Lang gewacht en stil gezwegen

nooit gedacht en toch afgekregen.

CENTRALE LANDBOUWCATALOGUS

0000 0086 7024

ISN= 136085-02

Promotor : dr. A. van Kammen
hoogleraar in de moleculaire biologie

Co-referent : dr. P.H. Pouwels
hoofd sectie Rekombinant DNA van het Medisch Biologisch Laboratorium TNO te Rijswijk.

hn 0201 046 C

BETTY E. ENGER-VALK

KONSTRUKTIE VAN PLASMIDEN MET GENEN VAN HET TRYPTOFAAN OPERON VAN ESCHERICHIA COLI K12 ALS GENETISCHE KENMERKEN.

Proefschrift
ter verkrijging van de graad van
doctor in de landbouwwetenschappen,
op gezag van de rector magnificus,
dr. H.C. van der Plas
hoogleraar in de organische scheikunde,
in het openbaar te verdedigen
op woensdag 27 mei 1981
des namiddags te vier uur in de aula
van de Landbouw Hogeschool te Wageningen.

ISN: 136085

BIBLIOTHEEK L.H.
06 MEI 1981
ONTV. TIJDSCHR. ADM.

Het onderzoek is uitgevoerd op het Medisch Biologisch Laboratorium (MBL) TNO te Rijswijk, en stond onder leiding van dr. P.H. Pouwels.
Het onderzoek werd gedeeltelijk gesteund door de Stichting Scheikundig Onderzoek Nederland (SON) van de Nederlandse Organisatie voor Zuiver Wetenschappelijk Onderzoek (ZWO).

NN08201, 846

STELLINGEN

1. De resultaten van Rodriquez et al., zijn niet in tegenspraak met de veronderstelling van Schaller dat het -35 gebied van een promotor het herkenninsgsgebied is voor RNA polymerase.

   Schaller, H. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 737.

   Rodriquez, H et al., (1979) Nucl. Acid. Res. 6, 3267.

2. De conclusie van Stefano et al., dat mutaties in het -35 gebied van de lac-promotor geen effect hebben op de mogelijkheid van binding van RNA polymerase aan deze promotoren, wordt door hun resultaten niet ondersteund.

   Stefano, J.E. et al., (1980) Nucl. Acid. Res. 8, 2709.

3. De door Chan en Tye voor gist beschreven methode om autonoom replicerende plasmiden te construeren, lijkt ook toepasbaar voor Aspergillus nidulans.

   Chan, C.S.M. and Tye, B.K. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6329.

4. Het is aan te bevelen om na te gaan in hoeverre het specificiteitspatroon van het enkelstrengs-specifieke endonuclease SI van Aspergillus oryzae gebruikt kan worden voor het aantonen van terminatie sekwenties.

   Lilley, D.M. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6556.

5. Bij het gebruik van nieuwe afvalwater-zuiveringsinstallaties met meer biomassa in een kleiner reactor volume moet men bedacht zijn op een grotere gevoeligheid voor pieklozingen van giftige stoffen.

6. Winstbejag heeft voor de molekulaire biologie een nadelige invloed op de uitwisseling van wetenschappelijke gegevens.

7. In de wedloop tussen laboratoria om specifieke genen te kloneren, is de medewerking van de organisch chemicus beslissend.

8. Het stijgen van aandelen noteringen van bedrijven, die zich bezig houden met de biotechnologie, houdt meer verband met de verwachting die er bij de beleggers leeft, dan met de tot nu toe verkregen resultaten.

9. Deeltijdarbeid voor mannen moet geen uitzondering, maar regel zijn, aangezien dit tot een eerlijker werkverdeling zowel thuis als op het werk leidt.

10. Een fluitje van een cent is volgend jaar niet te betalen.

11. DNA is tòch voordeliger!

Proefschrift van B.E. Enger-Valk
Constructie van plasmiden met genen van het tryptofaan operon van *Escherichia coli* K12 als genetische kenmerken.
Rijswijk, 27 mei 1981.

INHOUD

		blz.
Verklarende woordenlijst		1
Proloog		3
Inleiding		6
Hoofdstuk 1	Construction of new cloning vehicles with genes of the tryptophan operon of *Escherichia coli* as genetic markers. Gene 9, 69-85 (1980).	30
Hoofdstuk 2	The construction of new vectors for the cloning of promotors. to be published in Gene	47
Hoofdstuk 3	The construction of new vehicles for the cloning of transcription termination signals. to be published in Nucleic Acid Research.	62
Hoofdstuk 4	The importance of the -35 and -10 region for the functioning of the promotor of the tetracycline resistance gene.	81
Hoofdstuk 5	Summary and discussion.	99
Samenvatting		109
Epiloog		111
Curriculum vitae		113

VERKLARENDE WOORDENLIJST

"Blunt"	aanduiding voor een stomp uiteinde van een DNA fragment; beide DNA strengen zijn exakt even lang, waardoor het uiteinde "recht" is (1).
CAP faktor	eiwit dat betrokken is bij de initiatie van de eiwit synthese (28).
Expressie	de omzetting van de genetische kode in eiwit.
Gekonserveerde DNA sekwentie	een gemiddelde sekwentie met op iedere plaats een nucleotide dat daar het meest voorkomt.
Gen	DNA fragment dat kodeert voor een bepaald eiwit.
Genoom	alle genen van een organisme of een individu.
Inverted repeat	nucleotide sekwentie die in omgekeerde volgorde nog een keer voorkomt.
Knippen	het fragmenteren van DNA door de werking van een restriktie-enzym.
Ligase	het enzym dat de gefragmenteerde DNA molekulen kan koppelen.
Ligeren	het koppelen van DNA molekulen.
Mutatie	verandering in de volgorde van het DNA.
Operator	nucleotide sekwentie in DNA waar de repressor kan binden ter kontrole van een aangrenzend gen of groep van genen.
Operon	een eenheid, bestaande uit één of meer genen en één regelgebied.
Oorsprong van replikatie	DNA gebied waar de replikatie (vermenigvuldiging) kan beginnen.
Plasmide	extrachromosomaal, autonoom replicerend, cirkulair DNA molekuul.
Pribnow box	gekonserveerde sekwentie (TATAATG) in de promotor; genoemd naar de "ontdekker" Pribnow.

Promotor	nucleotide sekwentie in DNA waar RNA polymerase kan binden en transkriptie kan initiëren.
Repressor	het eiwit dat bindt aan een regulatie sekwentie (operator) zodat RNA polymerase niet aan de promotor kan binden.
Regelelement	DNA gebied betrokken bij de regulatie van de transkriptie van een gen (promotor, terminator).
Restriktie-enzym	enzym dat specifieke nucleotide volgorde in het DNA herkent, en ter plaatse een breuk in beide strengen aanbrengt; er zijn er al vele geïsoleerd (2).
Sekwentie	volgorde waarin de 4 verschillende nucleotiden in het DNA voorkomen.
Terminator	nucleotide sekwentie in het DNA die het einde van de transkriptie aangeeft.
Transkriptie	de omzetting van de DNA kode in de RNA kode; wordt uitgevoerd door RNA polymerase.
Translatie	omzetting (vertaling) van RNA in eiwit, waarbij de nucleotide volgorde van het RNA de volgorde van de aminozuren voor dat eiwit bepalen.
Vektor	DNA molekuul dat gebruikt wordt om een ander DNA fragment aan te koppelen en daarna in een cel te brengen; een plasmide is een voorbeeld van een vektor.

PROLOOG

De rekombinant DNA techniek, die het mogelijk maakt specifiek kleine stukjes van het erfelijk materiaal van het ene mikro-organisme te integreren in dat van een ander mikro-organisme, betekent een doorbraak voor het onderzoek in de molekulaire biologie. In het verleden kon men in het DNA van een mikro-organisme wel veranderingen - zoals deleties of mutaties - aanbrengen, maar de mogelijkheden om specifieke DNA fragmenten naar een ander organisme over te brengen waren zeer beperkt. Voor de overdracht van genetisch materiaal wordt gebruik gemaakt van kleine DNA molekulen, de vektoren. De enzymen, die gebruikt worden voor de behandeling van het DNA, vormen een ander belangrijk hulpmiddel voor de rekombinant DNA techniek. Dit zijn o.a. restriktie-enzymen, die het DNA heel specifiek kunnen fragmenteren en andere enzymen, zoals ligases, die gebruikt worden om deze fragmenten aan het vektor DNA te koppelen. Met behulp van deze techniek kunnen er heel gericht veranderingen in het genetisch materiaal van een organisme aangebracht worden. Dit betekent dat we mikro-organismen ook zodanig kunnen veranderen dat ze soortvreemde produkten kunnen maken. Ook kunnen in mikro-organismen veranderingen aangebracht worden waardoor ze stoffen in veel grotere hoeveelheden aanmaken dan ze van nature doen.

Behalve voor de konstruktie van organismen die bijzondere produkten maken, wordt de rekombinant DNA techniek ook gebruikt voor onderzoek naar de struktuur en funktie van het DNA in de komplexe zoogdiercellen, waaronder die van de mens. Dit is van belang voor het bestuderen van processen, zoals differentiatie en celgroei. Mogelijk kan de rekombinant DNA techniek ook bijdragen aan het vroegtijdig opsporen van erfelijke afwijkingen ten behoeve van prenatale diagnostiek (1).

De rekombinant DNA techniek gaf, vooral in de eerste jaren na de ontdekking ervan, aanleiding tot heftige diskussies, zowel in de wetenschappelijke wereld als daarbuiten. Deze diskussies hadden vooral betrekking op de mogelijkheden en de risiko's die verbonden zouden kunnen zijn aan het gebruik van deze techniek. De rekombinant DNA techniek wordt door velen beschouwd als het ingrijpen van de mens in een natuurlijk proces. Het is echter de vraag of deze wijze van veranderen wel zo onnatuurlijk is. Restriktie-enzymen komen van nature in veel organismen voor en hun funk-

tie in de natuur is mogelijk ten dele gelijk aan die waarvoor ze in de reageerbuis gebruikt worden. Bovendien is het heel goed mogelijk dat het interspecies rekombinatie proces een belangrijke rol heeft gespeeld in de evolutie. De natuurlijke overdracht van genetisch materiaal tussen verschillende organismen blijkt veel vaker voor te komen dan 10 jaar geleden werd verondersteld. Op grond van de resultaten van uitgebreide onderzoekingen met organismen die rekombinant DNA bevatten, wordt nu aangenomen dat de risiko's, die men aanvankelijk had voorspeld, ongegrond zijn.
Velen zijn er van overtuigd dat de rekombinant DNA techniek nieuwe perspektieven kan bieden voor de biotechnologie. In de biotechnologie worden de verschillende wetenschappen, zoals de biochemie, de mikrobiologie, en de procestechnologie geïntegreerd toegepast, ten behoeve van de produktie van produkten zoals enzymen en hormonen. Vooral op het gebied van de gezondheidszorg, maar ook op het gebied van de industrie en de landbouw verwacht men velerlei toepassingen. In het bijzonder denkt men daarbij aan i) de produktie van geneesmiddelen, antibiotica en vaccins, en ii) de produktie van enzymen en chemicaliën, zoals b.v. zoetstoffen. Andere toepassingen die mogelijk pas veel later gerealiseerd kunnen worden zijn o.a. i) de verwerking van afval tot energie, veevoeders of suikers en ii) de verbetering van landbouwgewassen. Naar verwachting zullen er binnen enkele jaren produkten op de markt verschijnen, die alleen maar - in die grote hoveelheden - geproduceerd kunnen worden door, m.b.v. de rekombinant DNA techniek veranderde, mikro-organismen. Enkele hormonen, zoals menselijk insuline, menselijk groeihormoon en somatostatine kunnen thans door mikro-organismen in betrekkelijk grote hoeveelheden gesynthetiseerd worden (2, 3, 4). Ook heeft men kans gezien een mikro-organisme te konstrueren dat het bij de mens werkzame interferon produceert (5). Interferon is een eiwit waarvan men aanneemt dat het virusinfekties bestrijdt en mogelijk ook werkzaam is tegen bepaalde vormen van kanker. Op het gebied van vaccinbereiding zijn m. b.v. de rekombinant DNA techniek belangrijke vorderingen gemaakt. Ten behoeve van de vaccinbereiding tegen het mond- en klauwzeervirus is er een mikro-organisme gekonstrueerd dat het erfelijk materiaal bevat, dat kodeert voor een manteleiwit van dit virus (6).

In Nederland wordt de rekombinant techniek op verscheidene laboratoria van universiteiten en bedrijven voor het onderzoek gebruikt. Ook in het

Medisch Biologisch Laboratorium (MBL), waar het in dit proefschrift beschreven onderzoek is uitgevoerd, wordt deze techniek sinds enkele jaren toegepast. In 1978 werd in het MBL een begin gemaakt met het gebruik van de rekombinant DNA techniek voor het op dat ogenblik lopende onderzoek naar de regulatie van de genexpressie bij bakteriën.
Inmiddels was er binnen TNO overleg op gang gekomen over een programma op het gebied van de biotechnologie. Dit heeft geleid tot plannen voor de uitbouw van de bestaande biotechnologische deskundigheid binnen TNO en tot de vorming van een centrum voor rekombinant DNA onderzoek bij het MBL.
In de afgelopen jaren is op het MBL voornamelijk aandacht besteed aan het ontwikkelen van methoden voor de rekombinant DNA techniek. Wij hebben ons vooral bezig gehouden met het konstrueren van verschillende vektoren voor de bakterie E.coli. Er zijn vektoren gemaakt ten behoeve van het toegepaste onderzoek , d.w.z. vektoren die gebruikt kunnen worden voor produktie van een bepaalde stof. Daarnaast is ook aandacht besteed aan de konstruktie van vektoren ten behoeve van het fundamenteel gerichte onderzoek naar de regulatie van de genexpressie.

LITERATUUR

1. Kan, Y.W. and Dozy, A.M. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5631.
2. Crea R. et al., (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5765.
   Goeddel D. et al., (1979) Proc. Natl. Acad. Sa. USA 76, 106.
   Gait M.J. (1979) Nature 277, 429.
3. Goeddel D. et al., (1979) Nature 281, 544.
4. Itakura K. et al., (1977) Science 198, 1056.
5. Goeddel D.V. et al., (1980) Nucl. Acid Research 8, 4057.
   Derynck R. et al., (1980) Nature 287, 193.
   Nagata S. et al., (1980) Nature 284, 316.
   Goeddel D.V. (1980) Nature 287, 411.
   Nagata S. et al., (1980) Nature 287, 401.
6. Küpper H. et al., (1981) Nature 289, 555.

INLEIDING

Rekombinant DNA techniek

Alle erfelijke informatie van een cel (het genoom) is gerangschikt in eenheden - de genen -, waarbij iedere eenheid de informatie bevat voor één eigenschap. M.b.v. de rekombinant DNA techniek kan dit genetische materiaal (DNA) van het ene organisme uitgewisseld worden met dat van een ander organisme. Door de uitwisseling van erfelijk materiaal kunnen er dus eigenschappen van het ene organisme overgebracht worden naar het andere organisme. Onderzoek waarbij gebruik gemaakt wordt van de rekombinant DNA techniek wordt ook vaak "genetic engineering" of "genetische manipulatie" genoemd. De definitie van dit soort onderzoek luidt : de vorming van nieuwe kombinaties van erfelijk materiaal door insertie van DNA molekulen in één of ander vektor systeem waardoor ze geïnkorporeerd kunnen worden in een gastheer waarin ze normaal niet voor zullen komen.
Uit het bovenstaande is het duidelijk dat de mogelijkheid tot inbouw van genetisch materiaal in een cel van wezenlijk belang is voor de rekombinant DNA techniek. D.m.v. bakteriofagen of virussen kunnen fragmenten van het genetische materiaal overgedragen worden van de ene cel naar de andere cel (=transduktie). Bij infektie van een cel door een faag of een virus kan een klein fragment van het chromosoom ingebouwd worden in het DNA van die faag of virus. Wanneer vervolgens de faag of het virus een tweede cel infekteert gaat het extra stukje chromosomale genetische informatie mee naar de tweede cel. Ook door konjugatie en transformatie kan het erfelijk materiaal van de ene cel naar de andere cel overgedragen worden. Bij konjugatie tussen twee typen cellen wordt de genetische informatie van een "mannelijke" cel overgedragen naar een "vrouwelijke" cel. Beide cellen hebben heel specifieke eigenschappen waardoor deze overdracht mogelijk is. Sommige bakterie soorten kunnen ook door transformatie exogeen DNA opnemen. Andere bakterie soorten kunnen alleen DNA opnemen als ze daartoe geschikt (kompetent) gemaakt worden d.m.v. een speciale behandeling. Bij transformatie van cellen met vreemd DNA blijkt echter vaak dat dit DNA niet geïntegreerd wordt in het acceptor DNA en daardoor verloren gaat bij voortplanting van die cel.
Genetici hebben al jaren gebruik gemaakt van de mogelijkheid om DNA over

te dragen. De genen op het chromosoom van bakteriën konden alleen gelokaliseerd worden omdat onder bepaalde omstandigheden een gedeelte van het genetische materiaal van de ene cel overgedragen kan worden naar het genetische materiaal van een andere cel. De identiteit van dat genetisch materiaal kon worden afgeleid uit de veranderingen in eigenschappen van de acceptor cel.

Het proces waarbij een gedeelte van het erfelijk materiaal van het ene genoom uitgewisseld kan worden met dat van een ander genoom wordt aangeduid met de term rekombineren. Wanneer zoals b.v. bij een kruising tussen twee mikro-organismen met verschillende eigenschappen een cel met meerdere genomen voorkomt, kan er, door rekombinatie van het DNA, een ander mikro-organisme ontstaan met een kombinatie van de eigenschappen van beide ouders. Het rekombinatie-proces werd al vele jaren gebruikt om de genetische informatie - de genen - te bestuderen, maar met de beperking dat er alleen rekombinatie binnen nauw verwante soorten kan optreden. De rekombinant DNA techniek heeft deze beperking niet, omdat m.b.v. deze techniek een DNA fragment van ieder willekeurig organisme in vitro gerekombineerd kan worden met het DNA van een ander organisme. Bovendien kunnen m.b.v. de rekombinant DNA techniek specifieke, goed gedefiniëerde DNA fragmenten overgedragen worden, terwijl in het verleden deze specificiteit veel minder was. Na de in vitro rekombinatie kan het DNA weer in de cel van een organisme geïntroduceerd worden d.m.v. transformatie. Wanneer bovendien dit gerekombineerde DNA, en daarmee ook het extra ingebouwde genetische materiaal, door deze cel vermenigvuldigd wordt, hebben we een stukje vreemd genetisch materiaal "gekloneerd".

Essentieel voor de rekombinant DNA techniek is de mogelijkheid om specifieke fragmenten te kunnen isoleren en daarvoor wordt gebruikt gemaakt van restriktie-enzymen. (1). De restriktie-enzymen (voor een recent overzicht zie (2)) die gebruikt worden bij het toepassen van de rekombinant DNA techniek herkennen unieke volgorden in het DNA (4-6 baseparen) en brengen op die plaats in beide DNA strengen een breuk aan. Wanneer DNA behandeld wordt met zo'n restriktie-enzym ontstaan er diskrete fragmenten waarvan de lengte en het aantal bepaald wordt door het voorkomen van herkenningsplaatsen voor dat restriktie-enzym in de nucleotide volgorde. De breuken in het dubbelstrengs DNA kunnen "symmetrisch" d.w.z. recht tegenover elkaar of "asymmetrisch" d.w.z. schuin tegenover elkaar, aangebracht

worden. Indien een restriktie-enzym asymmetrisch "knipt" ontstaan er DNA fragmenten met een enkelstrengs-uiteinde ("sticky") van 1 of meer basen. Worden de breuken symmetrisch aangebracht dan ontstaan er fragmenten met een stomp ("blunt") uiteinde.

DNA fragmenten verkregen door "knippen" met een restriktie-enzym, kunnen weer aan elkaar of aan een ander DNA fragment gekoppeld worden. De mogelijkheid tot koppeling wordt bepaald door de uiteinden van de verschillende DNA fragmenten. DNA fragmenten met enkelstrengsuiteinden kunnen alleen aan elkaar gekoppeld worden als de uiteinden komplementair zijn. Dit zal het geval zijn als de fragmenten verkregen zijn door het knippen met hetzelfde restriktie-enzym. Indien een fragment een stomp uiteinde heeft, kan dit gekoppeld worden aan ieder ander DNA mits ook dat een stomp uiteinde heeft. Wanneer het uiteinde van een DNA molekuul geen geschikt uiteinde heeft, kan daar in vitro een ander uiteinde van gemaakt worden. Door koppeling van "linkers" - kleine synthetische stukjes DNA met een nucleotide volgorde voor een bepaald restriktie-enzym - aan zo'n DNA fragment kan het uiteinde veranderd worden. Daarnaast kan ook het uiteinde veranderd worden m.b.v. het enzym "terminal transferase". Dit enzym katalyseert de koppeling van nucleotiden aan het DNA uiteinde. Op deze wijze kan er aan het ene DNA molekuul een staart gemaakt worden die komplementair is met een staart aan een ander DNA fragment. Dit koppelen van DNA fragmenten - ligeren - wordt gekatalyseerd door het enzym DNA ligase. Zowel uit de bakterie E.coli als uit door bacteriofaag T4 geïnfekteerde E.coli bakteriën kan het ligase gezuiverd worden. Opvallend is dat het E.coli enzym alleen maar DNA fragmenten met "sticky" uiteinden kan koppelen terwijl het T4 ligase DNA fragmenten met zowel "sticky" als "blunt" uiteinden kan koppelen.

