustausche sind aufgeführt.

Die Beschreibung richtet sich nach der von Novick beschriebenen Nomenklatur (Novick *et al.*, 1976).

^anach GenBank accession No. AF064539.

2.2.3 Genetische Karten der wichtigsten in dieser Arbeit hergestellten Plasmide

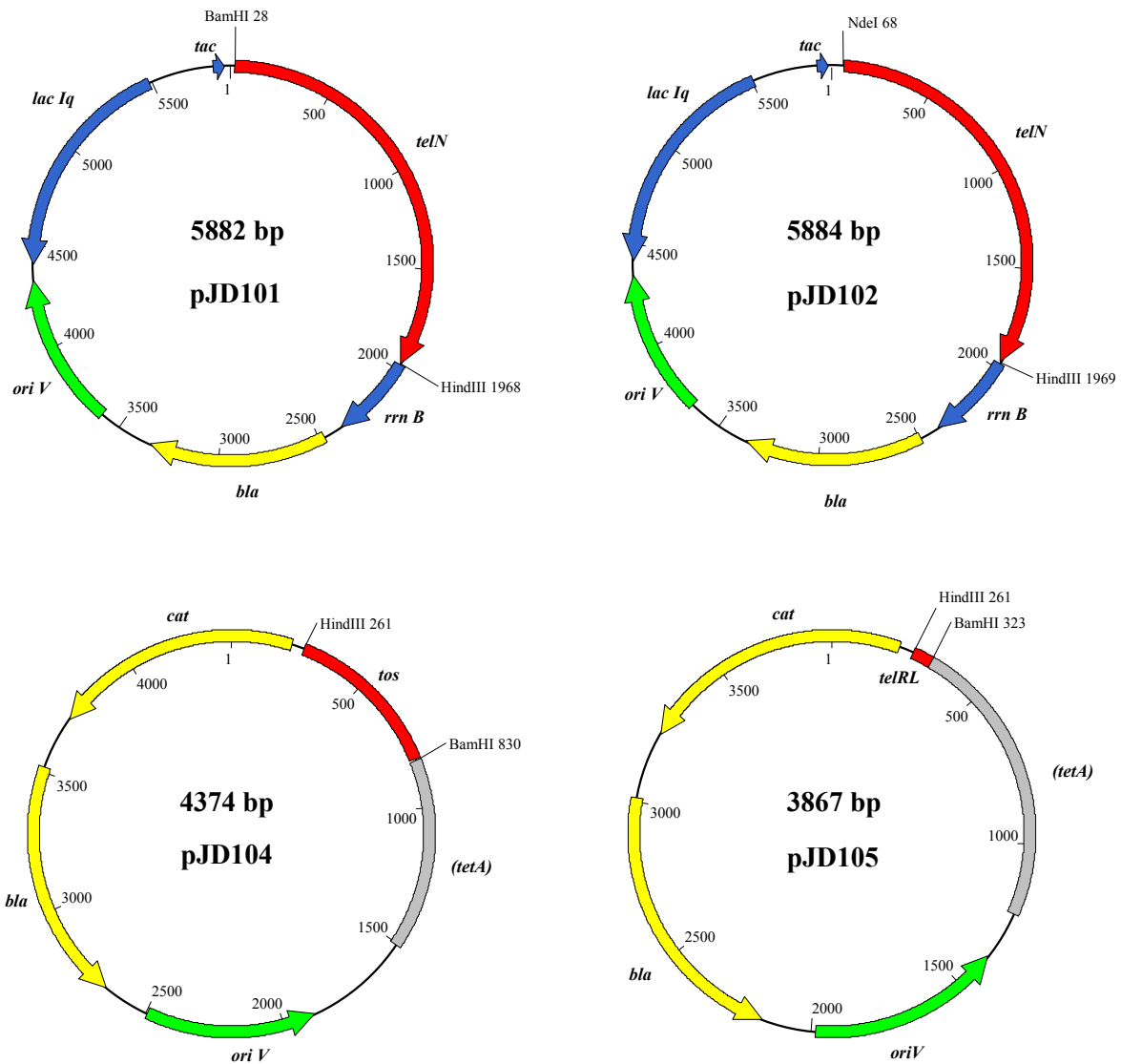


Abb. 8 Plasmidkarten von Überexpressions- und Substratplasmiden

Insertionen in den Vektor sind rot markiert; Replikationsorigin (*oriV*): grün; Regulationselemente (*lacI^q*, *tac*, *rrnB*): blau; Gene für Antibiotikaresistenz (*bla*, *cat*): gelb. Die Plasmide pJD101 und pJD102 enthalten jeweils das Gen 29 (*telN*) des Bakteriophagen N15. Für pJD101 diente pMS119EH als Vektor, das insertierte *telN* Gen enthält seine originale Shine-Dalgarno-Sequenz. pJD102 ist aus dem Vektor pMS470Δ8 entstanden und enthält vor dem Startcodon des *telN* Gens (*NdeI*) die Shine-Dalgarno-Sequenz von Gen 10 des Bakteriophagen T7. Für pJD104 und pJD105 diente pBR329 als Vektor. Beide Plasmide enthalten DNA-Substrate für TelN. pJD104 enthält die komplette *tos*-Sequenz (310 bp), pJD105 lediglich *telRL* (56 bp).

2.2.4 Nukleinsäuren

Tab. 3 In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Plasmid/ Verwendungszweck	Sequenz des Oligonukleotids	Locus
PCR, <i>telN</i> aus N15, pJD101	ATCggatccCGATATCCAGAGACTTAGAAACGGG ^c ATATAaagcttCTTTTAGCTGTAGTACGTTTCCCATGCG ^c	<i>telN</i>
pJD101nde	GAAACGGGGGAACCC catatg AGCAAGGTAAAAATCGGTGAG ^{a,c} CTCACCGATTTTTACCTTGCT catatg GGTTCCCCCGTTTC ^{a,c}	<i>telN</i>
pJD101K401A	CGCGTCGATCCACGGTGGG CA AACGTCGACGAGGATGTGTTC ^a GAACACATCCTCGTCGACGTT TG CCCACCGTGGATCGACGCG ^a	<i>telN</i>