Van nature hebben de cellen van mikro-organismen of van hogere organismen een afweermechanisme tegen "vreemd" DNA. In het algemeen zal een extra ingebracht DNA molekuul, dat door de cel als "vreemd" DNA herkend wordt, afgebroken worden. Wanneer echter het "vreemde" DNA gekoppeld wordt aan een DNA molekuul dat door die cel als "eigen" wordt beschouwd, zal de cel het extra DNA fragment veelal wel accepteren. Het DNA molekuul dat als "hulpstuk" dient voor het introduceren van vreemd DNA in een cel wordt de vektor genoemd. M.b.v. restriktie-enzymen en DNA ligase kan een DNA fragment in vitro eerst gekoppeld worden aan zo'n vektor en vervolgens d.m.v.

een transformatie experiment in een cel worden gebracht.
Vektoren nemen dan ook een heel belangrijke plaats in bij de rekombinant DNA techniek omdat ze essentieel zijn voor het overbrengen van stukken DNA van het ene organisme naar het andere. De vektoren, waar men bij voorkeur gebruik van maakt, zijn kleine DNA molekulen die zich naast het chromosomale DNA in de cel kunnen vermenigvuldigen. Deze afzonderlijke vermeerdering - d.w.z. de vektor blijft als afzonderlijk molekuul in de cel bestaan - heeft het voordeel dat het vektor DNA gemakkelijk uit de cel geïsoleerd kan worden, en kan worden gescheiden van het veel komplexere chromosomale DNA.
Voor het kloneren in cellen van hogere organismen maakt men veelal gebruik van kleine virussen, zoals SV40. Dit virus DNA wordt door cellen van hogere organismen niet als "vreemd" beschouwd. Het cirkulaire DNA van deze virussen is in vitro gemodificeerd, waardoor er extra DNA aan het virus DNA gekoppeld kan worden (3).
Voor mikro-organismen, zoals de bakterie Escherichia coli (E.coli), worden bakteriofagen of plasmiden als vektor gebruikt. Zowel bij het bakteriofaag systeem - waarvoor faag λ gebruikt wordt - als bij het SV40 systeem kunnen alleen DNA fragmenten van een bepaalde grootte ingebouwd worden. De grootte van het DNA fragment dat ingebouwd kan worden in het faag- of virus DNA wordt bepaald door de grootte van het DNA dat ingepakt moet worden in eiwitten om een faag- of virusdeeltje te kunnen vormen. Een te groot of een te klein DNA molekuul leidt tot een inkompleet faag (virus) deeltje. Daardoor kunnen alleen fragmenten van een bepaalde grootte opgenomen worden.
M.b.v. het tweede vektorsysteem voor mikro-organismen, waarbij gebruik gemaakt wordt van plasmiden, kunnen fragmenten van iedere lengte gekloneerd worden. In de afgelopen jaren is daarom veel aandacht besteed aan de ontwikkeling van dit vektorsysteem voor bakteriën en lagere eukaryoten. Dit heeft geleid to de konstruktie van een uitgebreid skala van plasmiden voor zeer uiteenlopende organismen zoals Escherichia coli (4, 14), Bacillus subtilis (5), Saccharomyces (6), Cyanobacteriën (7) en Streptomyces (8).

Uit het voorgaande is het duidelijk dat het vektor systeem een essentieel onderdeel is van de rekombinant DNA techniek en dat daarbij de plasmiden

een belangrijke rol spelen. Het plasmide systeem zal dan ook wat uitvoeriger besproken worden. Aangezien met name het plasmide systeem voor de bakterie E.coli erg goed ontwikkeld is, zal alleen dit systeem besproken worden. Ook in de rest van de inleiding zal alleen het onderzoek en de kennis m.b.t. deze bakterie besproken worden.

Plasmiden als vektoren voor de rekombinant DNA techniek.

Plasmiden zijn cirkulaire DNA molekulen die voorkomen naast het chromosomale DNA. Ze zijn in het algemeen 100-1000 x zo klein als het chromosomale DNA en komen afhankelijk van het soort plasmide, in één of meer kopieën per cel voor (9). Plasmiden komen van nature bij lagere organismen voor, maar zijn meestal niet nodig voor de groei van het organisme. Ze zijn ontdekt toen bleek dat er bij de behandeling van bakterie-infekties met een antibioticum vaak bakterie stammen ontstonden die resistent waren tegen dat antibioticum en ook tegen andere antibiotica en dat deze eigenschappen overgedragen konden worden naar andere bakterie stammen. Pas veel later bleek dat deze resistentie kenmerken gelegen zijn op een extra chromosomaal DNA molekuul (het R plasmide) dat veel overeenkomst vertoont met het F plasmide. Het F plasmide is een DNA molekuul dat zichzelf kan overdragen van de ene cel naar de andere -een acceptor-cel en bij deze overdracht bovendien eigenschappen van de donor cel mee kan nemen. Het autonome karakter van de R en F plasmiden d.w.z. het vermogen om zich te kunnen vermenigvuldigen zonder dat ze daarvoor deel hoeven uit te maken van het chromosomale DNA, is een gevolg van de aanwezigheid van een replikatie oorsprong.DNA molekulen die geen replikatie oorsprong hebben zullen bij vermenigvuldiging van de cel segregeren en daardoor op den duur verloren gaan. Door de specifieke struktuur van zo'n replikatie oorsprong kan een plasmide zich meestal alleen vermenigvuldigen in het organisme waar het van nature in voorkomt. De aanwezigheid van zo'n replikatie oorsprong is dus van essentieel belang voor een plasmide.
Het aantonen van plasmiden was aanvankelijk alleen mogelijk m.b.v. enkele genetische experimenten. R en andere plasmiden konden toen alleen aangetoond worden door de aanwezigheid van bepaalde kenmerken op deze plasmiden zoals b.v. resistentie tegen een antibioticum. Later bleek echter dat

niet alle plasmiden selekteerbare kenmerken hebben. Deze plasmiden konden dan ook alleen maar aangetoond worden door gebruik te maken van biochemische methoden voor het isoleren en karakteriseren van deze DNA molekulen. De mogelijkheid om plasmied DNA te zuiveren, zodat vervolgens het DNA gekarakteriseerd kan worden, is essentieel voor het gebruik van een plasmide als kloneringsvektor. De vektor moet immers in vitro gekoppeld worden aan een ander DNA fragment.

De R en F plasmiden zijn meestal erg groot en bevatten daardoor ook veel onbekend genetisch materiaal. Deze plasmiden zijn dan ook minder geschikt voor de rekombinant DNA techniek, maar door in vitro modifikatie zijn hiervan plasmiden gemaakt die wel bruikbaar zijn. Essentieel voor een klonerings-vektor is uiteraard het autonome karakter van zo'n plasmide d.w.z. een oorsprong van replikatie moet dus wel altijd aanwezig zijn. Behalve dit autonome karakter maken ook de volgende eigenschappen een plasmide geschikt om te kloneren: 1) laag molekuulgewicht d.w.z. zo weinig mogelijk niet essentieel genetisch materiaal, 2) enkele unieke restriktie-sites, 3) één of meerdere selekteerbare genetische kenmerken. Daarnaast kan het een voordeel zijn als het aantal kopiën van het plasmide in de cel groot is. Ter bevordering van de veiligheid van het onderzoek n.l. om ongekontroleerde verspreiding van plasmied DNA te voorkomen, wordt bovendien geëist dat het plasmide niet overgedragen kan worden naar andere bakterie soorten.

De aanwezigheid van een oorsprong van replikatie (10) op de plasmiden zorgt ervoor dat deze DNA molekulen zich kunnen vermenigvuldigen los van de replikatie van het chromosomale DNA. De aanwezigheid van een specifieke replikatie oorsprong (11) kan er bovendien voor zorgen dat de replikatie onder minder stringente kontrole staat ("relaxed control") waardoor er veel kopiën (50-80) van een plasmide per cel voor kunnen komen. Veel kopiën van een plasmide in de cel betekent ook veel kopiën van het gekloneerde gen hetgeen gunstig is wanneer men het genetische materiaal voor een bepaalde eigenschap in grote hoeveelheden wil isoleren. Een groot aantal kopieën van een gen in de cel heeft het voordeel dat er ook meer gen produkt gemaakt kan worden. Vooral wanneer het gaat om de hoge produktie van een bepaalde stof kan dit heel belangrijk zijn.

De aanwezigheid op de plasmiden van unieke herkenningsplaatsen (restriktie-sites) voor een aantal restriktie-enzymen vergroot de mogelijkheden

om DNA fragmenten te koppelen aan de vektor. Men maakt daarom veelal gebruik van plasmiden die van nature deze restriktie-sites al bezitten, of die daarvan voorzien zijn door in vitro modifikatie van het DNA (9).
Essentieel voor het gebruik van een plasmide als vektor is de mogelijkheid tot selektie van bakteriën die het plasmide hebben opgenomen. Bij een transformatie experiment zal na het kompetent maken van de cellen slechts een fraktie van de cellen van de gehele bakteriekultuur één of meerdere plasmied DNA molekulen opnemen. Wil men deze cellen onderscheiden van de rest dan zullen ze een kenmerk moeten hebben dat de oorspronkelijke bakteriën niet hebben. Door de aanwezigheid van een genetisch kenmerk op zo'n plasmide kunnen de plasmide bevattende bakteriën dus eenvoudig onderscheiden worden van de bakteriën die geen plasmied DNA hebben. Daarom is het noodzakelijk dat het plasmide één of meer genetische kenmerken draagt. De resistentie genen zoals die voorkomen bij de R faktoren zijn bijzonder geschikt als selektie kenmerk omdat de laboratoriumstammen van nature gevoelig zijn voor antibiotica. Voor het kloneren van genetisch materiaal is het niet alleen noodzakelijk dat men plasmide bevattende bakteriën kan selekteren, maar men dient ook te beschikken over een mogelijkheid tot selektie van rekombinanten d.w.z. van die bakteriën die plasmide met een extra DNA fragment hebben. Een direkte, positieve selektie voor de genetische informatie, gelegen op het ingebouwde DNA fragment is soms, maar meestal niet mogelijk. In zo'n geval biedt een negatieve selektie, die verkregen wordt door het kloneren in een resistentie gen, uitkomst. Door insertie van een DNA fragment in een gen zal dat gen geen funktioneel produkt meer kunnen opleveren, zodat de bakterie die zo'n plasmide bevat een eigenschap mist. Van deze manier van selekteren kan uiteraard alleen gebruik gemaakt worden wanneer het plasmide nog een tweede genetisch kenmerk heeft, waardoor de plasmide bevattende bakteriën nog steeds geselekteerd kunnen worden.
Ter beveiliging van het onderzoek waarbij gebruik gemaakt wordt van gerekombineerd DNA moet de kans op overdracht van dit DNA naar een ander organisme zo klein mogelijk zijn. Daarom wordt vrijwel uitsluitend gebruik gemaakt van plasmiden die de zogenaamde fertiliteitsfaktoren missen (12), en daardoor niet zelf overdraagbaar zijn. Deze faktoren, gekodeerd door de tra genen, komen wel voor op een F plasmide. Zelfs wanneer een plasmide deze tra genen mist, d.w.z. niet zelf-overdraagbaar is, kan een plas-

mide nog wel overgedragen - gemobiliseerd - worden. Bij aanwezigheid van twee plasmiden in een cel waarvan er één zelfoverdraagbaar is kan dit plasmide de produkten van de overdrachtsfaktoren leveren aan het andere plasmide om zo dit laatste plasmide te "mobiliseren". Voor het mobiliseren van een plasmide dat niet zelf-overdraagbaar is moeten er twee kenmerken voorkomen. Allereerst moet het plasmide zelf een aantal eiwitten, gekodeerd door de mob genen, leveren nodig voor de mobilisatie. Daarnaast is ook de oorsprong van mobilisatie - een bepaalde sekwentie op het DNA - nodig voor de mobilisatie van zo'n plasmide (13).

De tot op heden veel gebruikte plasmiden zijn alle afgeleid van het plasmide ColEI, dat tot de groep van de relaxed plasmiden behoort (11). Door in vitro modifikaties zijn hieruit plasmiden gemaakt die aan bovenstaande eisen voldoen. Het plasmide pBR322 bijv. is een klein plasmide dat voorkomt in 30-50 kopieën per chromosoom en niet, of nauwelijks, overgedragen kan worden naar andere organismen (14). Het plasmide draagt twee goed selekteerbare kenmerken t.w. het gen voor ampicilline resistentie en het gen voor tetracycline resistentie. In beide genen komen één of meer herkenningsplaatsen voor restriktie-enzymen voor.

Behalve antibioticum resistentie kenmerken kunnen ook andere genetische kenmerken gebruikt worden bij de selektie voor plasmide bevattende bakteriën. Daarbij wordt dan gebruik gemaakt van bakteriën die, door mutaties in het chromosomale DNA, bepaalde eigenschappen verloren hebben. Wanneer zo'n bakterie b.v. het vermogen om een suiker te vergisten of om een aminozuur te maken heeft verloren, kan deze eigenschap hersteld worden door een plasmide te introduceren dat wel het funktionele gen draagt. Het vermogen om het ontbrekende kenmerk te herstellen kan dan als selektie voor het plasmide gebruikt worden.

Door Casadaban en medewerkers (15) en Ptashne en medewerkers (16) zijn plasmiden gekonstrueerd met het gen voor het enzym β-galactosidase als genetisch kenmerk. Het vermogen van de bakterie om lactose te vergisten kan dan dienen als selektie voor de aanwezigheid van een plasmide.

In dit proefschrift wordt de konstruktie beschreven van plasmiden die genetische kenmerken bevatten voor de biosynthese van tryptofaan.

Expressie van genetische informatie

Indien we een bepaald genetisch kenmerk gekloneerd hebben, is het meestal de bedoeling dat de bakterie deze informatie omzet in een produkt, t.w. een eiwit. De omzetting van de genetische informatie, in kode opgeslagen in DNA, in eiwit (expressie) verloopt in twee stappen. Het DNA wordt eerst overgeschreven in boodschapper RNA (mRNA; transkriptie) en dit mRNA wordt daarna "vertaald"in eiwit (translatie).
Hoewel bakteriën, als behorende tot de groep van lagere organismen, vaak als "eenvoudig" worden beschouwd, blijkt de regulatie van gen expressie verre van eenvoudig. De bakterie heeft de beschikking over een zeer verfijnd reguleringssysteem, zodat niet alle aanwezige genetische informatie voortdurend tot expressie wordt gebracht, maar alleen wanneer daar behoefte aan is. Aangezien in bakteriën de efficiëntie van de expressie, d.w.z. de efficiëntie waarmee het eiwitprodukt gemaakt wordt, veelal gekontroleerd wordt in de eerste stap zal alleen aandacht besteed worden aan het proces van transkriptie.

Transkriptie

De specificiteit van transkriptie, d.w.z. het op de juiste plaats starten en eindigen van de RNA synthese, wordt bepaald door gebieden - de regelelementen - op het DNA. Bij bakteriën komt het vaak voor dat de expressie van verschillende genen gekoördineerd verloopt, doordat deze genen gekontroleerd worden door hetzelfde regelelement. Zo'n verzameling van genen met één regelelement - een operon - bevat vaak de genetische informatie voor enzymen die nodig zijn voor de synthese van één eindprodukt, bijv. een aminozuur. Voorbeelden daarvan zijn o.a. het tryptofaan (trp) operon (17; Fig. 1) en het histidine operon (18).

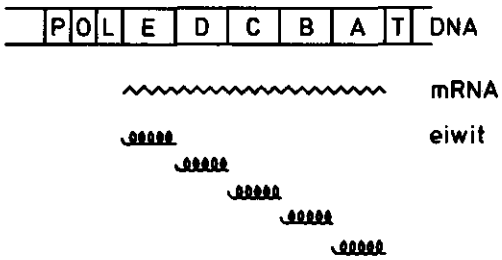

Fig. 1. Struktuur van het trp operon
Verklaring: P = promotor; O = operator; L = leader (zie tekst); T = terminator; E, D, C, B, A = de trp genen.

Bepaalde nucleotiden volgorden in het DNA kunnen hierbij als startplaats (promotoren) en andere als stopplaats (terminatoren) voor de RNA synthese funktioneren. Het regelelement, gelegen vlak voor de genen bevat behalve een promotor waar de initiatie van transkriptie plaats vindt vaak ook nog een DNA gebied - een operator - dat nodig is voor de regulatie van de transkriptie. Zo'n operator ligt meestal vlak na of maakt deel uit van de promotor sekwentie (Fig. 2).

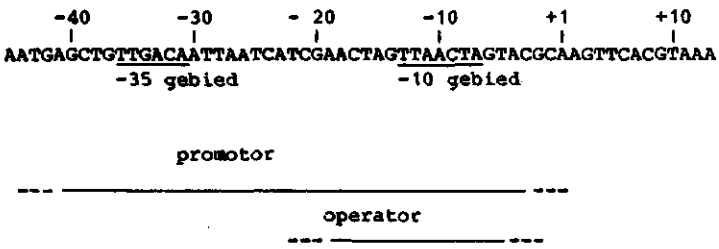

Fig. 2. Het promotor-operator gebied van het trp operon.
De nucleotiden zijn genummerd vanaf het startpunt van het RNA molekuul (+1). De overlappende sekwenties van de promotor en operator zijn aangegeven. De gekonserveerde sekwenties gelegen op -10 en -35 in de promotor zijn onderstreept.

Voor de synthese van een "korrekt" mRNA molekuul is het nodig dat de RNA synthese op de juiste plaats op het DNA begint, de kode afleest en daarna op de goede plaats eindigt. Al deze stappen, initiatie, elongatie en terminatie van mRNA synthese worden uitgevoerd door één enzym, het RNA polymerase. Zowel bij de initiatie als bij de terminatie (van RNA synthese) zijn vaak nog andere eiwitten betrokken. Het model dat is opgesteld voor de RNA synthese ziet er als volgt uit (voor een overzicht, zie 19):

1. het aftasten van het DNA door RNA polymerase naar specieke strukturen behorend bij een promotor;
2. binding van het RNA polymerase aan het DNA van het promotorgebied (gesloten komplex);
3. overgang van een gesloten komplex naar een veel stabieler (open) komplex door ontwinding van het DNA over een lengte van 8-10 baseparen (isomerizatie, 20);
4. initiatie van RNA synthese;
5. verlenging (elongatie) van de RNA keten ;
6. terminatie van de RNA keten op een specifieke plaats (de terminator);
7. dissociatie van RNA polymerase van het DNA.

De funktie van een DNA gebied, d.w.z. of dat gebied als promotor of als terminator kan fungeren wordt bepaald door de basevolgorde van zo'n gebied (21).

Uit de vergelijking tussen sekwenties van een groot aantal promotoren blijkt duidelijk dat er veel overeenkomsten in de sekwentie van promotoren voorkomen (voor een overzicht, zie 22). Pribnow (23) en Schaller (24) ontdekten dat in promotoren op een afstand van ongeveer 10 baseparen (bp) stroomopwaarts van het startpunt van het RNA molekuul een homologe nucleotide sekwentie voorkomt, die overéénkomt met de sekwentie TATAATG (Fig. 2). Deze homologe volgorde - gekonserveerde volgorde- wordt aangeduid als de Pribnow box of het "-10 gebied". Zonder uitzondering blijkt bij alle promotoren op de 6e plaats van deze struktuur een T residu aanwezig te zijn. Op andere plaatsen in deze sekwentie kunnen wel afwijkingen voorkomen. Ook in het gebied dat op 35 baseparen stroomopwaarts ligt, komt zo'n "gekonserveerde" basevolgorde (TTGACA; 25)voor. Beide gebieden op het DNA zijn betrokken bij de interaktie van RNA polymerase met het DNA. Het -35 gebied wordt beschouwd als het herkenningsgebied van een promotor voor het RNA polymerase molekuul (24), terwijl het -10 gebied

essentieel is voor de ontwinding (stap 3) van het DNA als een gesloten komplex overgaat in een open komplex (26). Bij sommige promotoren (27) is dit -35 gebied niet aanwezig maar door de interaktie van z.g. effektor molekulen (CAP faktor, 28) met het DNA kan het RNA polymerase toch binden aan het -10 gebied en een initiatiekomplex vormen (22).
Dergelijke overeenkomsten in sekwentie verwachten we eigenlijk ook rondom het gebied waar de RNA keten begint, aangezien er een hoge mate van uniformiteit voorkomt in het startnucleotide. Vrijwel iedere mRNA keten begint met een purine, waarbij A vaker voorkomt dan G. Hoewel dit startnucleotide meestal voorkomt in een zeer gekonserveerde volgorde van drie nucleotiden (CAT) blijkt de rest van de DNA struktuur in die omgeving niet gekonserveerd te zijn. De afstand van het startnucleotide tot de Pribnow box is echter weinig variabel.Het RNA begint in de meeste gevallen op de A of G die op 6-9 baseparen afstand ligt (22).
Vergelijking van sekwenties van terminatoren leert ons dat ook in deze regulatiegebieden veel overeenkomsten voorkomen (22). Het meest opvallende daarbij is de aanwezigheid van een serie A-residuen op het DNA wat resulteert in een serie U residuen aan het einde van het RNA molekuul. Dit A-gebied op het DNA maakt deel uit van of ligt vlak na een z.g. "spiegelbeeld" volgorde (inverted repeat) die meestal veel GC-rijke sekwenties bevat (29). Het RNA molekuul dat overgeschreven wordt, bevat ook deze spiegelbeeld sekwentie en kan daardoor een stabiele, sekondaire struktuur met een stam("stem") en een lus("loop") aannemen. Men veronderstelt dat de aanwezigheid van de "stem"en "loop" struktuur in het RNA ervoor zorgt dat het RNA polymerase molekuul niet verder kan gaan, en stopt aan het einde van de serie U-residuen (30). De aanwezigheid van zo'n "stem" en "loop" struktuur moet niet beschouwd worden als een barrikade voor het RNA polymerase molekuul, aangezien RNA polymerase deze sekwentie al gepasseerd is. De aanwezigheid van zo'n "stem" en "loop" struktuur in het RNA zorgt er, op de één of andere manier, voor dat het RNA polymerase molekuul in een zodanige konformatie met DNA en RNA is, dat het verder doorlezen belemmerd wordt. Behalve aan het einde van een gen kunnen terminatoren ook voorkomen tussen de promotor en een gen. Terminatoren tussen het gen en de promotor zorgen voor een extra regulatiemechanisme (attenuation, 31) van de transkriptie. De efficiëntie waarmee

een eenmaal op de promotor gestart RNA polymerase molekuul de genen bereikt, wordt in sterke mate bepaald door de aanwezigheid van zo'n terminatie gebied.

Behalve terminatie, zoals in het voorgaande beschreven, kan er ook terminatie optreden in een gen. Hoewel de RNA synthese in zo'n situatie mogelijk ook stopt door de aanwezigheid van een heel specifieke DNA sekwentie, is het niet duidelijk of deze volgorde overeenkomt met een sekwentie die voorkomt in terminatoren zoals hierboven is beschreven.

Terminatie in een gen treedt alleen onder bepaalde kondities op n.l. wanneer het betreffende RNA niet vertaald wordt. Alleen onder die kondities kan het RNA polymerase een in een gen voorkomende terminator - pseudo terminator - herkennen. Afwezigheid van translatie kan bij voorbeeld optreden wanneer er een gebrek is aan een bepaald aminozuur. Ook de aanwezigheid van mutaties in een gen kan er voor zorgen dat de translatie stopt. Dit kan optreden als de volgorde in het DNA zodanig veranderd is dat er kodons (een volgorde van 3 baseparen) ontstaan die niet koderen voor een bepaald aminozuur maar fungeren als stopkodons. Wanneer de translatie stopt, treedt het transkriptie terminatie mechanisme in werking. Wanneer b.v. bij een operon zo'n mutatie in één van de genen optreedt heeft dit tot gevolg dat genen die na de terminator gelegen zijn niet tot expressie gebracht worden. Dit verschijnsel wordt polariteit genoemd (32).