pJD101N402A	CGCGTCGATCCACGGTGGAAAG CC GTCGACGAGGATGTGTTC ^a GAACACATCCTCGTCGACGG G CTTCCACCGTGGATCGACGCG ^a	<i>telN</i>
pJD101L413A	CATGGAGATT G CCGGACACGACGATGAGAACACC ^a GGTGTTCATCGTCGTGTCC G CAATCTCCATG ^a	<i>telN</i>
pJD101G414A	CATGGAGATTCTCGCACACGACGATGAGAACACC ^a GGTGTTCATCGTCGTGT G CGAGAATCTCCATG ^a	<i>telN</i>
pJD101H415A	CATGGAGATTCTCGGAG CC GACGATGAGAACACC ^a GGTGTTCATCGTCGG G CTCCGAGAATCTCCATG ^a	<i>telN</i>

Material

pJD101D416A	CATGGAGATTCTCGGACACGCCGATGAGAACACC ^a GGTGTTCATCGGCGTGTCCGAGAATCTCCATG ^a	<i>telN</i>
pJD101D417A	CATGGAGATTCTCGGACACGACGCTGAGAACACC ^a GGTGTTCAGCGTCGTGTCCGAGAATCTCCATG ^a	<i>telN</i>
pJD101H423A	GAACACCCAGCTGGCCTATAAGCAGTTCAAGCTGG ^a CCAGCTTGAAGTCTTATAGGCCAGCTGGGTGTTC ^a	<i>telN</i>
pJD101Y424F	GAACACCCAGCTGCACTTTAAGCAGTTCAAGCTGG ^a CCAGCTTGAAGTCTTAAAGTGCAGCTGGGTGTTC ^a	<i>telN</i>
pJD101Y424A	GAACACCCAGCTGCACGCTAAGCAGTTCAAGCTGG ^a CCAGCTTGAAGTCTTAGCGTGCAGCTGGGTGTTC ^a	<i>telN</i>
pJD101F427A	GCACTATAAGCAGGCCAAGCTGGCCAACCTTCTCCAGAACC ^a GGTTCTGGAGAAGTTGGCCAGCTTGGCCTGCTTATAGTGC ^a	<i>telN</i>
pJD101L429A	GCACTATAAGCAGTTCAAGGCCGGCCAACCTTCTCCAGAACC ^a GGTTCTGGAGAAGTTGGCCGCCTTGAAGTCTTATAGTGC ^a	<i>telN</i>
pJD101N431A	GCAGTTCAAGCTGGCCGCCTTCTCCAGAACCTGG ^a CCAGGTTCTGGAGAAGGCCGGCCAGCTTGAAGTGC ^a	<i>telN</i>
PCR, <i>telN</i> aus N15, pJD102	ATATGACcatatgAGCAAGGTA AAAATCGGTGAGTTGATCAAC ^c ATATAaagcttCTTTTAGCTGTAGTACGTTTCCCATGCG ^c	<i>telN</i>
PCR, pJD102Δ1	GGCTGAGCTAGcatatgTTGCAGAAAAGAATAACCGGAATACTTTTAACG ^c GGCTGAGCaagcttCTTTTAGCTGTAGTACGTTTCCCATGCGG ^c	<i>telN</i>

Material

PCR, pJD102Δ2	GGCTGAGCTAGcatatgCCTCTTTACAGCGAAGAATTATCTTCATGGC ° GGCTGAGCaagcttCTTTTAGCTGTAGTACGTTTCCCATGCGG °	<i>telN</i>
PCR, pJD102Δ3	GGCTGAGCTAGcatatgGCTCTTAGTGATTTAAACAGTGATGATTGGAAGG ° GGCTGAGCaagcttCTTTTAGCTGTAGTACGTTTCCCATGCGG °	<i>telN</i>
PCR, pJD102Δ4	GGCTGAGCTAGcatatgGTCAACCATGAGGTTCTGTACCATCTG ° GGCTGAGCaagcttCTTTTAGCTGTAGTACGTTTCCCATGCGG °	<i>telN</i>
PCR, pJD102Δ5	GGCTGAGCTAGcatatgGCGACTTTATTTAGTTTAAACACTCGTTCTGGAATGG ° GGCTGAGCaagcttCTTTTAGCTGTAGTACGTTTCCCATGCGG °	<i>telN</i>
PCR, pJD102Δ6	GGCTGAGCTAGcatatgGTAACCAGAACGATTTATACTTTATGCGAAGCAAATTATTCG ° GGCTGAGCaagcttCTTTTAGCTGTAGTACGTTTCCCATGCGG °	<i>telN</i>
PCR, pJD102Δ7	GGCTGAGCTAGcatatgGGCGATGACCGTCGTGTTTATAAAGATAGC ° GGCTGAGCaagcttCTTTTAGCTGTAGTACGTTTCCCATGCGG °	<i>telN</i>
PCR, pJD102Δ8	GGCTGAGCTAGcatatgAGCAAGGTAAAAATCGGTGAGTTGATC ° GGCTGAGCaagcttCTTTTAGGCAAAGCCTGGCATTTCATCGTCCAGTTTC °	<i>telN</i>
PCR, pJD102Δ9	GGCTGAGCTAGcatatgAGCAAGGTAAAAATCGGTGAGTTGATC ° GGCTGAGCaagcttCTTTTAGTTCTCGCCAACGAACTGCCC °	<i>telN</i>
PCR, pJD102Δ10	GGCTGAGCTAGcatatgAGCAAGGTAAAAATCGGTGAGTTGATC ° GGCTGAGCaagcttCTTTTATGGCCCTTCTCTTCGGTTGG °	<i>telN</i>
PCR, pJD102Δ11	GGCTGAGCTAGcatatgAGCAAGGTAAAAATCGGTGAGTTGATC ° GGCTGAGCaagcttCTTTTACTTTCCATCGTATTCAAACCTCTATCTTGTACGTTTC °	<i>telN</i>