Behalve RNA polymerase zijn er een groot aantal molekulen (eiwitten en laag molekulaire verbindingen) die de transkriptie kunnen beïnvloeden. Daarvoor beschikt de cel over mechanismen die voor positieve of voor negatieve regulatie van de transkriptie kunnen zorgen (33).

Bij negatieve regulatie zorgt een repressor molekuul ervoor dat de transkriptie niet verloopt. Dit repressor molekuul kan door interaktie met het operator-gedeelte van een regulatiegebied de binding van RNA polymerase met het DNA belemmeren. Bij de negatieve regulatie kan ook nog onderscheid gemaakt worden tussen het mechanisme zoals dat voorkomt bij de biodegradatieve en biosynthetische operonen.

Eén van de best bestudeerde biodegradatieve operonen, het lactose (lac) operon van E.coli (voor een overzicht, zie 34) wordt negatief gereguleerd door de lac repressor (het produkt van het lacI gen). De repressor-operator interaktie wordt gereguleerd door het substraat (lactose) doordat in

aanwezigheid van substraat geen binding van de repressor aan het DNA plaats vindt. Zo'n operator struktuur komt ook voor bij biosynthetische operonen (35). Bij deze operonen zorgt juist de aanwezigheid van het eindprodukt voor het aktiveren van de repressor, zodat RNA polymerase dan niet kan binden aan de promotor. Bij autogeen gereguleerde operonen wordt de expressie negatief gereguleerd door het produkt van één of meer genen van het operon zelf. Door interaktie van zo'n eiwitprodukt met de operator wordt de synthese van het gen zelf en dat van de andere genen van dat operon gereguleerd (18). Het D-serine aminase operon (36) en het histidine operon (37) van E.coli worden op deze wijze gereguleerd.
Bij positieve regulatie kan, door binding van een eiwit aan DNA of aan het RNA polymerase , de interaktie van het RNA polymerase met de promotor gestimuleerd worden. Zowel het lactose (34), galactose (38) als het arabinose (39) operon worden positief gereguleerd door een komplex van cAMP met een eiwit (CAP factor, 28). Interaktie van deze faktor met het DNA verhoogt de stabiliteit van het RNA polymerase-promotor komplex, waardoor de efficiëntie van de transkriptie vergroot wordt.
Hoewel men over het algemeen veronderstelt dat de meeste faktoren die het transkriptie proces reguleren, werken op het niveau van de initiatie, komt er ook een eiwit voor dat het terminatie proces kontroleert. Bij de meeste terminatoren blijkt RNA polymerase alleen in aanwezigheid van dit eiwit - de Rho factor (40) - de terminator sekwentie te kunnen herkennen.
Uit het bovenstaande blijkt dat in de bakterie E.coli de expressie op zeer veel manieren geregeld wordt doordat er allerlei eiwitten zijn die het transkriptie-initiatie proces kunnen beïnvloeden. Toch wordt het niveau van expressie niet alleen op deze wijze bepaald, maar ook doordat er verschil bestaat in sterkte tussen de verschillende promotoren. Sommige genprodukten zullen in de cel namelijk in veel grotere hoeveelheden aanwezig moeten zijn omdat ze voortdurend nodig zijn voor bepaalde processen. Het enzym RNA polymerase bijvoorbeeld dat er steeds maar weer voor moet zorgen dat er RNA gemaakt wordt. Ook ribosomaal RNA en ribosomale eiwitten zullen in grote hoeveelheden in de cel aanwezig moeten zijn. De efficiëntie waarmee de transkriptie van dit soort genen verloopt zal dan ook veel hoger moeten zijn. Een hoog niveau van transkriptie kan veroorzaakt worden doordat die genen een sterke (efficiënte) promotor hebben d.w.z. een promotor waar transkriptie heel vaak kan starten. Hoe-

wel op grond van sekwenties de promotoren veel op elkaar lijken, kan er toch door een gering verschil in die sekwentie, een enorm verschil in efficiëntie optreden. De transkriptie van bovengenoemde genen verloopt zeer efficiënt, dankzij de aanwezigheid van een sterke promotor. Echter ook andere genen of operonen die niet voortdurend overgeschreven worden hebben soms een sterke promotor. Het trp operon is daar een voorbeeld van.

Het trp-operon

Het trp-operon (Fig. 1) van E.coli omvat 5 strukturele genen (trpE, D, C, B, A) voorafgegaan door een regulatiegebied, bestaande uit een promotor, operator en "leader" sekwentie (voor overzicht, zie 41). De promotor, operator en "leader" sekwentie zijn gelegen vlak voor het trpE gen en omvatten een gebied van ongeveer 160 bp, waarbij de operator deel uitmaakt van de promotor (Fig. 2). De 5 genen, alle betrokken bij de biosynthese van tryptofaan, worden overgeschreven in een polycistronisch mRNA molekuul van ± 6700 nucleotiden lang, waarna het mRNA vertaald wordt in equimolaire hoeveelheden van ieder genprodukt (17, 42). Terminatie van transkriptie vindt plaats aan het einde van het operon, na het trpA gen (43). Ook in deze terminator komt zo'n spiegelbeeld sekwentie voor zodat het RNA molekuul een "stem" en "loop" struktuur kan aannemen. De trp terminator is een voorbeeld van een rho afhankelijke terminator. Opvallend aan deze terminator is dat ook DNA sekwenties op meer dan 70 baseparen stroomafwaarts (d.w.z. na het einde) van het trpA gen betrokken zijn bij het terminatieproces (44).

De expressie van de trp genen, wordt voornamelijk gereguleerd op het niveau van de transkriptie-initiatie. Initiatie van transkriptie wordt negatief gereguleerd door de interaktie van de trp repressor (het produkt van het trpR gen dat elders op het chromosoom ligt) met de operator (35). Het eindprodukt, tryptofaan, aktiveert de repressor tot interaktie met het operatorgebied waardoor RNA polymerase niet meer kan binden aan de promotor (45).

Naast regulatie van transkriptie door de repressor-operator interaktie wordt synthese van RNA ook bepaald door terminatie van transkriptie in

de leader sekwentie. Deze sekwentie, gelegen tussen het promotor-operator gebied en het eerste gen, trpE , bevat een terminator (een attenuator) die ervoor kan zorgen dat een, op de promotor gestart, RNA polymerase stopt (46). Deze fijnregeling is een zeer ingewikkeld proces waar verschillende genprodukten bij betrokken zijn zoals het tryptophanyl-tRNA-synthetase, het $tRNA^{trp}$ en de transkriptie terminatiefaktor rho (47). In bakteriën met mutaties in het gen dat kodeert voor tryptophanyl-tRNA-synthetase, waardoor bijvoorbeeld de affiniteit voor tryptofaan verlaagd is, blijkt de expressie van de trp genen verhoogd te zijn. Datzelfde effekt d.w.z. verhoging van de trp gen expressie treedt op wanneer er mutaties optreden in het strukturele gen voor $tRNA^{trp}$ waarschijnlijk doordat het tRNA niet goed beladen is. Deze resultaten suggereren, dat op de één of andere manier de translatie machinerie betrokken is bij de regulatie via het attenuator mechanisme.

In het model voor het terminatie mechanisme van het trp operon nemen de vertaling van de leader sekwentie en de struktuur van het RNA transkript van datzelfde gebied een centrale plaats in (voor een recent overzicht, zie 48). Deze leader sekwentie heeft een translatie startkodon (ATG) en de informatie voor een oligopeptide (Fig. 3) met een lengte van 14 aminozuren met 2 opeénvolgende tryptofaan molekulen (49). De nucleotide volg-

```
+1        10                  30                  50                  70
|         |                   |                   |                   |
AAGTTCACGTAAAAAGGGTATCGACAATGAAAGCAATTTTCGTACTGAAAGGTTGGTGGCGCACTTCCTGA-
                            leader eiwit

     130                 150                 170                 190
     |                   |                   |                   |
- - -GGGCTTTTTTTTGAACAAAATTAGAGAATAACAATGCAAACACAAAAACCGACTCTCGAACTGCT
                                        trpE eiwit
```

Fig. 3. Nucleotide sekwentie van de essentiële gebieden van het trp leader DNA en het begin van het trpE gen DNA.
De nucleotiden zijn genummerd vanaf het startpunt van het RNA molekuul (+1). Het DNA gebied dat kodeert voor het leader eiwit (27-68) en voor het begin van het trpE eiwit (175-194) is onderstreept.

orde van het RNA molekuul dat gemaakt wordt bij transkriptie van de leader sekwentie bevat een aantal gebieden waarvan de volgorde komplementair is. Daardoor kan dit RNA molekuul verschillende strukturen aannemen. Welke struktuur wordt aangenomen hangt er van af of er translatie van het RNA plaatsvindt (50). Bij de vertaling van het RNA zorgt de aanwezigheid van een ribosoom er voor dat het RNA een zodanige struktuur aanneemt dat het RNA polymerase de terminatie sekwentie herkent en de RNA synthese daar beëindigt. Deze situatie zal zich voordoen wanneer er voldoende tryptofaan voorhanden is, zodat de twee tryptofaan kodons in de leader sekwentie vertaald kunnen worden. In die omstandigheden heeft de bakterie ook geen behoefte aan de vorming van tryptofaan. Omgekeerd, wanneer er een gebrek is aan tryptofaan, zal geen vertaling van het leadereiwit kunnen plaatsvinden. Daardoor wordt de struktuur van het RNA zo gewijzigd dat het RNA polymerase de terminatie sekwentie niet herkent en doorgaat met de transkriptie van de trp genen.

Behalve regulatie op transkriptie niveau komen er bij het trp-operon ook andere vormen van regulatie voor, zoals bijvoorbeeld metabolische regulatie (51) en translatie koppeling (52). Metabolische regulatie betekent dat de snelheid van RNA synthese en eiwitsynthese bepaald wordt door de groeisnelheid, die op zijn beurt weer bepaald wordt door de koolstofbron (bijv. glucose of glycerol) in het medium. Het mechanisme van terminatie in de attenuator blijkt verantwoordelijk te zijn voor deze koppeling. Afhankelijk van de groeiomstandigheden kan het RNA polymerase deze terminatie sekwentie wel of niet herkennen. Een andere vorm van regulatie is de gekoppelde translatie van de eerste twee genen, trpE en trpD, en mogelijk ook van de laatste twee genen, trpB en trpA (52). Hoewel ieder trp gen z'n eigen ribosoom bindingsplaats heeft, zodat er een onafhankelijke start van de eiwitsynthese plaats kan vinden, blijkt de translatie van de verschillende genen toch niet helemaal onafhankelijk te verlopen. Afwezigheid van trpE translatie kan ook de translatie van trpD verhinderen. Wanneer in het trpE gen een mutatie optreedt zodat de translatie stopt, blijkt ook de trpD translatie minder efficiënt te verlopen. De mutatie blijkt geen effekt te hebben op de trpE en trpD transkriptie en men neemt aan dat de start van de trpD translatie vertraagd is. Onder normale omstandigheden, d.w.z. als er trpE translatie is, kan het ribosoom gewoon "doorgaan" met vertalen, maar in afwezigheid van trpE translatie moet het

ribosoom voor het vertalen van trpD opnieuw beginnen (52). Deze koppeling van translatie lijkt heel logisch, aangezien de produkten van trpE en trpD tesamen het eiwitkomplex vormen dat verantwoordelijk is voor de eerste stap in de biosynthese van tryptofaan.

Omschrijving van het onderzoek

Wanneer we een gen kloneren omdat we geïnteresseerd zijn in het produkt van dat gen, zal het nodig zijn dat we dat gen ook tot expressie kunnen brengen. Dit zal in het algemeen geen problemen opleveren als een gen, afkomstig van een bakterie die verwant is aan E.coli tesamen met z'n regelelementen gekloneerd wordt in E.coli, omdat het E.coli RNA polymerase dit regelelement kan herkennen.
Wanneer we echter een vreemd gen, d.w.z. een gen uit een niet verwante bakterie of uit een hoger organisme, kloneren zal dit in veel gevallen problemen opleveren, omdat E.coli RNA polymerase de bijbehorende regelelementen niet kan herkennen. Daarnaast bestaat er bij het kloneren van een onbekend gen ook de mogelijkheid dat, door het fragmenteren van het DNA, het gen zonder regelelementen ingebouwd wordt. In deze gevallen is het dus nodig het vreemde gen onder kontrole te brengen van een E.coli regelelement. Het vreemde gen zal dan toch afgelezen kunnen worden omdat het RNA polymerase molekuul kan beginnen op een E.coli promotor en door kan lezen tot in het vreemde gen. Wanneer we een hoge expressie, d.w.z. veel produkt van dat gen, willen hebben zal het heel belangrijk zijn op welk regelelement het gen wordt aangesloten. Dit betekent dat het voor het kloneren en tot expressie brengen van genen belangrijk is dat er vektoren zijn die een sterke promotor hebben. Dit heeft geleid tot de konstruktie van z.g. expressieplasmiden, die een efficiënt regelelement zoals b.v. de lac promotor (16), de linker promotor (p^l_λ) van faag λ (53) of de trp promotor (54), bevatten.
Het gebruik van de rekombinant DNA techniek ten behoeve van produktie doeleinden is sterk afhankelijk van de kennis omtrent de struktuur en funktie van de regelelementen. Omgekeerd is het onderzoek van deze regelelementen de laatste jaren juist sterk gestimuleerd door gebruik te maken van de rekombinant DNA techniek. Ten behoeve van dit fundamentele onder-

zoek zijn er weer heel andere vektoren nodig. In dit geval is het juist heel belangrijk welk genetisch kenmerk gebruikt wordt voor het bestuderen van de expressie onder kontrole van dat gekloneerde regelelement. Ook hiervoor zijn een aantal plasmiden gekonstrueerd met de eigenschap dat ze een genetisch kenmerk hebben zonder regelelement (55). De veelheid van gegevens - met name over de regulatie van transkriptie- die beschikbaar is over het trp operon, is van groot voordeel bij het toepassen van deze genen als genetisch kenmerk voor vektoren. Daarbij komt dat er een kollektie van bakterie-mutanten beschikbaar is met mutaties in een van de trp genen, waardoor het mogelijk is om te selekteren op bakteriën die een plasmide bevatten waarin één of meer genen van het trp operon zijn ingebouwd. De mogelijkheid om de expressie van genen die onder kontrole staan van de trp promotor te reguleren, alsmede de sterkte van de trp promotor maken de regulatie elementen van het trp operon bijzonder geschikt voor het kloneren en tot expressie brengen van genetisch materiaal. Door gebruik te maken van het regelmechanisme van deze promotor - d.m.v. repressor inaktivering in afwezigheid van tryptofaan of repressor aktivering in aanwezigheid van tryptofaan - kan de expressie van een gekloneerd gen gekontroleerd worden. De promotor kan volledig "open gezet" worden indien een efficiënte expressie van een gen gewenst is of de promotor kan gedeeltelijk "gesloten" worden bijvoorbeeld indien het gevormde produkt giftig zou zijn voor de bakterie.

In hoofdstuk 1 is de konstruktie beschreven van vektoren waarin het gehele operon, of gedeelten daarvan, is ingebouwd. Door in vitro rekombinatie zijn daarvan plasmiden gemaakt met een aantal geschikte restriktiesites voor het kloneren van DNA fragmenten. Klonering van een fragment in één van de trp genen brengt met zich mee dat de expressie van een gen, dat op dat fragment ligt, onder kontrole kan komen van het trp regulatie gebied. Het bestuderen van regulatie signalen en vooral een vergelijking van de sterkte van regulatie signalen werd in het verleden vaak bemoeilijkt omdat de sterkte van de regulatie gebieden in verschillende systemen die niet met elkaar vergeleken kunnen worden, werd bestudeerd. M.b.v. de rekombinant DNA techniek kunnen echter verschillende regulatie signalen aan hetzelfde gen gekoppeld worden, waardoor er een betere vergelijking mogelijk is. De afwezigheid van een promotor voor een selekteerbare marker op een plasmide kan gebruikt worden voor het kloneren van promotor bevatten-

de DNA fragmenten voor deze marker. Omdat er zoveel bekend is over dit operon en over de genprodukten zijn de trp genen ook heel bruikbaar om er een ander regulatie gebied voor te zetten zodat dat regulatiegebied bestudeerd kan worden door de efficientie van het trp gen te bepalen.
In hoofdstuk 2 is de konstruktie van plasmiden beschreven waarop het trpA gen voorkomt zonder promotor. Hiermee kunnen promotoren gekloneerd worden door te selekteren voor Trp^+ bakteriën. De sterkte van gekloneerde promotoren kan dan op eenvoudige wijze worden vastgesteld door bepaling van het trpA gen produkt in extrakten van bakteriën die deze plasmiden bevatten.
Voor het kloneren van terminator bevattende fragmenten kunnen we uiteraard geen gebruik maken van een positieve selektie, aangezien een terminator juist iets "uitzet". Uitgaande van de veronderstelling dat een terminator tussen twee genen, die onder kontrole staan van één promotor, de expressie van alleen het tweede gen blokkeert, zijn er een aantal plasmiden gekonstrueerd (Hoofdstuk 3) die het trpE gen - als eerste - en het gen voor tetracycline resistentie - als tweede - onder kontrole van de trp promotor hebben. Bakteriën, die een plasmide bevatten waarin een terminator is gekloneerd tussen deze twee genen, kunnen herkend worden doordat deze bakteriën nog wel Trp^+ zijn, maar de resistentie tegen het antibioticum tetracycline verloren hebben. Bovendien kunnen deze plasmiden gebruikt worden voor het kloneren van terminatie signalen die verantwoordelijk zijn voor het verschijnsel polariteit.
In hoofstuk 4 is het onderzoek beschreven waarbij een van de trpA plasmiden gebruikt is om de promotor van het gen voor tetracycline resistentie te onderzoeken. Daarbij is de efficiëntie van expressie van het trpA gen gebruikt om te bepalen wat voor effekt bepaalde veranderingen, aangebracht in die promotor, hebben op de sterkte van die promotor. In de algemene diskussie (Hoofdstuk 5) wordt een overzicht gegeven van de karakteristieke eigenschappen van verschillende vektor systemen in E.coli.

LITERATUUR

1. Roberts, R. (1976) CRC. Crit. Rev. Biochem. 4, 123.
2. Roberts, R. (1981) Nucleic Acid Research 9, 75.
3. Mulligan, R. et al., (1979) Nature 277, 108.
Goff, S. and Berg, P. (1976) Cell 9, 695.
Hamer, D. (1977) in Recombinant Molecules: Impact on Science and Society (eds. Beens, R.G.Jr and Bassett, E.G.) p. 3017, Raven Press N.Y.
Mulligan, R.C. and Berg, P. (1980) Science 209, 1422.
4. Bolivar, F. et al., (1977) Gene 2, 75; Bolivar, F. et al., (1978) Gene 4, 121.
5. Ehrlich, D. et al., (1978) and Sgaramella, V. et al., (1978) in Genetic Engeneering. (eds. Boyer, H.W. and Nicosia, S.) p. 25, Elsevier North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
Ehrlich, D. et al., (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1433.
6. Hinnen, A. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929.
Struhl, K. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1035.
Beggs, J.D. (1978) Nature 275, 104.
7. Hondel, C. van den et al., (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 1570.
8. Bibb, M. et al., (1980) Nature 284, 526.
9. "Plasmids" (1979) (ed. Broda, P.), W.H. Freedom and Company Ltd. Oxford and San Fransisco.
10. Cohen, S.N. and Chang, A.C.V. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1293.
11. Helinski, D.R. and Clewell, D.B. (1972) Annu. Rev. Biochem. 40, 899.
Hershfield, V. et al., (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. 71, 3455.
12. Mitsuhashi, S. et al., (1969) J. Bact. 97, 1520.
13. Helmuth, R. and Achtman, M. (1975) Nature 257, 652.
Willetts, N.S. and McIntire, S. (1978) J. Mol. Biol. 126, 525.
Twigg, A. and Sherratt, D. (1980) Nature 283, 216.
14. Bolivar, F. et al., (1977[b]) Gene 2, 95.
15. Casadaban, M.J. et al., (1980) J. Bacteriol. 143,
Casadaban, M.J. and Cohen, S.N. (1980) J. Mol. Biol. 138, 179.
16. Bachman, K. and Ptashne, M. (1978) Cell 13, 65.
Roberts, T. et al., (1979[a]) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 760.
Guarante, L. et al., (1980) Cell 20, 543.

17. Ito, J. and Crawford, I. (1965) Genetics 52, 1303.

18. Goldberger, R.F. (1974) Sience 183, 810.

19. Chamberlin, M.J. (1974) Annu. Rev. Biochem 43, 721.
Pribnow D. (1979) in Biological Regulation of Development (ed. Goldberger, R.F.) Vol. 1, p. 219, Plenum Press N.Y.

20. Mc Clure, M.R. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5634.

21. Gilbert, W. (1976) in RNA polymerase (eds. Losick, R. and Chamberlin, M.) p. 193, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.

22. Rosenberg, M. and Court, D. (1979) Annu. Rev. Genet 13, 317.

23. Pribnow, D. (1975[a]) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 784; Pribnow, D. (1975[b]) J. Mol. Biol. 99, 419.

24. Schaller, H. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 737.

25. Takanami et al., (1976) Nature 260, 297.
Seeburg, P. (1977) Eur. J. Biochem. 74, 107.

26. Chamberlin, M.J. (1976) in RNA polymerase (eds. Losick, R. and Chamberlin, M.) p. 17, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.

27. Rosenberg, M. et al., (1978) Nature 272, 414.
Musso, R. et al., (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 106.
Smith, B.R. and Schleif, R. (1978) J. Biol. Chem. 253, 6931.
Greenfield, L. et al., (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4724.

28. Riggs, A.D. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 1222.

29. Roberts, J.W. (1976) in RNA polymerase (eds. Losick, R. and Chamberlin, M.) p. 247, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.

30. Adhya, S. et al., (1976) in RNA polymerase (eds. Losick, R. and Chamberlin, M.) p. 719, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.

31. Roberts, J.W. (1969) Nature 224, 1168.
Kasai, T. (1974) Nature 249, 523.
Artz, S.W. and Broach, J.R. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3453.
DiNocera, P.P., et al.,(1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4276.
Barnes, W.M. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4281.
Pannekoek, H., et al.,(1975) Mol. Gen.Genet. 136, 199.
Bertrand, K., et al.,(1975) Science 189, 22.
Lee, F. and Yanofsky, C. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4365.
Lee, F., et al.,(1978) J. Mol.Biol. 121, 193.
Zurawski, G., et al.,(1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5988.

Zurawski, G., et al.,(1978) Proc.Natl. Acad. Sci. USA 75, 4271.
Gardner, J.F. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1706.
Gemmill, R.M., et al.,(1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4941.

32. Franklin, N.C. and Luria, S.E. (1961) Virology 15, 299.

33. Jacob, F. and Monod, J. (1961) J. Mol. Biol. 3, 318.
Jacob, F. and Monod, J. (1961) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 26, 193.

34. "The Lactose operon" (1970) (eds. Beckwith, J.R. and Zipser, D.) Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.
Reznikoff, W.S. and Abelson, J.N.C. (1978) in The Operon, (eds. Miller, J.H. and Reznikoff, W.S.), p. 221, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.

35. Cohen, G.N. and Jacob, F. (1959) C. R. Acad. Sci. 248, 3490.
Matsuhiro, A.K. et al. (1965) J. Mol. Biol. 11, 154

36. Mc Fall, E.J. (1964) J. Mol. Biol. 9, 746.

37 Blasi, F. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2692.

38. Crombrugghe, B. de and Pastan, I. (1978) in The Operon, (eds. Miller, J.H. and Reznikoff, W.S.) p. 304, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.

39. Greenblatt, J. and Schleif, R. (1970) Nature 233, 166.
Lee, N. (1978) in The Operon, (eds. Miller, J.H. and Reznikoff, W.S.) p. 389, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.

40. Roberts, J.W. (1969) Nature 224, 1168.

41. Crawford, I.P. and Stauffer, G.V. (1980) Annu. Rev. Biochem. 49, 163.
Platt, T. (1978) in The Operon, (eds. Miller, J.H. and Reznikoff, W.

42. Imamoto, F. et al., (1965[a]) J.Mol.Biol. 13, 1169

43. Wu, A.M. and Platt, T. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5442.
Pannekoek, H. et al., (1974) Molec. gen. Genet 132, 291; Guarante, L.P. et al., (1977) J. Mol. Biol. 112, 423.

44. Wu, A.M. et al., (1980) Cell 19, 829.

45. McGeoch, D. et al. (1973) Nature 244, 137.
Squires, C. et al. (1973) Nature 245, 131.
Rose, J.K. et al. (1973) Nature 245, 133.
Rose, J.K. and Yanofsky, C. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 3134.
Oppenheim, D. et al., (1980) J. Mol. Biol. 144, 133.

Bertrand, K.L. et al., (1975) Science 189, 22.
Pannekoek, H. et al., (1975) Molec. gen. Genet 136, 199.
46. Bertrand, K. et al., (1976) J. Mol. Biol. 103, 319.
Lee, F. et al., (1976) J. Mol. Biol. 103, 383.
Bertrand, K. and Yanofsky, C. (1976) J. Mol. Biol. 10, 339.
47. Yanofsky, C. and Soll, L. (1977) J. Mol. Biol. 113, 663.
Morse, D.E. and Morse, A.N.C. (1976) J. Mol. Biol. 103, 209.
Pouwels, P.H. and Pannekoek, H. (1976) Molec. gen. Genet 140, 255.
Korn, L. and Yanofsky, C. (1976) J. Mol. Biol. 103, 395.
Korn, L. and Yanofsky, C. (1976) J. Mol. Biol. 106, 231.
48. Yanofsky, C. (1981) Nature 289, 751.
49. Lee, F. and Yanofsky, C. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4365.
50. Oxender, D. et al., (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5524.
51. Pouwels, P.H. and Pannekoek, H. (1976) Molec. Gen. Genet. 140, 255.
Morse, D.E. and Yanofsky, C. (1973) J. Mol. Biol.
52. Oppenheim, D.S. and Yanofsky, C. (1980) Genetics 95, 785.
53. Bernard, H. et al., (1979) Gene 5, 59.
54. Hallewel, R.A. and Emtage, S. (1980) Gene 9, 27.
Tacon, W. et al., (1980) Molec. gen. Genet 177, 427.
55. Crombrugghe, B. de et al., (1979) Cell 18, 1145.
Casadaban, M.J. and Cohen, S.N. (1980) J. Mol. Biol. 138, 179.
An, G. and Friesen, J.D. (1979) J. Bact. 140, 400.
West, R.W. et al., (1979) Gene 7, 271.
Widera, G. et al., (1978) Molec. gen. Genet 163, 301.
Mc Kenney, K. et al., (1981) in Gene Amplification and Analysis, vol. II, (eds. Chirikjian, J.G. and Papas, T.S.) Elsevier North Holland, in press.

Gene, 9 (1980) 69—85

© Elsevier/North-Holland Biomedical Press

CONSTRUCTION OF NEW CLONING VEHICLES WITH GENES OF THE TRYPTOPHAN OPERON OF *Escherichia coli* AS GENETIC MARKERS

(Plasmid vectors; tryptophan genes; restriction enzyme mapping)

B.E. ENGER-VALK, H.L. HEYNEKER*, R.A. OOSTERBAAN and P.H. POUWELS

Medical Biological Laboratory TNO, P.O. Box 45, 2280 AA Rijswijk Z.H. (The Netherlands)

(Received June 28th, 1979)
(Accepted September 24th, 1979)

SUMMARY

In vitro recombination techniques were used to construct a series of new cloning vehicles with genes of the tryptophan (*trp*) operon of *Escherichia coli* as selective marker. To construct these plasmids we have made a restriction cleavage map of the *trp* operon for the enzymes *Aos*I, *Ava*I, *Bgl*I, *Bgl*II, *Hin*dIII, *Hpa*I, *Pvu*II, *Sal*I, *Sst*I and *Xho*I.

The constructed plasmids pHP39, pEP392, pEP3921 and pEP3923 are derived from the amplifiable plasmid pBR345 and carry two or more genes of the *trp* operon, which are controlled by the *trp* regulatory elements. Plasmid pEP3921 (7.0 kb) carries intact *trpE* and *trpA* genes and contains single *Bgl*II and *Sst*I sites in *trpE*, a single *Hin*dIII site located between *trpE* and *trpA*, and single *Eco*RI, *Sal*I and *Xho*I sites located outside the *trp* genes. Plasmid pEP121 (12 kb) is similar to pEP3921, but has an extra selective marker conferring bacterial resistance to ampicillin. Plasmid pEP3923 (7.4 kb) comprises intact *trpB* and *trpA* genes and single *Bgl*II, *Hin*dIII, *Eco*RI, *Sal*I and *Xho*I sites. Plasmids pHP39 (9.8 kb) and pEP392 (9.8 kb) carry an intact *trp* operon and have two and one *Eco*RI site, respectively. Plasmid pHP3 (18 kb) carries an intact *trp* operon and markers for tetracycline and ampicillin resistance.

INTRODUCTION

Recombinant DNA research relies on the availability of bacterial plasmids, bacteriophages and animal viruses as vectors for the cloning of DNA frag-

* Present address: Genentech, 460 Point San Bruno Boulevard, South San Francisco, CA 94080 (U.S.A.).
Abbreviations: kb, kilo base pairs; m.wt., molecular weight.

ments. In most of the initial experiments the plasmids pSC101 (Cohen et al., 1973) and ColE1 (Hershfield et al., 1974) were used as cloning vehicles. More recently new vehicles were constructed which carry a number of unique cloning sites and are more versatile in terms of genetic markers for selection of transformants (Bolivar et al., 1977a and b).

In this paper we describe the construction and properties of a series of new cloning vehicles, carrying genes of the tryptophan (*trp*) operon of *E.coli* as selective markers. This was achieved by first cloning a DNA fragment carrying an intact *trp* operon into pBR313 (Bolivar et al., 1977a) which carries ampicillin (Ap^R)- and tetracycline-resistance (Tc^R) markers. Using the plasmid which was obtained we have made a restriction cleavage map of the *trp* operon for a number of restriction enzymes. Subsequently we have cloned the *trp* DNA fragment into pBR345, which carries no known genetic markers (Bolivar et al., 1977c). Finally the resulting plasmid was used to construct a series of plasmids with single cleavage sites for a number of enzymes, by deletion of specific regions of the *trp* operon. The presence of cleavage sites within the *trp* operon offers the opportunity to control the expression of genes that are cloned.

MATERIALS AND METHODS

Phage

Phage ϕ80*trpEA*51*imm*λ (*trpEA*51) contains the entire *trp* operon and *tonB*. It is a derivative of ϕ80*trpED*51*imm*λ (Brammar et al., 1974) in which some phage genes to the left of the *trpD* gene have been replaced by *trpCBA* and *tonB*. Genes to the left of the bacterial genes are from ϕ80 and genes to the right are from λ.

Enzymes and conditions of incubation

*Eco*RI was purchased from the Medical Research Establishment (Porton, England) or from Miles (USA) and *Ava*I, *Bam*HI, *Bgl*I and *Pvu*II from Biolabs (USA), respectively. *Sma*I was purified according to C. Mulder (pers. commun.), *Hpa*I according to Bickle et al. (1977), *Pst*I and *Hin*dIII according to Greene et al. (1978) and T4 polynucleotide ligase according to Panet et al. (1973). *Bst*EII was a gift from R.B. Meagher (Athens, USA). *Bgl*II, *Sst*I, *Sst*II and *Kpn*I were kindly donated by G. Grosveld (Univ. of Amsterdam), *Aos*I was a gift from A. de Waard (University of Leiden), *Sal*I was a gift from B. Koekman and G. Ooms (University of Leiden) and *Xho*I was a gift from J. van Embden (Bilthoven). *Eco*RI reactions were carried out in 100 mM Tris·HCl pH 7.6, 10 mM $MgCl_2$; *Sma*I reactions in 30 mM Tris·HCl pH 9.0, 15 mM KCl, 6 mM $MgCl_2$ and 7 mM β-mercaptoethanol; *Aos*I, *Ava*I, *Bgl*II, *Bgl*I, *Sal*I and *Hpa*I reactions in 6 mM Tris·HCl pH 7.6, 6 mM $MgCl_2$, 6 mM β-mercaptoethanol and 50 mM NaCl. All other incubations with restriction enzymes were carried out in 6 mM Tris·HCl pH 7.6, 6 mM $MgCl_2$ and 6 mM β-mercaptoethanol. For analytical purposes enzymatic reactions were carried

out at 37°C in a volume of 20—30 μl containing 0.1—0.5 μg DNA with sufficient enzyme to give complete digestion within 60 min.

Isolation and purification of 8.7 kb trp *DNA*

10 mg *trpEA*51 DNA was digested in a volume of 40 ml with a sufficient amount of *Eco*RI to give complete cleavage within 90 min. The DNA fragments were concentrated by alcohol precipitation and the precipitate was dissolved in 12 ml 13 mM sodium phosphate, 1.3 mM EDTA (pH 7.6) and subjected to preparative electrophoresis in 0.7% agarose. The electrophoresis buffer was 20 mM sodium phosphate, 2 mM EDTA (pH 7.6). Fractions containing the 16 kb *trp*DNA fragment were pooled (2.6 mg), dialysed against 10 mM Tris·HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.9, digested with a sufficient amount of *Sma*I to give complete cleavage within 60 min and electrophoresed in a 1% agarose gel. The fractions containing the 8.7 kb *trp*DNA fragment were pooled, dialysed against 20 mM Tris·HCl (pH 9.0), 0.1 mM EDTA, 0.2 M NaCl and absorbed to DEAE-cellulose. DNA was eluted with 0.6 M NaCl in the same buffer, dialysed against 10 mM Tris·HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.9 and stored at -20°C.

Agarose-gel electrophoresis

Analytical gel electrophoresis was performed on agarose slab gels (1% Miles agarose, unless otherwise stated), with the following dimensions: 20 cm high, 16 cm wide and 0.3 cm thick. The electrophoresis buffer (TBE) contained 90 mM Tris, 90 mM boric acid and 20 mM EDTA, pH 8.3. Electrophoresis was for 2—3 h at 100—150 V. DNA bands were made visible by staining with ethidium bromide. The molecular weight of the fragments was computed from the electrophoretic mobility, using the following molecular weight markers: the *Eco*RI fragments of phage λ (21, 6.6, 6.1, 5.9, 5.0 and 3.4 kb (Helling et al., 1974)) and an *Hpa*II fragment of phage φ80*trpEA*190 (0.59 kb). Preparative gel electrophoresis was carried out in an annular agarose gel, in an electrophoresis apparatus constructed as described by E. Southern (pers. commun.). The gel has a diameter of 13 cm and a height of 4 cm. The central hole is 3 cm in diameter. The sample (approx. 20 ml) is applied to an annular slot (width 2 mm) at 1 cm from the outer rim. The cathode compartment surrounds the gel, the anode is placed in the central hole and is surrounded by a semi-permeable membrane. Both compartments are continuously flushed with fresh buffer. The DNA molecules which have migrated into the annular space between gel and membrane are collected at regular time intervals by aspiration of the liquid in this compartment (8 ml). The collection is preceded by a reversion of the polarity for 2 min. Total duration of the electrophoresis is approx. 72 h. Collection of the fractions proceeded at 1 h intervals during the first 24 h, thereafter every 2 h.

Ligation of DNA fragments

The ligation mixtures (100—1000 μl) were incubated in a buffer contain-

ing 20 mM Tris·HCl, pH 7.6, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM dithiothreitol, 0.5 mM ATP, 1—5 μg of DNA and 10 units (1.0 μl) of T4 polynucleotide ligase. Incubation was for 16 h at 14°C.

Transformation of E. coli

Transformation of *E. coli* bacteria (W3110*trpE-A*^{del2} or C600*trpE*^{del5}, *recA*) was carried out as described by Cohen et al. (1972) or as described by Kushner (1978). After transformation bacteria were plated on minimal-medium agar plates, sometimes supplemented with 20 μg tetracycline and/or 20 μg ampicillin per ml.

Preparation of plasmid DNA

Plasmid DNA was prepared from bacteria cultivated in the presence of chloramphenicol (120 μg/ml) as described by Clewell (1972). Extraction and purification of DNA was performed according to Betlach et al. (1976).

RESULTS

(1) Isolation of trp *operon DNA*

The *trp* operon of *E. coli* consists of five contiguous genes, *trpE, D, C, B* and *A*. The first gene of the operon, *trpE*, is preceded by a regulatory region consisting of a promoter, an operator and a leader region (Bertrand et al., 1975). The regulatory region has a length of approx. 160 nucleotides, while the length of the five genes together has been estimated at approx. 6700 nucleotides (6.7 kb) (Imamoto and Yanofsky, 1967). The goal of the first part of this study was the isolation of a DNA fragment, containing the entire *trp* operon of *E. coli* with as little as possible foreign bacterial DNA, and the subsequent cloning of this fragment into a plasmid. As starting material for the isolation of *trp* operon DNA we have used DNA from *trp* transducing strains of ϕ80 and λ, which differ in the regions flanking the *trp* operon. In preliminary experiments we had found that *Eco*RI, *Bam*HI and *Sma*I do not cleave the *trp* operon. Subsequently we have mapped the cleavage sites for these enzymes in a number of ϕ80*trp* DNAs and λ*trp* DNAs. From the data obtained we have decided to isolate a fragment containing the *trp* operon by digestion with *Sma*I of DNA from phage *trpEA*51, since the cleavage sites of this enzyme are close to the left and right end of the *trp* operon in this phage DNA.

The results presented in Fig.1 show that the *trp* operon is contained in an 8.7 kb DNA fragment generated by *Sma*I or in a 16 kb fragment generated by *Eco*RI. In order to isolate the smaller fragment in pure form on a preparative scale we have chosen to carry out a two-step digestion with *Eco*RI and *Sma*I, which was expected to lead to an easier purification of the 8.7 kb fragment than celavage of *trpEA*51 DNA with *Sma*I alone.

10 mg of *trpEA*51 DNA was digested with *Eco*RI and the products were separated by preparative electrophoresis in an annular agarose gel (0.7%).

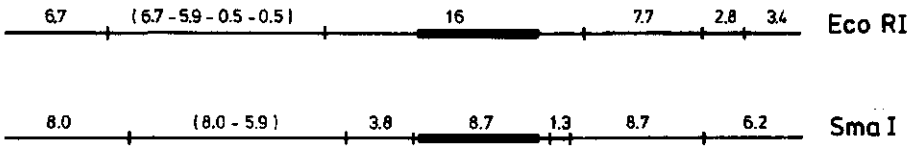

Fig. 1. Schematic representation of the restriction-cleavage map for *Eco*RI and *Sma*I of *trpEA*51 DNA. The position of the cleavage sites for *Eco*RI and *Sma*I in *trpEA*51 DNA was determined by comparison with published data on their location in λ and φ80 DNA (Helling et al., 1974; James et al., 1976; McParland et al., 1976; Thomas and Davis, 1975). The results have been confirmed by double-digestion with *Eco*RI and *Sma*I or with *BamH*I and *Sma*I. The thick black bar indicates the position of the *trp* operon. The numbers indicate fragment sizes in kb. Numbers in parentheses indicate the sizes of fragments for which the order is not known.

The material emerging from the gel at the anode-side was collected in fractions in the order of appearance. Aliquots of the fractions were subjected to analytical gel electrophoresis to study the size distribution of the DNA fragments. The fractions containing the 16 kb *trp* DNA fragment were pooled and digested with *Sma*I. The products formed were separated again by preparative electrophoresis in a 1% agarose gel and the fractions containing the 8.7 kb *trp* DNA fragment were combined. The final yield of pure *trp* DNA fragment was approx. 500 μg or 30%.

(2) Cloning of trp *operon DNA in a plasmid*

We have cloned the 8.7 kb *trp* DNA fragment in pBR313 DNA (Bolivar et al., 1977a) which contains only one cleavage site for *Sma*I. This site is located outside the two marker genes of this plasmid which determine resistance to ampicillin and tetracycline; respectively (Ap^R and Tc^R). For cloning, pBR313 DNA was digested with *Sma*I and blunt-end ligated to the 8.7 kb *trp* DNA fragment with T4 ligase, according to the procedure described by Bolivar et al. (1977a). The ligated DNA molecules were then used to transform *E. coli* bacteria which were Trp^- because of a mutation in the *trp* operon. Transformants were selected which were Trp^+ and had become resistant to both ampicillin and tetracycline. A number of transformants were obtained; one was selected for further studies (pHP3).

(3) Structure of pHP3

The original plasmid has a m.wt. of 9.5 kb; the hybrid plasmid is therefore expected to have a m.wt. of 18 kb. Furthermore, pBR313 is known to contain one *Eco*RI site. To characterize the hybrid plasmid, we have studied the number and size of the DNA fragments produced by a digestion with *Eco*RI and *Sma*I, respectively. Cleavage of pHP3 DNA with *Eco*RI yields one linear molecule with a m.wt. of approx. 18 kb, in agreement with the expectations. Digestion of pHP3 DNA with *Sma*I yields two fragments with m.wt. values of 9.5 and 8.7 kb, which correspond to the m.wt. values of the vector and the *trp* fragment, respectively. Evidently pHP3 DNA carries the entire 8.7 kb

trp DNA fragment. This conclusion is supported by the finding that bacteria with a deletion comprising the entire *trp* operon can be transformed to Trp^+ prototrophy with pHP3 DNA.

(4) The orientation of the trp *operon in pHP3*

The determination of the orientation of the 8.7 kb fragment in pHP3 DNA is based on an analysis of the products of a *Hin*dIII digestion. The results (Fig. 2) show that one *Hin*dIII site lies at a distance of 3.2 kb from one end, and a second at a distance of 2.6 kb from the other end of the 8.7 kb *trp* DNA fragment.

For the definitive determination of the orientation of the *trp* genes in the hybrid plasmid we have taken advantage of the occurrence of a *Hpa*I site in the promoter of the *trp* operon (Bennett et al., 1976). By localizing this site on the 8.7 kb *trp* DNA fragment we have been able to determine the direction of transcription of the *trp* genes in the fragment and also in the plasmid pHP3.

First a *Hpa*I restriction map was made of the 8.7 kb *trp* DNA and of pHP3 DNA. Fig. 3 shows the order of the *Hpa*I fragments of pHP3. To determine the position of the *trp* promoter (which contains an *Hpa*I site) we studied which of the four *Hpa*I cleavage sites in the 8.7 kb *trp* DNA can be protected by RNA polymerase. Binary complexes were formed between the 8.7 kb

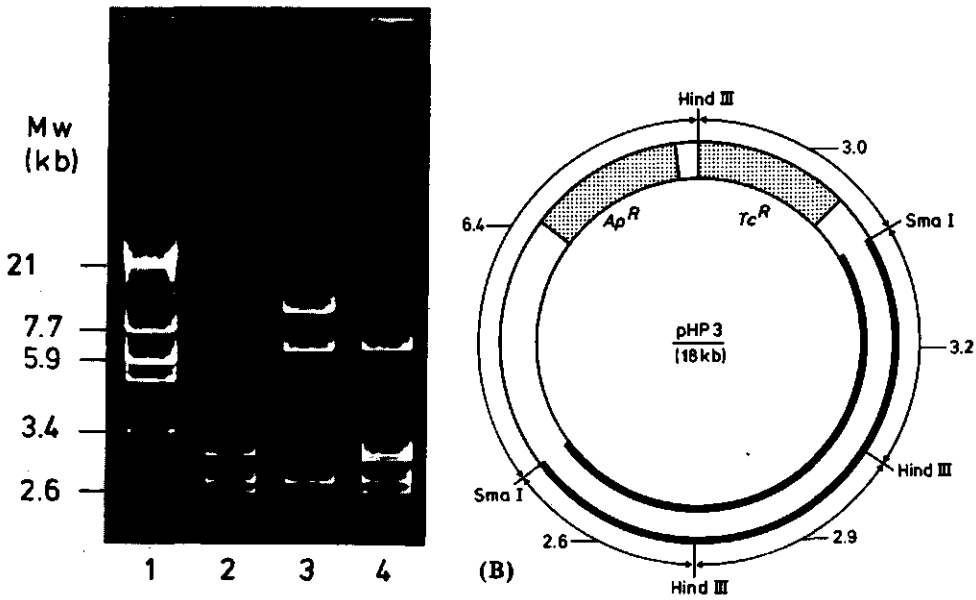

Fig. 2. (A) Electrophoretic separation of cleavage products of 8.7 kb *trp* DNA and pHP3 DNA with *Hin*dIII and *Sma*I. Lane 1: λ DNA digested with *Eco*RI (reference); 2: 8.7 kb *trp* DNA (see Fig.1) digested with *Hin*dIII; 3: pHP3 DNA digested with *Hin*dIII; 4: pHP3 DNA digested with *Hin*dIII + *Sma*I. 2 (B) Schematic representation of the restriction-cleavage map of pHP3 DNA for *Hin*dIII and *Sma*I.