Material

PCR, pJD102Δ12	GGCTGAGCTAGcatatgAGCAAGGTAAAAATCGGTGAGTTGATC [°] GGCTGAGCaagcttCTTTTAAGGCATAGAAAGCCATGAAGATAATTCTTCGC [°]	<i>telN</i>
PCR, pJD102Δ13	GGCTGAGCTAGcatatgAGCAAGGTAAAAATCGGTGAGTTGATC [°] GGCTGAGCaagcttCTTTTAACGCTTCTTCTCGCGCAGAAC [°]	<i>telN</i>
PCR, pJD102Δ14	GGCTGAGCTAGcatatgAGCAAGGTAAAAATCGGTGAGTTGATC [°] GGCTGAGCaagcttCTTTTATACGCTTTTATCTTCAGAGCGTTTTTTAGCTTGC [°]	<i>telN</i>
PCR, pJD102Δ15	GGCTGAGCTAGcatatgAGCAAGGTAAAAATCGGTGAGTTGATC [°] GGCTGAGCaagcttCTTTTAATCGACGCGGAAGAACATCTCATAAGCGATG [°]	<i>telN</i>
PCR, <i>tos</i> , pJD104	CTTACTTaagcttAAGCGCAACGGTATTACTTACGTTGG [°] GCGg gatccTCACAAGCGTGTTGATCAACTCACC [°]	<i>tos</i>
pJD105	agcttTATCAGCACACAATTGCCATTATACGCGCGTATAATGGACTATTGTGTGCTGATAg [°] gatccTATCAGCACACAATAGTCCATTATACGCGCGTATAATGGGCAATTGTGTGCTGATAa [°]	<i>telRL</i>
pJD105R-sym	agcttTATCAGCACACAATTGCCATTATACGCGCGTATAATGGGCAATTGTGTGCTGATAg ^{b,c} gatccTATCAGCACACAATTGCCATTATACGCGCGTATAATGGGCAATTGTGTGCTGATAa ^{b,c}	<i>telRL</i>
pJD105A20TT21A	agcttTATCAGCACACAATTGCCCTATATACGCGCGTATAATGGACTATTGTGTGCTGATAg ^{b,c} gatccTATCAGCACACAATAGTCCATTATACGCGCGTATATAGGGCAATTGTGTGCTGATAa ^{b,c}	<i>telRL</i>
pJD105AT-sym	agcttTATCAGCACACAATTGCCCTATATACGCGCGTATATAGGACTATTGTGTGCTGATAg ^{b,c} gatccTATCAGCACACAATAGTCCCTATATACGCGCGTATATAGGGCAATTGTGTGCTGATAa ^{b,c}	<i>telRL</i>
pJD105(TA) ₇	agcttTATCAGCACACAATTGCCATTATATATATATAATGGACTATTGTGTGCTGATAg ^{b,c} gatccTATCAGCACACAATAGTCCATTATATATATATAATGGGCAATTGTGTGCTGATAa ^{b,c}	<i>telRL</i>

Material

pJD105(CG) ₇	agcttTATCAGCACACAATTGCCCAT CGCGCGCGCGCGCGATGGACTATTGTGTGCTGATA g ^{b,c} gatccTATCAGCACACAATAGTCCAT CGCGCGCGCGCGCGATGGGCAATTGTGTGCTGATA a ^{b,c}	<i>telRL</i>
pJD105S	agcttTATCAGCACACAATTGCCCAT CTGGATTAATCCAGATGGACTATTGTGTGCTGATA g ^{b,c} gatccTATCAGCACACAATAGTCCAT CTGGATTAATCCAGATGGGCAATTGTGTGCTGATA a ^{b,c}	<i>telRL</i>
pJD105scram	agcttTATCAGCACACAATTGCCCAT CGAGTCGGTCCATGATGGACTATTGTGTGCTGATA g ^{b,c} gatccTATCAGCACACAATAGTCCAT CATGGACCGACTCGATGGGCAATTGTGTGCTGATA a ^{b,c}	<i>telRL</i>
pJD105Δ8	agcttCCATTATACGCGCGTATAATGGACTATTGTGTGCTGATAg ^c gatccTATCAGCACACAATAGTCCATTATACGCGCGTATAATGGa ^c	<i>telRL</i>
pJD105Δ8.1	agcttCATTATACGCGCGTATAATGGACTATTGTGTGCTGATAg ^c gatccTATCAGCACACAATAGTCCATTATACGCGCGTATAATGa ^c	<i>telRL</i>
pJD105Δ8.2	agcttATTATACGCGCGTATAATGGACTATTGTGTGCTGATAg ^c gatccTATCAGCACACAATAGTCCATTATACGCGCGTATAATa ^c	<i>telRL</i>
pJD105Δ8.3	agcttTATACGCGCGTATAATGGACTATTGTGTGCTGATAg ^c gatccTATCAGCACACAATAGTCCATTATACGCGCGTATAa ^c	<i>telRL</i>
pJD105Δ8.4	agcttTACGCGCGTATAATGGACTATTGTGTGCTGATAg ^c gatccTATCAGCACACAATAGTCCATTATACGCGCGTAa ^c	<i>telRL</i>
pJD105Δ8.5	agcttCGCGCGTATAATGGACTATTGTGTGCTGATAg ^c gatccTATCAGCACACAATAGTCCATTATACGCGCGa ^c	<i>telRL</i>
pJD105Δ8.6	agcttCGCGTATAATGGACTATTGTGTGCTGATAg ^c gatccTATCAGCACACAATAGTCCATTATACGCGa ^c	<i>telRL</i>