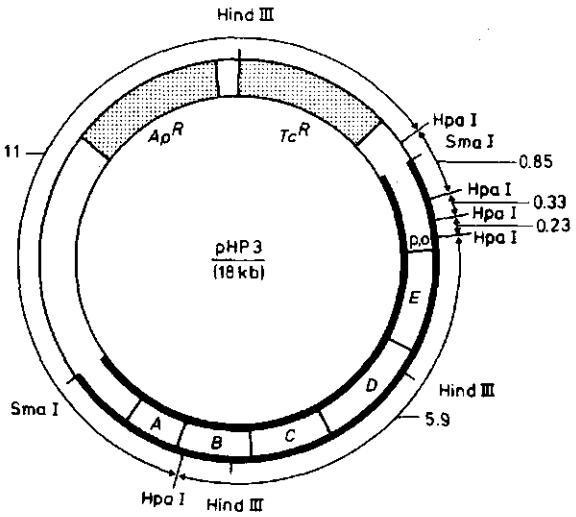

Fig. 3. Schematic representation of the restriction-cleavage map of pHP3 DNA for *Hpa*I and *Hin*dIII. The order of the *Hpa*I fragments of pHP3 DNA was deduced from the length measurements of the fragments of 8.7 kb *trp* DNA and pHP3 DNA generated by *Hpa*I or by *Hpa*I and *Hin*dIII.

trp DNA fragment and RNA polymerase and the resulting complex was digested with *Hpa*I. Since RNA polymerase is selectively bound to promoter DNA, under the conditions of the experiment (Hinckle et al., 1972), the *Hpa*I site located in the promoter region will be selectively protected from attack, as has been shown before by Jones and Reznikoff (1977). The 8.7 kb *trp* DNA was incubated with highly purified RNA polymerase for 15 min and subsequently digested with *Hpa*I. Gel electrophoresis of the reaction products showed that in the presence of RNA polymerase the 0.23 kb fragment had not been formed. All other fragments were present in normal amounts. This result suggests that the 0.23 kb fragment has remained linked to the 5.9 kb fragment resulting in a fragment of 6.1 kb which could not be distinguished because of the small difference in m.wt. To verify this interpretation we repeated the experiment with a mixture of *Hpa*I and *Hin*dIII. The results (Fig.4) clearly show that in the presence of RNA polymerase the 0.23 kb fragment and the 2.0 kb fragment are not produced and instead a new fragment of 2.2 kb appears. So we conclude that the *trp* promoter is located at the *Hpa*I cleavage site between the 0.23 and 5.9 kb fragments and that the direction of transcription of the *trp* operon in pHP3 is clockwise (Fig.3).

(5) Restriction-cleavage map of the trp *operon*

Using the results from the previous paragraph, viz. that the *trp* promoter lies at a distance of 1.16 kb from one end of the 8.7 kb *trp* DNA, we have made a restriction-cleavage map of the *trp* operon for the enzymes *Sal*I,

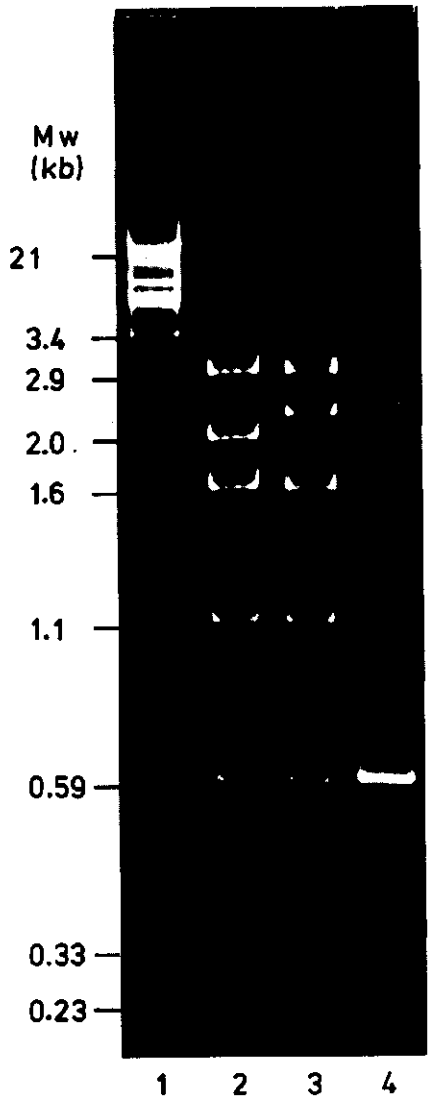

Fig. 4. Electrophoretic separation on 1.5% agarose of the cleavage products of a binary complex between RNA polymerase and 8.7 kb *trp* DNA digested with *Hpa*I and *Hin*dIII. 0.25 μg of 8.7 kb *trp* DNA is incubated for 15 min at 37°C with 2.7 μg RNA polymerase in 10 μl 10 mM Tris·HCl (pH 7.9), 10 mM $MgCl_2$, 150 mM KCl and 0.1 mM dithiothreitol to form the binary complex. Subsequently the incubation mixture is diluted threefold in *Hin*dIII buffer containing *Hpa*I and *Hin*dIII and the incubation is continued for 60 min. Lane 1: λ DNA digested with *Eco*RI (reference); 2: 8.7 kb *trp* DNA digested with *Hpa*I and *Hin*dIII; 3: 8.7 kb *trp* DNA-RNA polymerase complex, digested with *Hpa*I and *Hin*dIII; 4: 0.59 kb DNA (reference).

*Bgl*II, *Bgl*I, *Sst*I, *Aos*I, *Xho*I, *Ava*I and *Pvu*II. The restriction-cleavage map of the 8.7 kb *trp* DNA for each enzyme was constructed by (i) an analysis of the fragments formed by digestion with each individual enzyme and with pairs of restriction nucleases (Table I); (ii) a comparison of the fragments formed after endonuclease digestion of the 8.7 kb *trp* DNA, pHP3 DNA and pBR313 DNA (Table II); (iii) partial digestion of the 8.7 kb *trp* DNA with the individual enzymes (results not shown). A schematic representation of the restriction cleavage maps is given in Fig. 5. The 8.7 kb *trp* DNA was not cleaved by *Bst*EII, *Kpn*I, *Pst*I or *Sst*II, so no cleavage sites are present in the *trp* operon for these enzymes.

TABLE I

RESTRICTION-NUCLEASE FRAGMENTS OF 8.7 kb *trp* DNA PRODUCED BY SINGLE AND DOUBLE DIGESTION

*Sal*I	8.3[a],	0.40								
*Bgl*II	3.8,	2.3,	2.0,	0.46						
*Bgl*II + *Hin*dIII	2.6,	2.3,	1.2,	1.1,	0.85,	0.46				
*Bgl*II + *Hpa*I	2.2,	2.0,	1.6,	1.0,	0.59,	0.46,	0.33,	0.23		
*Sst*I	4.8,	2.7,	1.15							
*Sst*I + *Hin*dIII	2.7,	2.6,	2.2,	0.65,	0.54					
*Sst*I + *Bgl*II	3.8,	2.3,	1.15,	0.59,	0.46,	0.35				
*Pvu*II	3.4,	2.1,	2.0,	0.49,	0.46,	0.16				
*Pvu*II + *Bgl*II	2.3,	2.1,	1.1,	0.85,	0.62,	0.49,	0.46,	0.43		
*Bgl*I	2.9,	2.9,	1.5,	0.98,	0.34					
*Bgl*I + *Hpa*I	2.9,	2.6,	0.98,	0.59,	0.36,	0.34,	0.33,	0.30,	0.23	
*Bgl*I + *Sal*I	2.9,	2.9,	1.5,	0.90,	0.34					
*Xho*I	7.8,	0.93								
*Xho*I + *Sal*I	7.4,	0.93,	0.40							
*Ava*I	7.8,	0.28,	0.24,	0.23,	0.18					
*Aos*I	2.7,	1.55,	1.5,	1.5,	0.80,	0.66				
*Aos*I + *Hpa*I	1.6,	1.55,	1.5,	1.5,	1.05,	0.59,	0.33,	0.23,	0.20	
*Aos*I + *Hin*dIII	2.7,	1.55,	1.5,	1.2,	0.79,	0.66,	0.30			
*Aos*I + *Pvu*II	2.1,	1.5,	1.05,	0.90,	0.80,	0.66,	0.60,	0.49,	0.46,	0.16

[a] The data are expressed in kb.

TABLE II

RESTRICTION-NUCLEASE FRAGMENTS OF pHP3 AND pBR313 DNA PRODUCED BY SINGLE AND DOUBLE DIGESTION

	pHP3 DNA					pBR313 DNA			
*Sal*I	11[a],	7.3				9.5			
*Sal*I + *Sma*I	8.2,	6.9,	2.4,	0.40		7.1,	2.4		
*Bgl*II	16,	2.0,	0.46						
*Bgl*II + *Sma*I	9.5,	3.8,	2.3,	2.0,	0.46				
*Pvu*II	9.0,	3.4,	2.1,	2.0,	0.49,	5.6,	3.4,	0.43	
	0.46,	0.43,	0.34						
*Pvu*II + *Sma*I	5.4,	3.4,	3.4,	2.1,	2.0,	5.4,	3.4,	0.43,	0.16
	0.49,	0.46,	0.43,	0.16,	0.16				
*Bgl*I	4.3,	2.9,	2.9,	2.5,	1.7,				
	1.4,	1.4,	0.98						
*Bgl*I + *Sma*I	4.0,	2.9,	2.9,	1.7,	1.5,				
	1.4,	1.4,	0.98,	0.98,	0.34				

[a] The data are expressed in kb.

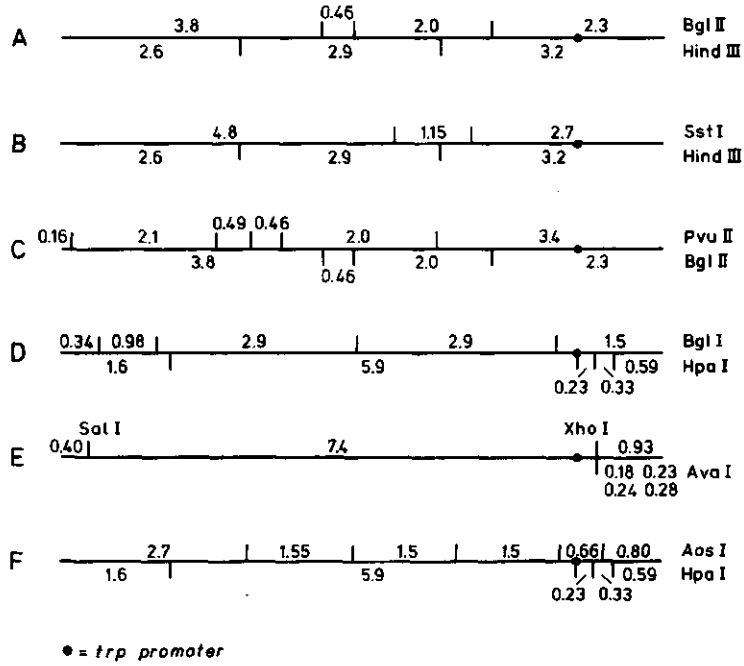

Fig. 5. Schematic representation of the restriction-cleavage map of 8.7 kb *trp* DNA (see Fig. 1) with the indicated endonucleases, including *Bgl*II (A), *Sst*I (B), *Pvu*II (C), *Bgl*I (D), *Sal*I (E), *Xho*I (E), *Ava*I (E) and *Aos*I (F).

(6) Construction of plasmids with trp *genes as selective marker*

To construct plasmids with *trp* genes as selective marker pHP3 DNA was digested with *Sma*I and "linkers" (CCGAATTCGG) containing the *Eco*RI sites were ligated to the fragments. After treatment of the mixture of fragments with *Eco*RI they were ligated to pBR345 DNA, which had also been treated with *Eco*RI. pBR345 is the smallest, amplifiable plasmid known. It carries an origin of replication but no genetic markers (Bolivar et al., 1977c). After transformation of *E. coli trpE-A*^{del2} with the ligated molecules and selection for Trp$^+$ transformants a number of Trp$^+$ bacteria were isolated and analyzed for the presence of *trp* plasmids. Two plasmids (pHP12 and pHP39) were used for further study.

pHP39 (Fig. 6) has a m.wt. of 9.8 kb comprising the 8.7 kb *trp* DNA fragment and pBR345. Its structure was established by an analysis of the cleavage products with the enzymes *Eco*RI, *Hin*dIII, *Hpa*I, *Bgl*II and *Sal*I. pHP12 (15 kb) carries the Ap^R gene, besides the *trp* genes, since bacteria can be conferred resistant to ampicillin by transformation with pHP12 DNA. The structure of pHP12 DNA (Fig. 7) was established by an analysis of the cleavage products with *Eco*RI, *Sma*I, *Hpa*I, *Hin*dIII and *Pst*I. pHP12 consists of the 8.7 kb *trp* DNA fragment and the 6.4 kb *Eco*RI-*Sma*I fragment of pHP3 carrying the Ap^R gene and the origin of replication. It appears that digestion of pHP3 DNA with *Sma*I has been incomplete or that joining of the *Eco*RI linkers to the

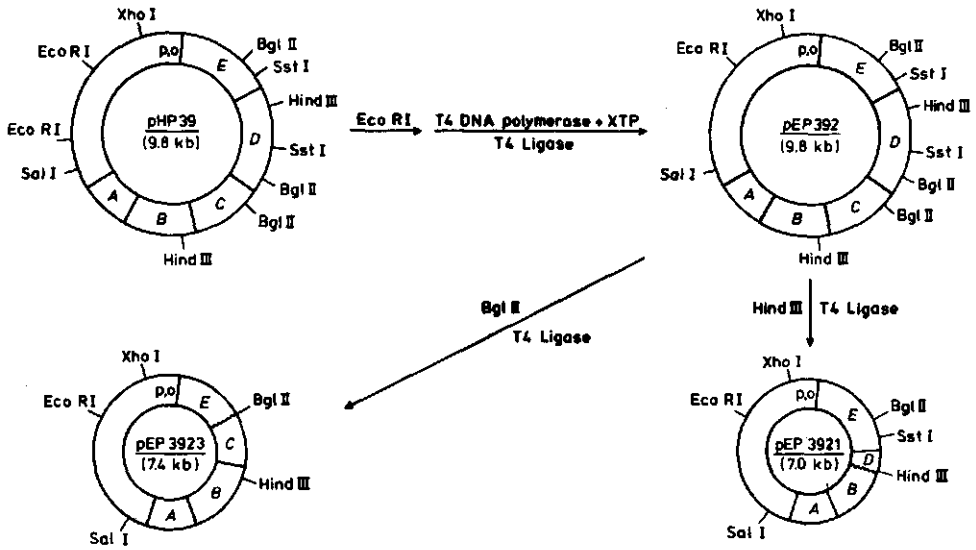

Fig. 6. Diagrammatic representation of the construction of *trp* plasmids. pHP39 was constructed by insertion of the 8.7 kb *trp* DNA fragment into pBR345, transformation of W3110 *trpE-A*^{del_2} and selection for Trp$^+$ fransformants. The plasmid pEP392 was derived by partial digestion of pHP39 with *Eco*RI, treatment of the linear molecules with T4 DNA polymerase in the presence of dATP and dTTP and subsequent circularization with T4 ligase. Trp$^+$ bacteria were selected after transformation of W3110 *trpE-A*^{del_2}. pEP3921 and pEP3923 were derived from pEP392 by treatment with *Hin*dIII or *Bgl*II, respectively, followed by circularization with T4 ligase and transformation of C600 *trpE*^{del_5}, *recA*.

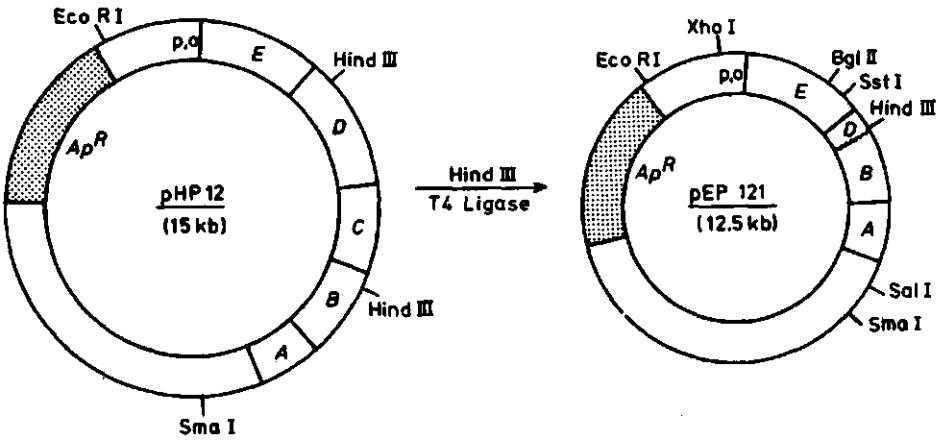

Fig. 7. Diagrammatic representation of the structure of pHP12 and pEP121. pHP12 was constructed by ligation of the 8.7 kb *trp* DNA fragment to a 6.4 kb *Eco*RI-*Sma*I fragment from pHP3 carrying the Ap^R gene. pEP121 was derived from pHP12 by treatment with *Hin*dIII followed by circularization with T4 ligase, transformation of W3110 *trpE-A*^{del_2} and selection for Ap^R.

*Sma*I fragments of pHP3 has been incomplete and that upon subsequent ligation also fragments have been joined with the original *Sma*I ends.

pHP39 contains several restriction cleavage sites which can be used for cloning experiments. To make the vector even more suitable for cloning experiments we have removed some of the restriction cleavage sites. First, one *Eco*RI site was removed. This was achieved by converting pHP39 DNA into a linear molecule by digestion with a limiting amount of *Eco*RI. The single-stranded regions at both ends of the molecules, generated by *Eco*RI cleavage, were filled in with dATP and dTTP by T4 DNA polymerase. Subsequently the molecules were circularized by blunt-end ligation with T4 ligase. After transformation of *E. coli* K-12 *trpE-A*^{del2} and selection for Trp$^+$, a number of transformants obtained was analyzed for the presence of plasmid DNA containing one *Eco*RI site only. One such plasmid, pEP392 (Fig. 6), with an *Eco*RI site located between the origin of replication and the *Xho*I site was used for further study.

Inspection of the restriction cleavage map of pEP392 (Fig. 6) reveals that two *Bgl*II sites and one *Sst*I site are situated between two *Hin*dIII sites. Removal of the *Hin*dIII fragment therefore will lead to a reduction of the number of *Bgl*II sites with two and that of *Sst*I and *Hin*dIII with one. pEP392 was digested with *Hin*dIII and the two resulting fragments of 7.0 kb and 2.8 kb, were separated by gel electrophoresis in 1% agarose. After elution from the agarose the 7.0 kb fragment was circularized and used to transform *E. coli trpE*^{del5} bacteria to Trp$^+$ (Ratzkin and Carbon, 1977). The transformants obtained contained a plasmid, pEP3921 (Fig. 6), which is 2.8 kb smaller than its parent, pEP392, as was expected. pEP3921 has intact *trpE* and *trpA* genes since strains of *E. coli* with a deletion in *trpE* or in *trpA* can be transformed efficiently to Trp$^+$. In addition *E. coli trpE-A*^{del2} bacteria transformed with pEP3921 synthesize both *trpE* and *trpA*, but not *trpD* and *trpB* proteins (not shown). pEP3921 contains six unique cleavage sites. Two of these, for *Bgl*II and *Sst*I are located in *trpE*, one site (*Hin*dIII) is located between *trpE* and *trpA*. The remaining three sites, those for *Eco*RI, *Sal*I and *Xho*I are located outside the *trp* operon.

pEP3923, containing single cleavage sites for *Bgl*II, *Hin*dIII, *Sal*I, *Eco*RI and *Xho*I, was constructed in a similar fashion. pEP392 was digested with *Bgl*II and the cleavage products of 7.4, 2.0 and 0.49 kb were separated by gel electrophoresis. The largest fragment was circularized and used to transform *E. coli trpE-A*^{del2}. Transformants, which were selected on minimal medium plates with indole, contained a plasmid of 7.4 kb length. pEP3923 (Fig. 6) contains intact *trpB* and *trpA* genes, which are controlled by the *trp* promoter-operator region.

By a method identical to that used for the construction of pEP3921, we have constructed pEP121 (Fig. 7) which lacks the 2.8 kb *Hin*dIII fragment. pEP121 has single cleavage sites for the enzymes *Bgl*II, *Sst*I, *Hin*dIII, *Sal*I, *Sma*I, *Eco*RI and *Xho*I. It carries intact *trpE* and *trpA* genes as well as the Ap^R gene.

The structure of the plasmids pEP392, pEP3921, pEP3923 and pEP121 was verified by an analysis of the cleavage products generated by *Bgl*II, *Eco*RI, *Hin*dIII, *Hpa*I and *Sal*I.

DISCUSSION

Based on the sedimentation properties of *trp* mRNA the length of the *trp* operon has been estimated at 6700 nucleotides (Imamoto and Yanofsky, 1967). The five polypeptides encoded by the five genes of the *trp* operon of *E. coli trpE-A* are estimated to have m.wt. values of 60 000; 65 000; 45 000; 45 000 and 29 000 (Miozzari and Yanofsky, 1978; Creighton and Yanofsky, 1970). Assuming 110 as the average m.wt. for amino acid residues in a protein the kb values of the corresponding five genes are 1.64, 1.77, 1.23, 1.23 and 0.80 kb, respectively. Since the structural genes of the operon are preceded by a regulatory region of approx. 160 nucleotides the total length of the operon should correspond to a m.wt. of 6.8 kb.

The *Hpa*I restriction-cleavage map presented in this paper shows that the *trp* promoter is located 1.16 kb from one end of the 8.7 kb *trp* DNA fragment. The *Sal*I site, which is at a distance of 440 nucleotides from the other end of the 8.7 kb *trp* DNA fragment, is located at 350 nucleotides beyond the C terminal end of *trpA* (Enger, unpublished observation; Wu and Platt, 1978). From these results we compute that the length of the *trp* operon is 6.8 kb, in good agreement with the value, calculated from the length of the gene products. It appears therefore that intercistronic regions, if present, must be small. Similarly an overlap between genes also seems to be severely limited. This conclusion is supported by the finding that the genes B and A overlap each other by a single nucleotide only (Platt and Yanofsky, 1975). Knowing the exact position of the *trp* promoter and *trp* terminator on the 8.7 kb *trp* DNA fragment we can localize the various cleavage sites within the genes, as indicated in Fig. 8.

A number of new, amplifiable cloning vehicles, the plasmids pEP392, pEP3921, pEP3923 and pEP121 have been constructed by in vitro recombination techniques. The purpose of constructing plasmids with *trp* genes as genetic traits was to widen the range of useful selective markers. The plasmids pEP3921, pEP3923 and pEP121 contain a number of single cleavage sites and carry two or more genetic markers for selection. Of the sites present in the plasmids, those located in the structural genes are most useful for cloning DNA fragments. Cloning of DNA fragments in the *Bgl*II or *Sst*I site of pEP121 will inactivate the *trpE* gene; upon transformation of *trpE* mutant hosts, the presence of recombinant DNA plasmids can be detected because of the resulting Ap^R Trp^{E^-} phenotype. The *Sst*I site offers the opportunity to clone fragments with *Sst*I ends in *trpE*. Similar to the *Pst*I site, the *Sst*I site provides the additional advantage, that insertion of a G-tailed DNA fragment into a C-tailed plasmid will yield *Sst*I sites at both ends of the fragments (Bolivar et al., 1977b). This will allow the dissection of the cloned fragment by digestion with *Sst*I.

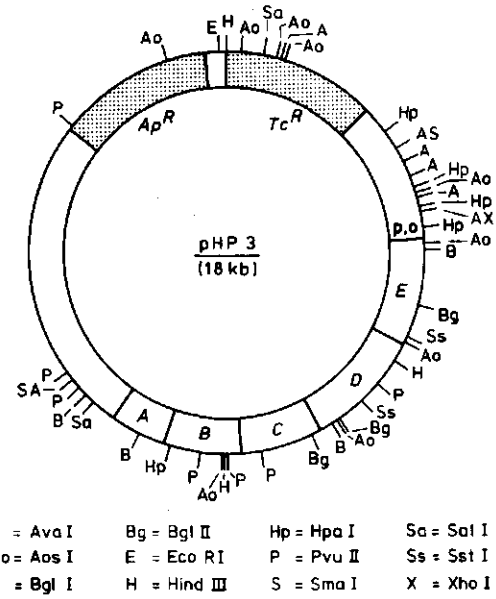

Fig. 8. Schematic representation of the restriction cleavage map of pHP3 DNA.

The *Hin*dIII site, located at the junction of the truncated *trpD* and *trpB* genes in pEP121 and pEP3921 may offer the opportunity of cloning DNA fragments containing transcription-termination signals. We expect that cloning of such fragments at the *Hin*dIII site will lead to the inactivation of *trpA*, while *trpE* remains unaffected. Selection for plasmids that are capable to transform *trpE* but not *trpA* strains to Trp^+ therefore is expected to yield recombinant DNA molecules with transcription termination signals. Work is in progress in our laboratory to test this hypothesis, by insertion of DNA fragments from prokaryotic and eukaryotic origin, carrying known termination sequences.

Hybrid yeast-*E. coli* vectors with *E. coli* genes, e.g. the *trp* genes, as selective markers may be useful to develop an efficient yeast transformation system. The construction of yeast-bacterial hybrid vectors which are able to replicate and may be selected in and recovered from both *E. coli* and *Saccharomyces cerevisiae* has been described (Beggs, 1978). These hybrid vectors comprise a 6 kb yeast plasmid carrying a replicator for the propagation in yeast, a yeast nuclear DNA fragment containing the LEU-2 gene and the *E. coli* plasmid pMB9. The LEU-2 gene which codes for β-isopropyl malate dehydrogenase serves as the selective marker in yeast. The usefulness of vectors of this type is, however, limited because recombination between the vector borne and the chromosomal LEU-2 gene occurs rather frequently (Hinnen et al., 1978). Bacterial determinants, that can be selected for in yeast, may provide a useful alternative to the yeast nuclear trait used so far. The usefulness of yeast-*E. coli* vectors with *trp* genes will depend on the

expression of these genes in yeast. Although yeast *trp* genes are expressed in *E. coli* (Ratzkin and Carbon, 1977), it is not known whether the reverse is true also. However, the finding (Hollenberg, pers. commun.) that proteins encoded by the Ap^R, Tc^R and Cm^R genes of *E. coli* are synthesized in yeast suggests that it may be applicable to *trp* genes too. This would allow the construction of hybrid *E.coli*-yeast vectors with *trp* genes as genetic markers for selection.

The *trp* plasmids described in this paper are derived from pBR313 or pBR345 (pBR345 constitutes a small segment of pBR313) which lack the conjugal transfer system and cannot be mobilized by the F transfer system (Bolivar et al., 1977b). Therefore it should be possible to use these *trp* plasmids, just as pBR313, as EK2 vectors.

Trp plasmids, unlike plasmids with antibiotic resistance markers such as pBR313, may even be used as EK3 vectors in combination with the appropriate host, since no antibiotic resistance markers which are of medical or agricultural importance are to be used in an EK3 vector (N.I.H. Guidelines, II-D-1-c, 1978).

Since persons treated with an antibiotic are dissuaded from working with plasmids conferring antibiotic resistance (M. Bohnhoff et al., 1954) the *trp* genes may offer another advantage to the commonly used plasmids with antibiotic-resistance markers.

ACKNOWLEDGEMENT

We gratefully thank Drs. J. van Embden, G. Grosveld, B. Koekman, J. Maat, B. Meagher, C. Mulder, G. Ooms and A. de Waard for a gift of restriction enzyme and Dr. W.J. Brammar for a gift of phage. We thank Dr. E. Southern for advance-information on the "gene machine", R. Disselhoff for invaluable help with the isolation of 8.7 kb *trp* DNA and Dr. F. Berends for critical reading of the manuscript.

These studies were supported (in part) by the Netherlands Foundation for Chemical Research (SON) of the Netherlands Organization for the Advancement of Pure Research (ZWO).

REFERENCES

Beggs, J.D., Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid, Nature, 275 (1978) 104—109.

Bennett, G.N., Schweingruber, M.E., Brown, K.D., Squires, C. and Yanosfsky, C., Nucleotide sequences of the region preceding *trp* mRNA initiation site and its role in promoter and operator function, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1976) 2351—2355.

Bertrand, K., Korn, L., Lee, F., Platt, T., Squires, C.L., Squires, C. and Yanofsky, C., New features of the regulation of the *E. coli* tryptophan operon, Science, 189 (1975) 22—26.

Betlach, M.C., Hershfield, V., Chow, L., Brown, W., Goodman, H.W. and Boyer, H.W., A restriction endonuclease analysis of the bacterial plasmid controlling the *Eco*RI restriction and modification of DNA, Fed. Proc., 35 (1976) 2037—2043.

Bickle, T.A., Pirotta, V. and Imber, R., A simple, general procedure for purifying restriction endonucleases, Nucl. Acids Res., 4 (1977) 2561—2572.

Bolivar, F., Rodriquez, R.L., Betlach, M.C. and Boyer, H.W., Construction and characterization of new cloning vehicles, I. Ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pMB9, Gene, 2 (1977a) 75—93.

Bolivar, F., Rodriquez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heijneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H. and Falkow, S., Construction and characterization of new cloning vehicles, II. A multi-purpose cloning system, Gene, 2 (1977b) 95—113.

Bolivar, F., Betlach, M.C., Heijneker, H.L., Shine, J., Rodriquez, R. and Boyer, H.W., Origin of replication of pBR345 plasmid DNA, Proc. Natl., Acad. Sci. USA, 74 (1977c) 5265—5269.

Bohnhoff, M., Drake, B.L. and Miller, C.P., Effect of streptomycin on susceptibility of intestinal tract to experimental *Salmonella* infection, Proc. Soc. Exp. Biol. 86 (1954) 132.

Brammar, J.W., Murray, N.E. and Winston, S., Restriction of λ*trp* bacteriophages by *Escherichia coli* K, J. Mol. Biol., 90 (1974) 633—647.

Clewell, D.B., Nature of ColE1 plasmid replication in the presence of chloramphenicol, J. Bacteriol., 110 (1972) 667—676.

Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. and Hsu, C.L., Nonchromosomal antibiotic resitance in bacteria: genetic transformation of *E. coli* by R-factor DNA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69 (1972) 2110—2114.

Creighton, T.E. and Yanofsky, C., Chorismate to tryptophan (*Escherichia coli*)-anthranilate synthetase, PR transferase, PRA isomerase, InGP synthetase, tryptophan synthetase, in Tabor, H. and Tabor, C.W. (Eds.), Methods in Enzymology, Vol. XVIIA, Academic Press, New York, 1970, pp. 365—380.

Greene, P.J., Heyneker, H., Betlach, M.C., Bolivar, F., Rodriquez, R., Covarrubias, A., Fodor, I. and Boyer, H.W., A general method for the purification of restriction enzymes, Nucl. Acids Res., 5 (1978) 2372—2380.

Helling, R.B., Goodman, H.M. and Boyer, H.W., Analysis of endonuclease R. *Eco*RI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis, J. Virol, 14 (1974) 1235—1244.

Hinckle, D.C., Mangel, W.F. and Chamberlin, M.J., Studies of the binding of *E. coli* RNA polymerase to DNA. IV. The effect of rifampicin on binding and on RNA chain initiation, J. Mol. Biol., 70 (1972) 209—220.

Hinnen, A., Hicks, J.B. and Fink, G.R., Transformation of yeast, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 (1978) 1929—1933.

Imamoto, F. and Yanofsky, C., Transcription of the tryptophan operon in polarity mutants of *E. coli*, I. Characterization of the tryptophan messenger RNA of polar mutants, J. Mol. Biol., 28 (1967) 1—23.

James, P.M., Sens, D., Natter, W., Moore, S.K. and James, E., Isolation and characterization of the specialized transducing bacteriophages φ80 *dargF* and λh80 *argF* cI857: Specific cleavage of arginine transducing deoxyribonucleic acid by the endonucleases *Eco*RI and *Sma*I, J. Bacteriol., 126 (1976) 487—600.

Jones, B.B. and Reznikoff, W.S., Tryptophan-transducing bacteriophages: In vitro studies with restriction endonucleases *Hin*dII + *Hin*dIII and *Escherichia coli* ribonucleic acid polymerase, J. Bacteriol., 132 (1977) 270—281.

Kushner, S.R., An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1 derived plasmids, in Boyer, H.W. and Nicosia, S. (Eds.), Genetic Engineering, Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 1978.

McParland, R.H., Brown, L.R. and Pearson, G.D., Cleavage of λ DNA by a site-specific endonuclease from *Serratia marcescens*, J. Virol., 19 (1976) 1006—1011.

Miozzari, G.F. and Yanofsky, C., Translation of the leader region of the *E. coli* tryptophan operon, J. Bacteriol., 133 (1978) 1457—1466.

Mitchell, D.H., Reznikoff, W.S. and Beckwith, J.R., Genetic functions defining *trp* and *lac* operon regulatory elements, J. Mol. Biol., 93 (1975) 331—350.

Panet, A., Van de Sande, J.H., Loewen, P.C., Khorana, H.G., Raae, A.J., Lillehaug, J.R. and Kleppe, K., Physical characterization and simultaneous purification of bacteriophage

T4-induced polynucleotide kinase, polynucleotide ligase and deoxyribonucleic acid polymerase, Biochemistry, 12 (1973) 5045—5050.

Platt, T. and Yanofsky, C., An intercistronic region and ribosome binding site in bacterial messenger RNA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72 (1975) 2399—2403.

Ratzkin, B. and Carbon, J., Functional expression of cloned yeast DNA in *E. coli*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 487—491.

Thomas, M. and Davis, R.W., Studies on the cleavage of bacteriophage lambda DNA with *Eco*RI restriction endonuclease, J. Mol. Biol., 91 (1975) 315—328.

Wu, A. and Platt, T., Transcription termination: Nucleotide sequence at 3′ end of tryptophan operon in *E. coli*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 (1978) 5442—5446.

Communicated by A.J. van der Eb.

CHAPTER 2

THE CONSTRUCTION OF NEW VECTORS FOR THE CLONING OF PROMOTORS

SUMMARY

In this paper we describe the construction and properties of vectors for the cloning of promotor-DNA fragments. The plasmids are derived from pBR313 (Bolivar et al., 1977), have several unique restriction sites and carry the trpA gene from Escherichia coli as a genetic marker for the selection of promotor-DNA fragments. The selection is based on an enhancement of the growth rate of bacteria, due to an increase of the expression of trpA by the cloned promotor.

The expression of trpA by a cloned promotor can be determined quantitatively, independently of the copy number of the vector. Determination of the trpA expression levels yields the apparent strength of the promotor, since the DNA segment located before trpA contains translational stop signals in the three reading frames.

INTRODUCTION

In bacteria gene expression is controlled mainly at the level of initiation of RNA synthesis. Specific nucleotide sequences in DNA (promotors) specify the sites at which transcription starts (for a recent review, see Rosenberg and Court, 1979).

Recent advancements in recombinant DNA technology have made it possible to construct vectors for the cloning of promotor containing DNA fragments, facilitating the isolation and characterization of promotors. In such vectors promotor containing DNA fragments are fused to a structural gene of a selectable marker e.g. the gene coding for tetracycline resistance (tet; Widera et al., 1978, West et al., 1979, An and Friesen, 1979) or the gene coding for β-galactosidase (lacZ; Casadaban and Cohen, 1980). In this paper we describe the construction of new vectors containing the gene for tryptophan synthetase A (TSase A; product of trpA) as a selectable marker. As our data indicate, these vectors can be used successfully to clone DNA fragments containing promotors.

In addition the amount of TSase A synthesized on the vector can be determined quantitatively. For a meaningful comparison of the efficiency

(i.e. the strength) of cloned promotors quantitation of the level of expression of the selectable marker is necessary, but not sufficient. A second requirement is that the level of expression truly reflects the transcription initiated at the cloned promotors. The plasmids constructed fulfill these requirements, since the expression of the trpA gene in these vectors solely is dependent on the promotor placed in front of it. These vectors thus can be used to compare the strength of cloned promotors.

MATERIALS AND METHODS

Bacteria

The bacterial strain employed in this study is Escherichia coli K12 $trpA_{am}$, lac, str, recA (KMBL 3751).

Construction of plasmids

1. Construction of pEP301 and the derivatives, pEP3015, pEP3012 and pEP3014

- Plasmid pEP301 (fig. 1)

To obtain this plasmid pHP3 (Enger et al., 1980) was digested with HindIII and the fragment containing the amp and trpA gene was isolated. This fragment was circularized and used for transformation of trpA recA bacteria. Transformants were selected for Amp^R.

- Plasmid pEP3015 with different single cloning sites before trpA (fig. 1)

A fragment with different cloning sites was obtained from pHP3 by digestion of this DNA with HindIII and HpaI and isolation of the HindIII-HpaI fragment, containing trpE. The plasmid pEP301 was digested with HindIII and HpaI and the fragment containing the amp gene was isolated. The HindIII-HpaI fragments isolated from pEP301 and from pHP3 were ligated and used for transformation of trpA recA bacteria. Transformants were selected for Amp^R.

- Plasmid pEP3012 with a single EcoRI and a HindIII site before trpA (fig. 2)

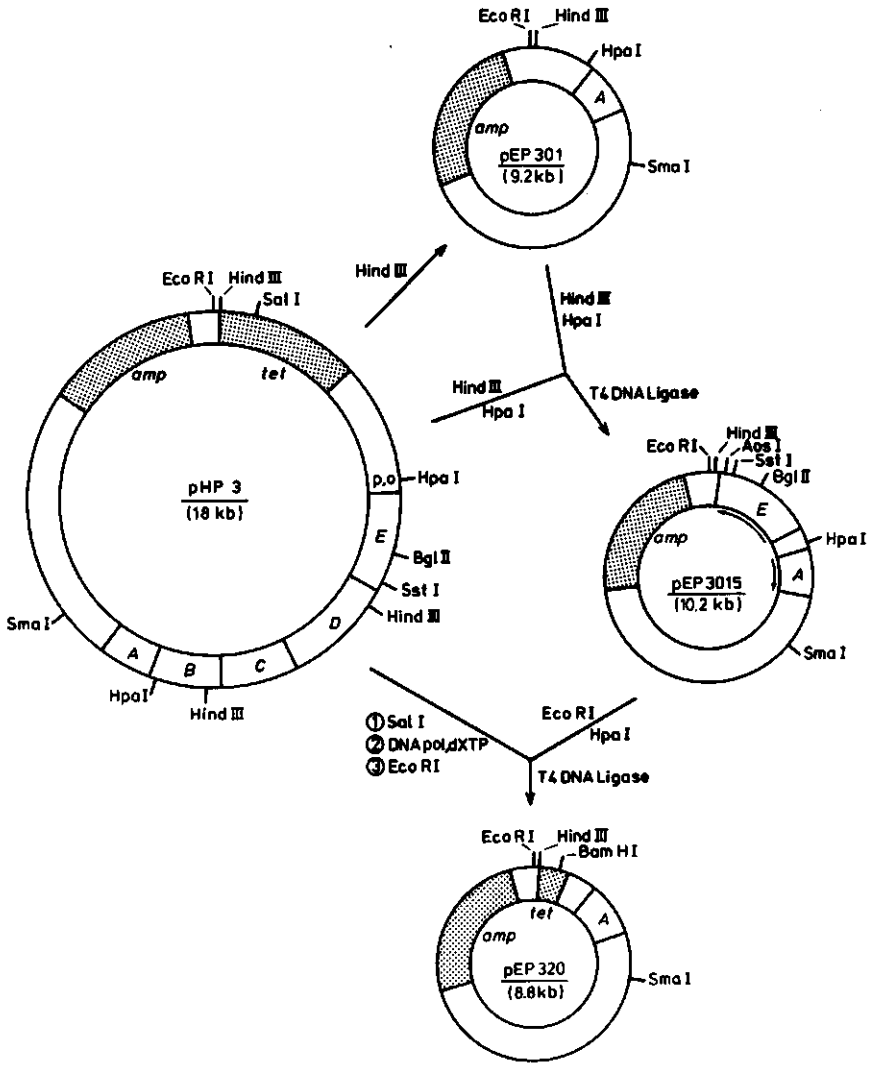

Fig.1. Construction of pEP301: The HindIII fragment of pHP3, containing the amp and the trpA genes, was circularized and used for transformation of bacteria (trpA, recA) to ampicillin resistance. Construction of pEP3015: A HindIII-HpaI fragment of pHP3, containing the trpE gene, was inserted between the HindIII and HpaI restriction sites, located in front of the trpA gene. The orientation of the trpE and trpA genes in pEP3015 is indicated by arrows. Construction of pEP320: A fragment with the tet promotor was obtained by digestion of pHP3 DNA with SalI, filling in of the protruding single stranded regions by T4 DNA polymerase, subsequent digestion of this DNA with EcoRI and separation of the fragments on an agarose gel. The 0.65 kb fragment with one EcoRI and one blunt end, containing the tet promotor was ligated to pEP3015 DNA, after treatment with EcoRI and HpaI.

Plasmid pEP301 was digested with HpaI and a HindIII linker (CCAAGCTTGG) was ligated to the blunt ends. After HindIII digestion the fragment containing the amp gene was isolated by gelelectrophoresis and subsequently ligated. This DNA was used for transformation of trpA recA bacteria and the transformants were selected for Amp^R.

- Plasmid pEP3014 with a single EcoRI site (not shown)

This plasmid was obtained in the same way as described for pEP3012, by the use of an EcoRI linker (CATGAATTCATG). The linker was ligated to HpaI digested pEP301 DNA. After EcoRI digestion a fragment containing the amp gene and the trpA gene was isolated for the construction of pEP3014.

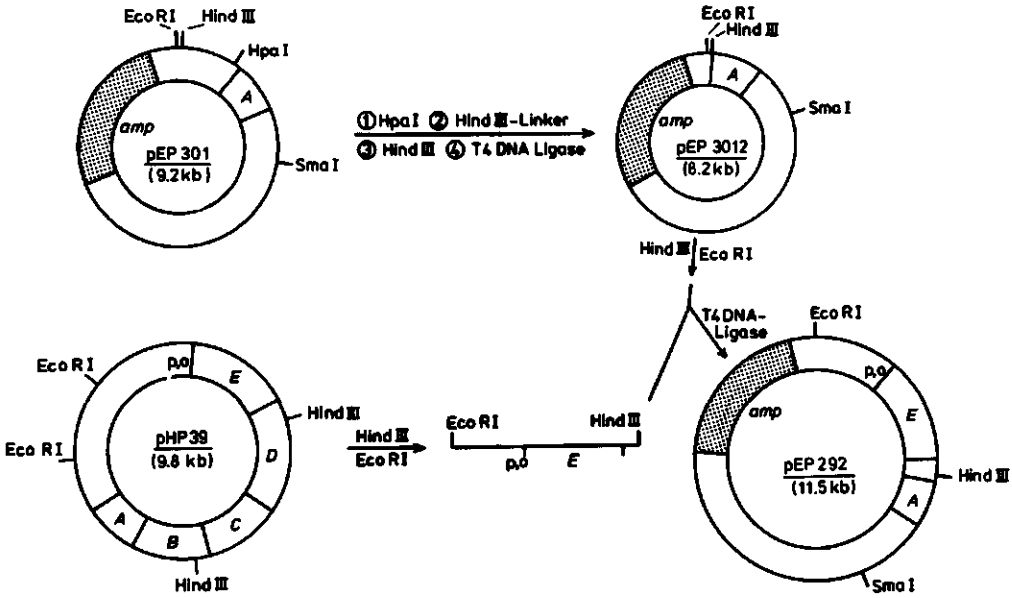

Fig.2. Construction of pEP3012 and pEP3014: The plasmide pEP3012 was obtained by digestion of pEP301 with HpaI, ligation of a HindIII linker to this blunt end and digestion with HindIII. The large DNA fragment was isolated on an agarose gel and circularized. For the construction of pEP3014 (not shown) the EcoRI-HpaI fragment of pEP301 was replaced in the same way by an EcoRI linker. Construction of pEP292: A fragment of 3.2 kb, containing the trp promotor, was obtained by digestion of pHP39 DNA (Enger et al., 1980) with EcoRI and HindIII. This fragment was ligated to pEP3012 DNA which was cleaved with EcoRI and HindIII.