Material

pJD105Δ8.7	agcttGCGTATAATGGACTATTGTGTGCTGATAg [°] gatccTATCAGCACACAATAGTCCATTATACGCa [°]	<i>telRL</i>
pJD105R5	agcttGCACACAATTGCCATTATACGCGCGTATAATGGACTATTGTGTGCTGATAg [°] gatccTATCAGCACACAATAGTCCATTATACGCGCGTATAATGGGCAATTGTGTGCa [°]	<i>telRL</i>
pJD105RL5	agcttGCACACAATTGCCATTATACGCGCGTATAATGGACTATTGTGTGCg [°] gatccGCACACAATAGTCCATTATACGCGCGTATAATGGGCAATTGTGTGCa [°]	<i>telRL</i>
pJD105RL5ΔA36	agcttGCACACAATTGCCATTATACGCGCGTATATGGACTATTGTGTGCg [°] gatccGCACACAATAGTCCATATACGCGCGTATAATGGGCAATTGTGTGCa [°]	<i>telRL</i>
pJD105RL8	agcttCACAATTGCCATTATACGCGCGTATAATGGACTATTGTGg [°] gatccCACAATAGTCCATTATACGCGCGTATAATGGGCAATTGTGa [°]	<i>telRL</i>
pJD105RL9	agcttACAATTGCCATTATACGCGCGTATAATGGACTATTGTg [°] gatccACAATAGTCCATTATACGCGCGTATAATGGGCAATTGTa [°]	<i>telRL</i>
pJD105RL10	agcttCAATTGCCATTATACGCGCGTATAATGGACTATTGg [°] gatccCAATAGTCCATTATACGCGCGTATAATGGGCAATTGa [°]	<i>telRL</i>
pJD105RL11	agcttAATTGCCATTATACGCGCGTATAATGGACTATTg [°] gatccAATAGTCCATTATACGCGCGTATAATGGGCAATTa [°]	<i>telRL</i>
pJD105RL13	agcttTGCCATTATACGCGCGTATAATGGACTg [°] gatccAGTCCATTATACGCGCGTATAATGGGCAa [°]	<i>telRL</i>
pJD106	agcttCCATTATACGCGCGTATAATGGg [°] gatccCCATTATACGCGCGTATAATGGa [°]	<i>telO</i>