2. Construction of pEP320, pEP292 and pEP702

- Plasmid pEP320 with the tet promotor before trpA (fig. 1)

A fragment with the tet promotor was obtained by digestion of pHP3 DNA with SalI, filling in of the single stranded ends by T4 DNA polymerase and digestion with EcoRI. A fragment of 0.65 kb, containing the tet promotor, was isolated by gelelectrophoresis and ligated to pEP3015 DNA which was digested with EcoRI and HpaI. The resulting DNA was used for transformation of trpA recA bacteria and the transformants were selected for $TrpA^+$ and Amp^R.

- Plasmid pEP292 with the trp promotor regulatory region before trpA (fig. 2)

A fragment with the trp promotor was obtained by digestion of pHP39 (Enger et al., 1980) with EcoRI and HindIII and isolation of an EcoRI-HindIII fragment containing trpE and the trp promotor. This fragment was ligated to DNA of pEP3012 which was also digested with EcoRI and HindIII. This ligated DNA was used for transformation of trpA recA bacteria and transformants were selected for $TrpA^+$ and Amp^R.

- pEP702 with the tet promotor before trpA (not shown)

This plasmid was obtained by digestion of pHP3 DNA with BglII and BamHI. The BamHI site is located in the tet gene and one BglII site is located in the trpC gene. The BamHI-BglII fragment, containing the amp gene was ligated and used for transformation of trpA recA bacteria. Transformants were selected for $TrpA^+$ and Amp^R.

The characteristics of the plasmids are given in Table 1.

Enzymes and conditions of incubation

EcoRI was purchased from Miles (USA), and BglII and PvuII from Biolabs (USA); HindIII was a gift from A. de Waard (Univ. of Leiden), SalI from B. Koekman (Univ. of Leiden) and HpaI, SmaI and T4 DNA ligase were purified as described elsewhere (Enger et al., 1980). All incubations with restriction enzymes were carried out as described before (Enger et al., 1980).

Determination of TSase A and β-lactamase activities

TSase A activity was determined by the method of Smith and Yanofsky

Table 1. Characteristics of plasmids employed.

Plasmid	Promotor before trpA	Other characteristics	Origin
pHP3	trp	Trp^+, Tet^R, Amp^R	Enger et al., 1980
pHP39	trp	Trp^+	Enger et al., 1980
pEP301	-	Amp^R	This work
pEP3012	-	pEP301; HindIII-HpaI fragment replaced by HindIII linker	This work
pEP3014	-	pEP301; EcoRI-HpaI fragment replaced by EcoRI linker	This work
pEP3015	-	pEP301; HindIII-HpaI fragment replaced by HindIII-HpaI fragment from pHP3	This work
pEP292	trp	pEP3012; EcoRI-HindIII fragment replaced by EcoRI-HindIII fragment from pHP39	This work
pEP320	tet	pEP3015; EcoRI-HpaI fragment replaced by EcoRI-SalI fragment from pHP3	This work
pEP702	tet	pHP3; BamHI-BglII fragment deleted	This work
pEP121	trp	$TrpE^+$, $TrpA^+$, Amp^R	Enger et al., 1980

(1962). This assay is based upon the conversion of indole into tryptophan. The disappearance of indole is measured spectrophotometrically at 540 mμ. One unit of TSase A is defined as the amount of enzyme that catalyses the conversion of 0.1 μmol of indole to product in 20 min at 37°C under the conditions of the experiment. β-Lactamase activity was determined by the method of O'Callaghan et al., (1972). The assay is based on the rate of hydrolysis of the amide bond of the β-lactam ring of an aromatic compound (nitrocefin) by which the absorption at 482 nm increases. One unit of β-lactamase is defined as the amount of enzyme that causes a ΔOD at 482 nm of 1.7 per minute at 37°C.

Protein concentrations were determined according to the method of Lowry et al., (1951) with bovine serum albumin as a standard.

Recombinant DNA techniques

The preparation of plasmid DNA, the electrophoretic separation of DNA fragments on agarose gels, the ligation of DNA fragments and the transformation of E.coli bacteria with plasmid DNA were carried out as described before (Enger et al.,1980). After transformation , bacteria were plated on minimal medium agar plates containing 20 µg ampicillin per ml, in some cases supplemented with tryptophan (5µg/ml).

RESULTS

The construction of trpA plasmids suitable for the cloning of fragments containing promotors

The plasmid pHP3 (Enger et al., 1980) contains the entire trp operon of E.coli and is derived from pBR313 (Bolivar et al.,1977). The plasmid pHP3 was used to construct a plasmid (pEP301) with the trpA gene, without its regulatory elements, and the amp gene (Fig. 1). For this purpose the tet gene and the promotor proximal part of the trp operon, including the trp regulatory region were removed from pHP3. This was achieved by digestion of this plasmid with HindIII and subsequently ligation of the fragment, containing the trpA gene and the amp gene. The plasmid formed has a single HpaI site located at 68 nucleotides before trpA (Platt and Yanofsky, 1975). The use of a cloning site at a short distance before trpA seems attractive, as long DNA sequences between a promotor and a gene may effect the expression of that gene (Adhya et al., 1976; Gottesman et al., 1980).

To increase the applicability of the vector for the cloning of fragments with different ends at this distance before trpA, we have constructed three derivatives of pEP301.

In the first derivative (pEP3015, Fig. 1) fragments can be cloned with one blunt end and either a BglII, SstI, AosI, HindIII or EcoRI end. For the construction of pEP3015 we have replaced the HindIII-HpaI fragment of pEP301 by an HindIII-HpaI fragment from pHP3 (Fig. 1).

In the second derivative, pEP3012 (Fig.2),the HindIII-HpaI fragment

was replaced by an HindIII linker. In pEP3012, fragments with HindIII ends can be inserted in the HindIII site and fragments with one EcoRI end and one HindIII end can replace the corresponding fragment from the vector.

In a third derivative (pEP3014) the EcoRI-HpaI fragment from pEP301 was replaced by an EcoRI linker. This allows for the cloning of fragments with two EcoRI ends.

Cloning of promotors

Bacteria (trpA recA), containing plasmid pEP301 or one of its derivatives grow very slowly in the absence of tryptophan suggesting that the trpA gene on the plasmid is expressed, although with very low efficiency. The plasmids can be used for the cloning of promotors if that would lead to an increase in expression of the trpA gene and consequently in a faster growth of the bacteria.

To test the usefulness of the constructed vectors for the cloning of promotors, we have cloned DNA fragments containing the tet promotor or the trp promotor, in two of the plasmids, pEP3015 and pEP3012.

The tet promotor was inserted before trpA by replacement of the EcoRI-HpaI fragment from pEP3015 by a tet promotor containing fragment of 0.65 kb, obtained from pHP3 (pEP320, fig. 1). The resulting molecules were used to transform trpA recA bacteria. Trp^+ transformants were selected on minimal medium agar plates containing 20 µg ampicillin per ml. After incubation of the plates at 37°C for 16-18 h large size colonies appeared. When the plates were incubated for a longer period of time (40-44 h) additional colonies appeared containing the parental plasmid pEP3015. An analysis of the fast growing transformants revealed the presence of a plasmid with the expected structure (pEP320).

The trp regulatory region was inserted before trpA (pEP292, fig. 2) by replacement of the EcoRI-HindIII fragment of pEP3012 by a trp promotor containing fragment of 3.2 kb, obtained from pHP39 (Enger et al., 1980). Transformants selected for tryptophan independence and ampicillin resistance, that appeared after incubation at 37°C for 16-18 h, contained the plasmid pEP292.

Expression of the trpA gene under control of an inserted promotor

TrpA codes for the α subunit of tryptophan synthetase (TSase A). Its activity can be measured quantitatively in bacterial extracts (Smith and Yanofsky, 1962), offering the opportunity to determine the amount of TSase A synthesized under control of a cloned promotor. The presence of another gene on our plasmids, the amp gene, coding for β-lactamase provides the opportunity to determine the activity of a plasmid coded enzyme, that is not controlled by the inserted promotor. The β-lactamase activity is strictly proportional to the number of amp genes present (Nordström et al., 1972). Determination of the ratio of the amounts of TSase A and β-lactamase therefore yields a measure of the efficiency of expression of the trpA gene, independently of the copy number of the plasmid.

We have measured the efficiency of expression of the trpA gene, under control of two inserted promotors, the trp and the tet promotor. A comparison of the efficiency of expression of trpA in bacteria containing pEP292 (trp promotor) and pEP320 (tet promotor) shows that TSase A synthesis controlled by the trp regulatory region is approximately four-fold more efficient than that initiated at the tet promotor (Table 2, lines 1 and 2). Tryptophan drastically reduces the synthesis of TSase A encoded by pEP292, but not that of pEP320 (results not shown), indicating that the trpA gene in pEP292 has been brought under control of the trp regulatory region.

Bacteria containing a plasmid without a promotor before trpA (pEP301 or pEP3015) also synthesize TSase A, but much less than was found when a promotor is present before trpA (lines 5 and 6). This result is in agreement with the observation that bacteria containing this type of plasmid grow very slowly in the absence of tryptophan in the medium.

To determine whether the difference in expression of trpA under control of the trp promotor (pEP292) and the tet promotor (pEP320) is not due to the difference in the distance of the promotor to trpA, we have compared the efficiency of trpA expression controlled by the same promotor (tet or trp), located at different distances before trpA. For this purpose we have first constructed another plasmid (pEP702) with the tet promotor located before trpA at a distance which is comparable to that of pEP292 (fig. 3).

pEP702 was derived from pHP3 DNA (fig. 1) by deleting a fragment

Table 2. The ratio of the activities of TSase A and β-lactamase in bacteria containing plasmid DNA.

	Plasmid	Promotor before trpA	TSase A (units/mg protein)	β-lactamase (units/mg protein)	TSase A / β-lactamase
1.	pEP292	trp	273	20.7	13.2
2.	pEP320	tet	55	16.1	3.4
3.	pEP702	tet	253	36	7.0
4.	pEP121	trp	277	18.1	15.3
5.	pEP301	-	8	13.3	0.6
6.	pEP3015	-	8	13.3	0.6

Plasmid containing bacteria (trpA, recA) were grown in M9-medium, containing ampicillin (20 µg/ml) in the presence of 2 µg/ml tryptophan. The TSase A and β-lactamase activities in the extracts were determined as described in Materials and Methods and the ratio of these activities (lane 5) is given as units TSase A per unit β-lactamase.

comprising the promotor distal portion of the tet gene and the promotor proximal portion of the trp operon. For this purpose pHP3 DNA, which contains a BamHI site in the tet gene and a BglII site in trpC was cleaved with BamHI and BglII and the single stranded protruding ends, which are identical, were ligated.

In bacteria (trpA recA) containing pEP702 the ratio TSase A to β-lactamase is two times higher than in bacteria containing pEP320 (Table 2, lines 3 and 2), despite the fact that the distance from the promotor to trpA in pEP702 is four-fold greater than that in pEP320.

We have also compared the TSase A synthesis for two plasmids with the trp promotor located at different distances before trpA. Bacteria (trpA recA)containing pEP292 or pEP121 (Enger et al., 1980) make the same amount of TSase A, although the distance of the promotor to trpA differs by 1.0 kb (fig. 3; Table 2, lines 1 and 4).

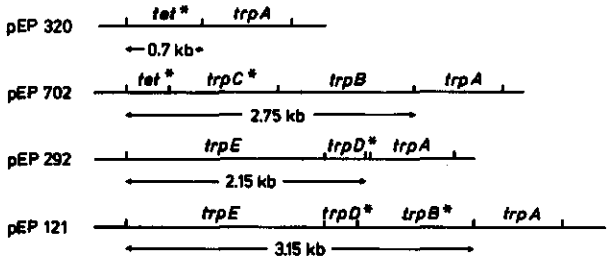

Fig.3. Schematic representation of the cloned DNA fragment and the trpA gene in the plasmids pEP320, pEP702, pEP292 and pEP121. The promotors are located on the left hand site of the linear fragments. The distance from the promotor to the beginning of the trpA gene is indicated in kilobases.
* indicates an incomplete gene.

DISCUSSION

The increase in the growth rate, effected by an increase of the expression of trpA, forms the basis for the selection of plasmids containing a promotor before trpA.

It appears that trpA is also expressed, although at low efficiency, in plasmids that do not contain a promotor before trpA. Selker et al., (1977) have reported a similar observation for the trpA gene from Salmonella typhimurium and Rosenberg (personal communication) has found that the galK gene is expressed, when incorporated into a plasmid without a promotor. The rate of expression of trpA is sufficient to allow trpA bacteria, that contain a plasmid without promotor before trpA, to grow in the absence of tryptophan in the medium.

Selection of plasmids with a promotor inserted before trpA therefore

is based on an enhancement of the expression of trpA. Strong promotors, such as those for tet or trp, can be selected directly, as was demonstrated in this study. However, weak promotor may remain undetected by this selection technique and this may limit the usefulness of the plasmids. Since the plasmids, described in this paper, contain different single restriction sites before trpA they can be used to clone DNA fragments in a determined orientation. Therefore, if a DNA fragment is known to contain a weak promotor such a promotor may be cloned and its expression may be studied.

Bacteria containing the plasmid with the trp regulatory region (pEP292) before the trpA gene make two to four-fold more TSase A than bacteria containing a plasmid with the tet promotor (pEP320 or pEP702). Since the trp regulatory region contains an attenuator where over 80% of the transcription, started at the trp promotor, is arrested (Bertrand et al., 1975), we assume that the efficiency of the trp promotor is greater (5-10 fold) than indicated by the data on the expression of trpA. The trpA expression only reflects the strength of a promotor, if no attenuator is present in the regulatory region. In the presence of an attenuator trpA expression is a measure of the efficiency of transcription originating from the regulatory region.

For a meaningful comparison of the strength of different promotors it is necessary that the amount of TSase A synthesized reflects the initiation of transcription at the promotor. Other factors, besides the frequency of initiation of RNA synthesis, however, may determine the expression of the trpA gene. These include differences in I. length or II. structure of the DNA segment or the corresponding mRNA, between the promotor and trpA.

The expression of trpA under control of the trp promotor (pEP292 and pEP121) is independent of the length of the DNA segment between promotor and trpA. The expression of trpA under control of the tet promotor for plasmid pEP702 and pEP320 is not significantly different, although the distance from the promotor to trpA differs four-fold. We assume that differences in length of the DNA segment, and consequently also of the mRNA molecule, up to approximately 2000 bp have little or no effect on the expression of trpA.

The structure of the DNA segment between the promotor and trpA com-

prises a 68 bp fragment of trpB and the promotor distal DNA segment of the cloned fragment. For our discussion on the effect of DNA structure (or the corresponding mRNA) on trpA gene expression only the trpB segment is relevant.

A decrease of the efficiency of transcription can occur, if the nucleotide sequence before trpA contains a transcription terminator that is recognized, when the transcript is not translated (Adhya et al., 1976). Such a terminator is not present in the 68 bp DNA segment between the HpaI site and the beginning of trpA, as can be concluded from studies on the in vitro transcription of the trp operon (Shimizu and Hayashi, 1974; Pannekoek et al., 1974).

A reduction of the efficiency of translation of trpA mRNA may be caused by interference of translation. Interference of translation could take place, when translation that initiates at a site in the cloned fragment proceeds, in phase or out of phase, into the trpA gene. The C-terminal end of trpB, which preceeds trpA contains translational stop signals in the three possible reading frames (Platt and Yanofsky, 1975) precluding translation that is started in the cloned fragment to enter the trpA gene. We conclude that the amounts of TSase A synthesized in bacteria containing these plasmids truly reflect the strength of the promotors or regulatory regions cloned.

The principle advantage of using plasmids in which promotor fragments can be cloned is that they provide a means for studying separately complex regulatory signals, without requiring the expression of its structural gene. The plasmids may be used also to select for promotor-up mutations in promotors that normally function rather inefficiently, or for mutations that convert a nucleotide sequence into a promotor. The latter system was used to isolate a plasmid, derived from pEP301, that shows a higher level of expression of the trpA gene. By insertion of four nucleotides at the HindIII site, a nucleotide sequence which does not function as a promotor was transformed into a sequence at which transcription is initiated with high efficiency (see chapter 4).

Acknowledgement

We thank Dr.H.Pannekoek for the help with the preparation of the manuscript. These studies were supported (in part) by the Netherlands

foundation for Chemical Research (SON) of the Netherlands Organization for the Advancement of Pure Research (ZWO).

Note added in proof

A derivative of plasmid pEP3012 was constructed with a stopcodon (TGA) in the authentic reading frame, 27 triplets upstream of the trpB terminus. The plasmid (pEP303) was obtained by insertion of a decamer (CAGGATCCTG) containing a BamHI site into the HindIII site which was made blunt. The presence of an additional stopcodon in the correct reading frame precludes translation to the end of trpB, such that coupling of translation between trpA and trpB can not occur (Oppenheim, D.S. and Yanofsky, C. (1980) Genetics 95, 785-795).

REFERENCES

Adhya, S., Gottesman M., Crombrugghe, B. de and Court, D. (1976) in: RNA polymerase (Losick, R. and Chamberlin, M., eds.) pp 719-730, Cold Spring Harbor Laboratory.

An, G. and Friesen, J.D. (1979) J. Bacteriol. 140, 400-407.

Bertrand, K., Korn, L., Lee, F., Platt, T., Squires, C.L., Squires, C. and Yanofsky, C. (1975) Science 189, 22-26.

Bolivar, F., Rodriquez, R.L., Betlach, M.C. and Boyer, H.W. (1977) Gene 2, 75-93.

O'Callaghan, C.H., Morris, A., Kirby, S. and Shingler, A.H. (1972) Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1, 283-288.

Casadaban, M. and Cohen, S.N. (1980) J.Mol.Biol. 138, 179-207.

Enger-Valk, B.E., Heyneker, H.L., Oosterbaan, R.A. and Pouwels, P.H. (1980) Gene 9, 69-85.

Gottesman, M.E., Adhya, S., and Das, A. (1980) J.Mol.Biol. 140, 57.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Fan, A.L. and Randall, R.J. (1951) J.Biol.Chem. 193, 265-275.

Nordström, K., Ingram, L.C. and Lundbäck, A. (1972) J.Bacteriol. 110, 562-569.

Pannekoek, H., Perbal, B. and Pouwels, P.H. (1974), Molec.gen Genet, 132, 291-306.

Platt, T. and Yanofsky, C. (1975) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 72, 2399-2403.

Rosenberg, M. and Court, D. (1979) Ann.Rev.Genet. 13, 319-353.

Selker, E., Brown, K. and Yanofsky, C. (1977) J.Bacteriol. 129, 388-394.

Shimizu, N. and Hayashi, M. (1974) J.Mol.Biol. 84, 315-335.

Smith, O. and Yanofsky, C. (1962) in: Methods in Enzymology (Colowick, S.P., Kaplan, N.O., eds.), New York and London: Academic Press, vol. 5 pp 801-806.

West, R.W., Neve, R.L. and Rodriquez, R.L. (1979) Gene 7, 271-288.

Widera, G., Gautier, F., Lindenmaier, W. and Collins, J. (1978) Molec. gen. Genet 163, 301-305.

CHAPTER 3

THE CONSTRUCTION OF NEW VEHICLES FOR THE CLONING OF TRANSCRIPTION TERMINATION SIGNALS

ABSTRACT

We have constructed new plasmids that can be used to clone transcription terminator containing DNA fragments between the first gene of the tryptophan (trp) operon and the tetracycline resistance (tet) gene. Both genes are under control of the trp promotor. Therefore the presence of a transcription termination signal on cloned fragments can be monitored by a decrease in expression of the tet gene. The plasmids contain cloning sites at different distances from the translation start signal. Consequently a cloned DNA fragment can be translated in the three possible reading frames, offering the opportunity to distinguish terminators from translation polarity (pseudo-terminators). The usefulness of the plasmids was shown by the cloning of the trp terminator and of a pseudo-terminator located in the trpB gene.

INTRODUCTION

Gene expression is a very intricate process which is controlled, in part at the level of transcription. RNA synthesis is regulated not only at a transcription initiation region but also at a termination region (1). Transcription termination is dependent on the DNA structure of that region as well as on cellular components, like the transcription termination factor Rho (2). A comparison of the primary structure of a number of bacterial terminators has shown that there exist certain commonalities among terminators. The contribution of these common sequences in the mechanism of termination is not yet known (3).

To facilitate the study of termination sequences plasmids have been constructed for the cloning of these regulation signals (4,5). These plasmids have the property that DNA fragments, containing terminators, can be inserted between a promotor and a structural gene. The presence of a termination sequence between a promotor and a structural gene reduces or even blocks the expression of that gene. This property can be used for the identification of DNA fragments containing a termination signal.

Transcription termination occurs at terminators at the end of a gene, independently of protein synthesis. Transcription can also be arrested at terminator sequences in a gene - pseudo terminators -, but termination at these sites is dependent on protein. RNA synthesis is arrested at these pseudo-terminators when protein synthesis stops prematurely at a site located upstream of the terminator (6,7). Therefore the block of expression of the structural gene by insertion of a DNA fragment in front of it, signifies the presence of either a terminator or a pseudo-terminator.

In this paper we describe the construction of new plasmids that offer the possibility to distinguish between terminators and pseudo-terminators. The plasmids contain cloning sites between the first gene of the tryptophan (trp) operon and the structural gene that encodes tetracycline resistance (tet). The latter gene was brought under control of the trp promotor. The usefulness of the plasmids for the cloning of transcription termination signals was tested by the cloning of a terminator, the trp terminator and of a fragment of the trpB gene containing a pseudo-terminator.

METHODS AND MATERIALS

A) Genetic procedures. Transformation of E. coli bacteria was carried out as described by Kushner (8). After transformation bacteria were plated on minimal medium agar plates containing tetracycline (2-75 µg/ml) and selected for tryptophan independence and/or tetracycline resistance.

Tetracycline resistance was determined by plating of bacteria on minimal medium agar plates containing tetracycline. Agar plates were made freshly before each experiment and were inspected for colony formation after incubation for 17-40 h at 37 ^{o}C.

The E. coli bacterial strains used, are listed in Table 1.

B) Construction of plasmids

1. General procedures. To introduce new restriction sites in plasmid DNA, synthetic oligomers (linkers), containing a restriction site, were ligated to plasmid DNA after cleavage at a desired site with a restriction enzyme. For linkers used see Table 2. If necessary, single stranded protruding ends, e.g. those created by cleavage of plasmid DNA with EcoRI or HindIII were made blunt with T4 DNA polymerase in the pre-

Table 1. Bacterial strains.