Material

pJD107	agcttACCTATTTTCAGCATACTACGCGCGTAGTATGCTGAAATAGGTg [°] gatccACCTATTTTCAGCATACTACGCGCGTAGTATGCTGAAATAGGTa [°]	<i>PY54 telRL</i>
pJD108	cTATCAGCACACAATTGCCATTATACGCGCGTATAATGGACTATTGTGTGCTGATA [°] cgaaTATCAGCACACAATAGTCCATTATACGCGCGTATAATGGGCAATTGTGTGCTGATAgacgt [°]	<i>telRL</i>
<i>Footprinting primer</i>	CTCCATTTTAGCTTCCTTAGCTCCTG CCGCACCTGTGGCGC	<i>telRL</i>
<i>Plasmon Resonance</i>	X-AGCTCTAGCGCGTTGATATGTCATCGGTAGTTGACCTGATTGCAATGCGCTATTGGCTGCAATGGCTAGCTTGCAGATACCTGATGCTCACGGTACGT ^d ACGTACCGTGAGCATCAGGTATCTGCAAGCTAGCCATTGCAGCCAATAGCGCATTGCAATCAGGTCAACTACCGATGACATATCAACGCGCTAG	randomisiert
<i>Plasmon Resonance</i>	X-atcatatctcaattacggaacaTATCAGCACACAATTGCCATTATACGCGCGTATAATGGACTATTGTGTGCTGATAaggagaacataagcgagaacaa ^{d,e} ttgttctgcgcttatgttctctTATCAGCACACAATAGTCCATTATACGCGCGTATAATGGGCAATTGTGTGCTGATAgttccgtaattgagata	<i>telRL</i>
Sequenzierprimer (universell)	ATTGTGAGCGGATAACAA	pmsl
Sequenzierprimer (universell)	AACCGCCTACTCTCTTC	pms-r-seq
Sequenzierprimer N15-S1	GCAGGGCAAGAAAGCGGTTTGATG	<i>telN</i>
Sequenzierprimer N15-S2	TAAGTTATTCCAACAAGGCTCTGCGTT	<i>telN</i>

Material

Sequenzierprimer N15-S3	CAGGGTGAATTTGCCGTTTCAGGAAAG	<i>telN</i>
Sequenzierprimer N15-S4	CGCTTATGAGATGTTCTTCCGCG	<i>telN</i>
Sequenzierprimer N15-S5	CCTGGAGTTTGCCGCTGATGC	<i>telN</i>
Sequenzierprimer (univ., TeLET close)	GACATCCCCACTATCTAAGAACACCATAACAGAACACAACATAGGAATGC	pmsl-lang

^a Abweichungen vom Wildtyp *telN* Gen sind **fett** gedruckt.

^b Abweichungen vom Wildtyp *telRL* sind **fett** gedruckt.

^c Restriktionsschnittstellen (*Bam*HI und *Hind*III) sind durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet.

^d X = Biotin Markierung

^e Die *telRL*-Sequenz ist mit Großbuchstaben gekennzeichnet.

Oligonukleotide sind (wo notwendig) paarweise in einer Zeile aufgeführt. Die Schriftgröße wurde so gewählt, daß immer ein komplettes Oligonukleotid in eine Zeile paßt. Die bei der *next-neighbour*-Analyse benutzten Oligonukleotide sind in Abb. 33 aufgeführt.

2.3 Medien

Zur Anzucht von Bakterienzellen wurde YT-Medium verwendet:

Trypton	1 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)
Thiaminhydrochlorid [†]	0,025 mg/ml
Glucose [†]	0,1 % (w/v)
MOPS [†]	25 mM (pH 8,0)

[†] Das sterile Medium wurde mit diesen getrennt autoklavierten Substanzen versetzt.

Feste Anzuchtmedien enthielten zusätzlich 1,5 % (w/v) Agar. Selektivmedien enthielten - wenn erforderlich- Antibiotika in den angegebenen Konzentrationen:

Ampicillin (Natriumsalz, Ap)	100 µg/ml
Chloramphenicol (Cm)	10 µg/ml
Kanamycinmonosulfat (Km)	30 µg/ml
Tetracyclin-HCl (Tc)	10 µg/ml

2.4 Chemikalien und Proteine

Zur Herstellung von Medien wurden Substanzen der Firmen Difco oder Oxoid verwendet. Antibiotika und andere Medienzusätze wurden von Sigma (Ampicillin-Natriumsalz, Kanamycinmonosulfat, Thiaminhydrochlorid), Serva (Tetracyclinhydrochlorid) und Roche Biochemicals (Chloramphenicol) bezogen. 30%ige Acrylamid- und 2%ige Bisacrylamid-Lösung stammten von Roth. Elektrophoresesubstanzen wurden von Biorad bezogen. Weitere Chemikalien wurden von Aldrich (Cobalthexamin-(III)-trichlorid), Roche (Glycogen), Sigma (Ethidiumbromid), LKB (Ficoll 400), Serva (Brij-58, PEG 6.000, PEG 20.000 und Coomassie Blue R250), United States Biochemical (USB) (Harnstoff) und Biomol (X-Gal [5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid], IPTG [Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid]) und MOPS (3-(N-Morpholino-)propansulfonsäure)) bezogen. Alle benutzten, aber hier nicht aufgeführten Chemikalien und Lösungsmittel kamen von Merck (Reinheitsgrad p.A.).

Restriktionsendonucleasen (außer *HindIII*), DNA-Polymerasen (Deep Vent®, Vent® (exo⁻), Klenow Fragment (3'→5' exo⁻), T4-DNA-Polymerase) und die Enzyme Terminal Transferase, T4 DNA Ligase sowie T4 Polynucleotide Kinase waren Erzeugnisse von New England Biolabs (NEB). *HindIII*, *shrimp* alkalische Phosphatase (SAP) und DNaseI, wurden von Roche Biochemicals erworben. Proteinase K wurde von Sigma bezogen. Die Enzyme wurden, wenn nicht anders erwähnt, unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen, in den mitgelieferten Puffern eingesetzt. Als Referenzproteine wurden der Proteinmarker (3 - 212 kDa) von NEB verwendet, sowie Albumin aus Rinderserum (BSA), Ovalbumin, Aldolase und Katalase von Roche Biochemicals.

Nukleotide wurden von Roche Biochemicals, radioaktiv markierte Nukleotide von Amersham Corp. bezogen. Als DNA-Größenstandards dienten 1-kb und 123-bp Leitern von BRL. Oligonukleotide (Adaptoren, PCR-*primer*, Sequenzier-*primer*) wurden im Servicelabor des Max-Planck-Institutes für Molekulare Genetik synthetisiert.

2.5 Puffer

TE-Puffer:

10 mM Tris-HCl, pH 8,0
1 mM EDTA

TAE-Puffer:

40 mM Tris-Base
5 mM CH₃-COONa
1 mM EDTA
mit Essigsäure auf pH 7,9 eingestellt

TBE-Puffer:

90 mM Tris-Base
2 mM EDTA
mit Borsäure auf pH 8,0 eingestellt

TN-Puffer:

20 mM Tris-HCl, pH 7,5
100 mM NaCl

Glycin-Puffer:

25 mM Tris-Base
0.19 M Glycin
0.1 % SDS (w/v)

C-KEDT-Puffer:

20 mM Tris-HCl, pH 7,6
25 mM Kaliumglutamat
5 mM CaCl₂
0,1 mM EDTA, pH 8,0
1 mM DTT

Material

Puffer A (0,05 - 1 M NaCl):

20 mM Tris-HCl, pH 7,5
0,1 mM EDTA, pH 8,0
0,1 - 1 M NaCl
1 mM DTT
10 % (w/v) Glycerin

Puffer B (0,02 - 0,5 M K-Phosphat):

0,02 - 0,5 M Kaliumphosphat, pH 6,8^a
50 mM KCl
0,1 mM EDTA, pH 8,0
1 mM DTT
10% (w/v) Glycerin

^a Phosphorsäure wurde vorgelegt und mit KOH eingestellt. Die Angabe der Molarität bezieht sich auf die Konzentration an $[\text{PO}_4]^{3-}$

Puffer C (0,05 - 0,6 M NaCl):

50 mM Tris- H_3PO_4 , pH 7,0
0,05 - 0,6 M NaCl
0,1 mM EDTA
1 mM DTT
10 % (w/v) Glycerin

Ficoll-Puffer:

40 mM Tris-HCl, pH 8,0
40 % Ficoll 400
1 mM EDTA, pH 8,0
1 % (w/v) SDS
0,025 % Bromphenolblau
0,025 % Cyangrün

2.6 Sonstige Materialien

Tab. 4 Säulenmatrices

Material	Hersteller
Heparin-Sepharose Cl-6B	Pharmacia
Bio-Gel [®] HT, Hydroxylapatit	Bio-Rad
DEAE-Sephacel	Amersham Corp.
Phosphocellulose P11	Whatman
Ni-NTA-Superflow	QIAGEN

Tab. 5 Diverse Materialien

Material	Hersteller
Dialyseschläuche	Roth
PVDF-Membran, Hybond-XL [™] Nylon-Membran	Amersham Corp.
3MM-Chromatographiepapier	Whatmann