Strain	Genotype	Source
HfrH (KMBL 3751)	$trpA_{am109}$ recA	MBL
C600 (JA221)	$trpE^{del5}$, recA	J. Carbon
W3110 (N337)	trpR, trpE, trpA, rho102	C. Yanofsky via C. Dambly
W3110 (N339)	trpR, trpE, trpA	Idem
HfrH (CA165)	supB	S. Brenner via M. Borrias

sence of a mixture of four deoxyribonucleoside triphosphates. In other cases single stranded ends were removed with S1 endonuclease. After ligation of the linker to these ends the DNA was incubated with the appropriate restriction enzyme, to obtain single stranded cohesive ends. This linear DNA was isolated on an 1% agarose gel, circularized and used for transformation.

Table 2. Structure of the linkers used.

linker	size	sequence
PstI	8 bp	GCTGCAGC
KpnI	10 bp	ATGGTACCAT
HindIII	10 bp	CCAAGCTTGG
EcoRI	12 bp	CATGAATTCATG

The KpnI and EcoRI linkers were a gift from H. Heijneker, the PstI and HindIII linkers were purchased from Collaborative Research (USA).

2. Construction of pHP16. The plasmid pHP16 is a derivative of pHP3 (9) and comprises the tet gene from pBR313 (10), the trp operon from E. coli and the origin of replication from pBR345 (11). It was obtained by digestion of pHP3 with SmaI, followed by joining of an EcoRI linker to the ends and ligation of the products to pBR345, after cleavage with EcoRI.

3. Construction of derivatives of plasmid pEP165.

- Plasmid pEP168 with a single EcoRI site between the trpE and tet gene. To construct a plasmid (pEP168) with a single EcoRI site between trpE and the tet gene both EcoRI sites in pEP165 were removed. Plasmid pEP165 was digested with EcoRI and the single stranded ends of the two fragments were made blunt with T4 DNA polymerase. After ligation of the two fragments with T4 DNA ligase and transformation of E. coli $trpE^{del5}$ bacteria, plasmid pEP167 was obtained with no EcoRI sites. Plasmid pEP168 was obtained by digestion of pEP167 with HindIII, the single stranded ends were filled in with T4 DNA polymerase and an EcoRI site was introduced, as described under B1.

- Plasmids pEP70 through pEP75 with a single PstI or KpnI restriction site between the trpE and tet gene. Plasmids pEP70 and pEP71 were obtained as described above by introduction of a PstI or a KpnI restriction site, respectively, by ligation of a linker to the filled in HindIII site of pEP165. Plasmids pEP72 and pEP73 were derived from pEP168 by introduction of a PstI or a KpnI site by introduction of a linker at the EcoRI site, as described for pEP70 and pEP71. Plasmids pEP74 with the PstI and pEP75 with the KpnI site, were constructed in the same way, except that the EcoRI ends were made blunt with S1 endonuclease instead of with T4 DNA polymerase.

4. Construction of pEP162 and pEP1651.

- Plasmid pEP162 with a reversed SalI-SalI fragment. Plasmid pEP162 (Fig. 2) was obtained by digestion of pHP16 with SalI, ligation of the fragments and selection for Trp^+ and Tet^s. Bacteria containing the parental plasmid pHP16 are tetracycline resistant, while those containing a plasmid with the SalI-SalI fragment in the reversed orientation, should be tetracycline sensitive.

- Plasmid pEP1651 with the trp terminator before tet. To obtain pEP1651, pEP162 was digested with HindIII and the 2.9 kilobase (kb) frag-

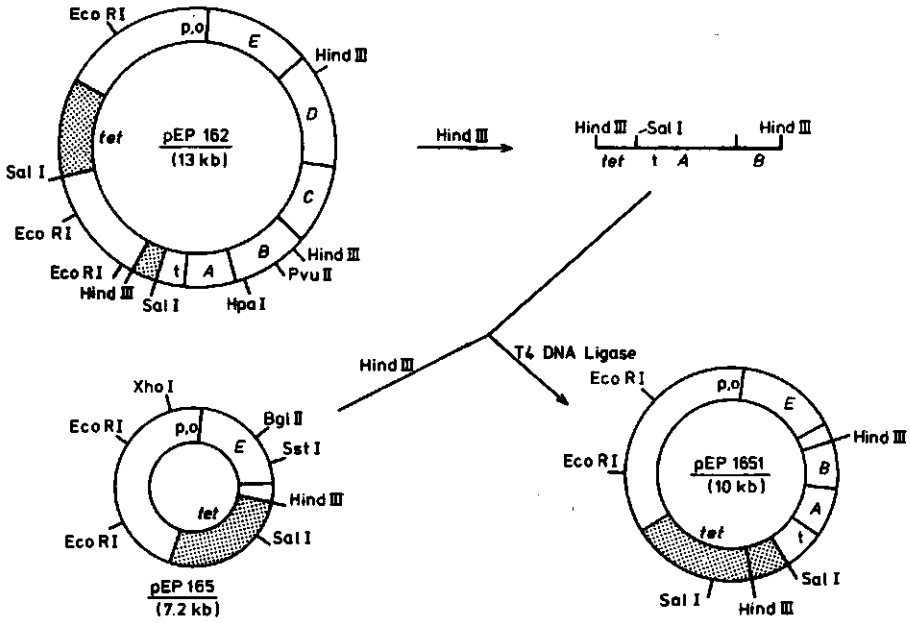

Figure 2. Schematic representation of the construction of pEP1651. A HindIII-HindIII fragment containing trpA and the transcription terminator t was isolated by digestion of pEP162 DNA with HindIII. The fragment was ligated to pEP165 DNA which was digested with HindIII. pEP162 is a derivative of pHP16 with the SalI fragment containing the promotor proximal part of the tet gene, in the reversed orientation with respect to pHP16.

ment with the trpA gene and the trp terminator (t) was isolated. This 2.9 kb fragment was ligated with pEP165 DNA which was also digested with HindIII (Fig. 2). The ligated mixture was used to transform E. coli trpA bacteria (KMBL 3751) to Trp^+.

5. Construction of pEP200, pEP201 and pEP41 with a trpB fragment before tet. For the construction of pEP200 we have made use of pEP168 and pEP1652. The latter plasmid is the same as pEP1651 (Fig. 2) but has the HindIII-HindIII fragment, containing the trp terminator and trpA, in the reversed orientation. Plasmid pEP1652 DNA was digested with HpaI and an EcoRI linker was ligated to this DNA. After EcoRI and SalI digestion a

1.6 kb fragment (fragment 1) was isolated. This 1.6 kb fragment contains part of the trpB gene (1.0 kb) and the first part of the tet gene (0.6 kb). Plasmid pEP168 was digested with SalI and EcoRI and the largest fragment (6.7 kb; fragment 2) was isolated. Fragment 1 and fragment 2 were joined and used to transform E. coli $trpE^{del5}$ (JA221) bacteria. From a series of Trp^+ transformants plasmid DNA was prepared for restriction enzyme analysis. Plasmid DNA with a molecular weight of 8.3 kb and unique restriction sites for EcoRI and HindIII, was designated pEP200.

For the construction of plasmid pEP201 in which the orientation of the 1.0 kb trpB fragment between trpE and tet is reversed we have used pEP200 and pEP301 (Fig. 3). Plasmid pEP301 is a derivative of pHP3 and was obtained by circularization of the 9.2 kb HindIII-HindIII fragment of pHP3 (9). Plasmid pEP301 was digested with EcoRI and HpaI and a 1.0 kb

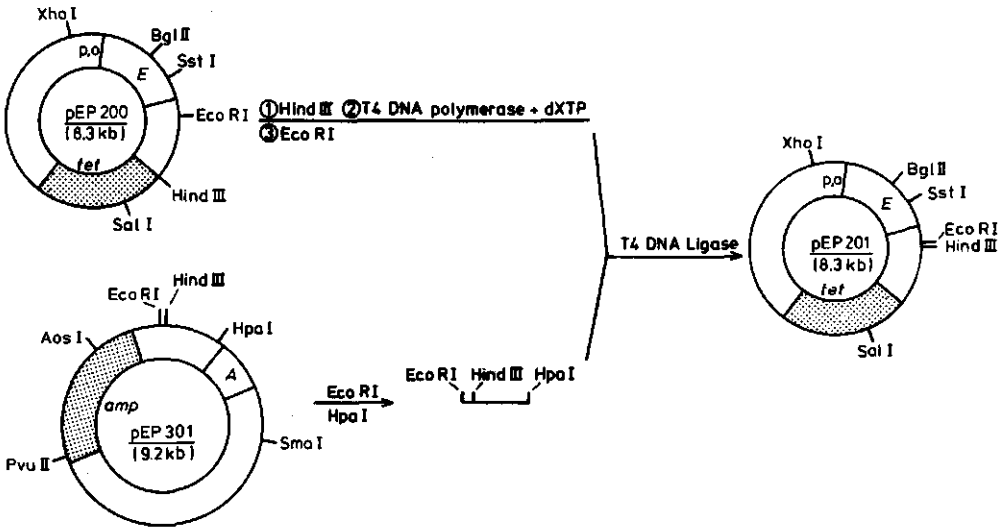

Figure 3. Schematic representation of the construction of pEP201. The plasmid pEP201 was derived from pEP200 by replacement of the EcoRI-HindIII fragment by an EcoRI-HpaI fragment from pEP301 DNA. Plasmid pEP301 is a derivative of pHP3 and contains the amp gene and the trpA gene.

fragment (fragment 3) was isolated by gelelectrophoresis. pEP200 was digested with HindIII, the sticky ends were made blunt by T4 DNA polymerase and the resulting molecules were cleaved with EcoRI. The largest fragment (fragment 4; 7.2 kb) was purified by gelelectrophoresis. Fragment 3 and fragment 4 were ligated and this DNA was used to transform E. coli $trpE^{del5}$ (JA221) bacteria to tryptophan independence. The transformants contained a plasmid pEP201 which has the expected molecular weight of 8.3 kb.

Plasmid pEP41 was obtained by digestion of pEP201 with HindIII and EcoRI, filling in the sticky ends with DNA polymerase and circularization of the DNA. The absence of the EcoRI-HindIII fragment in the plasmid (pEP41) formed was confirmed by the loss of a ClaI restriction site which is present between these two restriction sites.

6. Construction of pEP31, pEP61, pEP44 and pEP45 with the trpB sequence in different reading frames. Plasmid pEP31 was constructed by digestion of pEP201 with EcoRI, filling in the single stranded ends and ligation of a HindIII linker to these ends. After HindIII digestion the large DNA fragment was isolated and circularized (pEP31). In pEP61 the XhoI-HindIII fragment of pEP201 was replaced by the XhoI-HindIII fragment, containing trpE, of plasmid pEP165.

To construct pEP44, a KpnI site was introduced into the HindIII site of pEP201, as described above. Subsequently the XhoI-KpnI fragment of this plasmid was replaced by the corresponding XhoI-KpnI fragment from pEP73, yielding pEP44. Plasmid pEP45 was constructed in the same way except that a PstI site was first introduced at the HindIII site of pEP201 (pEP2011). The XhoI-PstI fragment of pEP2011 was replaced by the XhoI-PstI fragment, containing trpE, from pEP72. A summary of the properties of the plasmids constructed is given in Table 3.

C) DNA manipulations. Conditions of incubation with restriction enzymes and T4 DNA ligase were as described before (9). Gelelectrophoresis was performed on agarose gels (1%, Miles) as described before (9). DNA fragments were electrophoretically eluted from the agarose gels and collected in a small dialysis tubing. The eluted DNA was purified by phenol extraction. After precipitation with ethanol the DNA was dissolved in a small volume, and used for ligation experiments.

EcoRI was purchased from Miles (USA) and PvuII from Biolabs (USA).

Table 3. Plasmids

plasmid	cloning site	size	phenotype	source
pBR345		1.2 kb	-	11
pHP3		18 kb	Tet^R, Amp^R, Trp^+	9
pHP16		13 kb	Tet^R, Trp^+	this paper
pEP162		13 kb	Tet^S, Trp^+	11
pEP301		9.2 kb	Amp^R	this paper
pEP165	HindIII	7.2 kb	Tet^R, $TrpE^+$	this paper
pEP168	EcoRI	"	" "	"
pEP70	PstI	"	" "	"
pEP71	KpnI	"	" "	"
pEP72	PstI	"	" "	"
pEP73	KpnI	"	" "	"
pEP74	PstI	"	" "	"
pEP75	KpnI	"	" "	"
pEP1651		10 kb	Tet^S, $TrpE^+$, $TrpA^+$	"
pEP1652		10 kb	Tet^S, $TrpE^+$	"
pEP200		8.3 kb	Tet^S, $TrpE^+$	"
pEP201		8.3 kb	Tet^S, $TrpE^+$	"
pEP31		9 kb	Tet^R, $TrpE^+$	"
pEP41		"	Tet^S, $TrpE^+$	"
pEP44		"	Tet^S, $TrpE^+$	"
pEP45		"	Tet^R, $TrpE^+$	"
pEP61		"	Tet^R, $TrpE^+$	"

HpaI, T4 DNA ligase and T4 DNA polymerase were purified as described before (9). SalI was a gift from B. Koekman and G. Ooms (University of Leiden), HindIII from M. Lupker (Leiden), PstI from C. v. Sluis (Leiden).

RESULTS

Construction and properties of pEP165 and its derivatives. For the construction of the plasmids, which can be used for cloning transcription termination signals we have taken advantage of the presence of a HindIII site in the promotor of the tet gene (12). This offers the opportunity to separate the tet gene from its promotor and bring the structural part under control of a foreign promotor, e.g. the trp promotor.

a) Construction of pEP165. To obtain a plasmid with the tet gene under control of the trp promotor, pHP16 was digested with HindIII and a 6.1 kb fragment containing the trpE and the tet gene, but lacking the origin of replication, was isolated (Fig. 1). This fragment was circula-

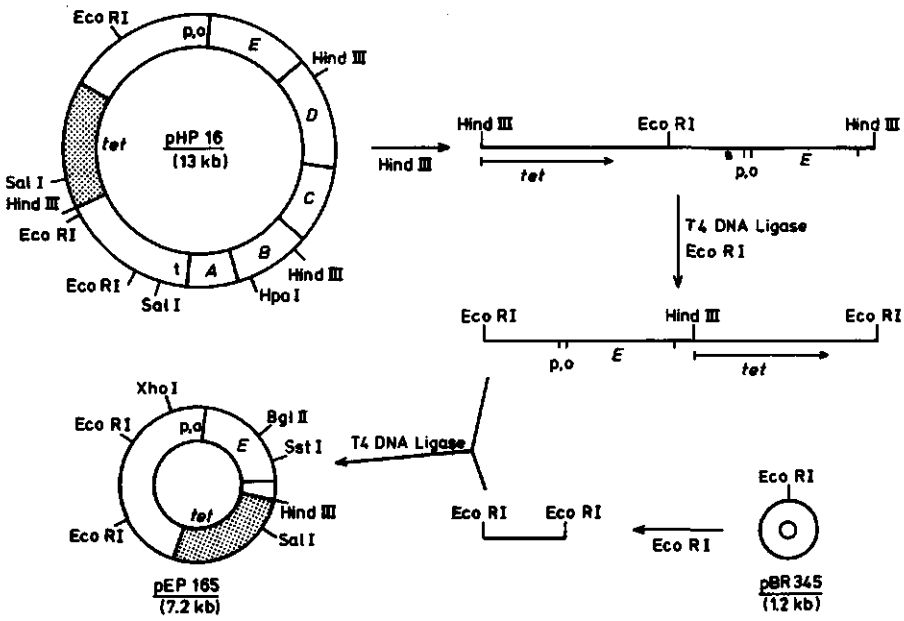

Figure 1. Schematic representation of the construction of pEP165. The plasmid pEP165 was derived from pHP16 by digestion with HindIII, isolation of the fragment containing tet and trpE, circularization of the fragment, followed by digestion with EcoRI and ligation with pBR345 DNA which was cleaved with EcoRI.

rized in vitro by T4 DNA ligase. To complete the plasmid an EcoRI-EcoRI fragment, containing the origin of replication, was inserted into the single EcoRI restriction site. The resulting plasmid pEP165, with one HindIII site between the trpE and the tet gene and a molecular weight of 7.2 kilobase (kb; Fig. 1) was used for further study.

The tet gene in plasmid pEP165 is located downstream from the trp promotor and is expected to be controled by the trp regulatory elements. As was shown by Hallewell and Emtage (13) the Tet phenotype of bacteria is affected by the presence of repressor (tryptophan) or inducer (3β-indole acrylic acid) in the medium, when the tet gene is brought under control of the trp promotor. We have confirmed their data by showing (Table 4) that bacteria (JA221) containing pEP165 grow at a tetracycline concentration of 50 µg/ml in the absence of tryptophan. In the presence of tryptophan (200 µg/ml) they do not grow at this concentration of the drug but the repression by tryptophan does not completely block the expression of the tet gene; bacteria, containing pEP165, do grow at a lower tetracycline concentration of 30 µg/ml in the presence of 200 µg tryptophan per ml (results not shown). At a tetracycline concentration of 60 µg/ml JA221-pEP165 does not grow. However, in the presence of the inducer 3β-indole acrylic acid the bacteria do grow. In the presence of this inducer they even grow at a tetracycline concentration of 80 µg/ml (results not shown). The presence of tryptophan or 3β-indole acrylic acid has no effect on the tetracycline resistance of bacteria containing pHP16 or pBR322 (Table 4).

From these results we conclude that the expression of the tet gene in pEP165 is under control of the trp regulatory region.

Plasmid pEP165 has a ribosome binding site - the ribosome binding site of the trpD gene - located upstream of the HindIII cloning site. Translation of a fragment cloned into the HindIII fragment starts at the trpD ribosome binding site. To allow translation of cloned fragments to take place in the three possible reading frames, we have constructed plasmids with cloning sites in different reading frames. For this purpose we made the HindIII ends of pEP165 blunt and ligated various linkers to them. In this way we obtained plasmids with a PstI site in 3 different reading frames (pEP70, 72, 74) and plasmids with a KpnI site in 3 different reading frames (pEP71, 73, 75). In addition we obtained a plasmid

Table 4. The effect of tryptophan (trp) and 3β-indole acrylic acid (IAA) on the growth of plasmid DNA containing bacteria in the presence of tetracycline (tet).

plasmid	50 µg tet/ml trp (µg/ml)		60 µg tet/ml IAA (µg/ml)	
	0	200	0	5
pBR322	+*	+	+*	+*
pHP16	+	+	+	+
pEP165	+	-	-	+

Bacteria (JA221) containing plasmid DNA were plated on minimal medium agar plates containing tetracycline (tet) as indicated. The plates were supplemented with tryptophan or 3β-indole acrylic acid as indicated. Colony formation was determined after incubation at 37 °C for 20 h. *Minimal medium agar plates for pBR322-JA221 contained tryptophan (5 µg/ml).

with an EcoRI site before the tet gene (pEP168). Some relevant characteristics of the plasmids are given in Table 3.

Insertion of a DNA fragment containing the trp terminator into pEP165. We have first tested the applicability of our plasmids for the cloning of transcription terminators by cloning a well known transcription terminator i.e. the trp terminator into the HindIII site of pEP165.

The trp terminator (t) is located at the end of the trp operon beyond trpA (14) and can be obtained from the plasmid pHP16 (Fig. 1). To clone the terminator into the HindIII site we wished to have a fragment with two HindIII ends and a selectable marker, the trpA gene. To obtain such a fragment we first constructed another plasmid, pEP162, in which the orientation of the SalI-SalI fragment containing the origin of replication was inverted (Fig. 2). The 2.9 kb HindIII fragment from pEP162, with the trpA gene and the trp terminator was then inserted into the HindIII site of pEP165. Plasmid DNA from tetracycline sensitive bacteria was isolated for the determination of the plasmid structure. The plasmid which contained the 2.9 kb HindIII fragment between the trpE and the tet

gene in the expected orientation was designated pEP1651 (Fig. 2).

Transcription termination at the end of the trp operon is dependent on the transcription termination factor Rho (15). In the absence of this protein RNA polymerase molecules will read through this terminator. If the lack of expression of the tet gene in pEP1651 is the consequence of the presence of the trp terminator between the promotor and this gene, the expression of the tet gene should be influenced by the transcription termination factor Rho. Bacteria lacking a functional Rho protein will show a reduced termination at the trp termination site, that will result in an increased expression of the tet gene.

The dependency on the Rho protein of the tet gene expression in pEP1651 was tested by comparing the tetracycline resistance in bacteria with wild type and mutated Rho protein. For this experiment we have used the E. coli strains W3110 trpE, trpA, Rho102 (N337) and an isogenic strain (N339) with the wild type Rho protein. The mutant Rho factor in N337 allows approximately 7% read-through at the trp terminator (15). N337 and N339 were transformed with the plasmids pBR322, pHP16, pEP165 and pEP1651 and transformants were selected for Trp^+, in the case of pEP1651 and pHP16, and for Tet^R in the case of pEP165 and pBR322. The results show that Rho^+ bacteria N339-pEP1651 are sensitive to 1 µg tetracycline per ml and Rho^- bacteria N337-pEP1651 are resistant to 5 µg tetracycline per ml (Table 5, line 4). The Rho^- property has no effect on the tetracycline resistance of bacteria (N337), containing pBR322, pHP16 or pEP165, while bacteria without plasmid are sensitive to a tetracycline concentration of 1 µg/ml (Table 5, lines 1, 2, 3 and 5).

We conclude that the expression of the tet gene in pEP1651 is blocked because of a Rho dependent transcription termination signal between the trp promotor and the tet gene.

Insertion of a DNA fragment containing a pseudo-terminator. We have tested also the applicability of our plasmids to identify pseudo-terminators, by the cloning of an internal fragment (HindIII-HpaI) of the trpB gene (Fig. 2). Evidently this fragment does not contain a terminator, yet insertion of the fragment in pEP73 (pEP44) blocks the expression of the tet gene (Table 6). Since the Tet^R phenotype is restored in the presence of an ochre suppressor we assume that the fragment contains a pseudo-terminator. Apparently, by suppression of a nonsense codon, translation

Table 5. The effect of Rho factor on the expression of the tetracycline resistance (tet) gene.

Plasmid	Tetracycline resistance (µg/ml) Bacterial strains	
	N339 (Rho^+)	N337 (Rho^-)
pBR332	>10	>10
pHP16	>10	>10
pEP165	>10	>10
pEP1651	< 1	5
-	< 1	< 1

Bacteria were plated on minimal medium agar plates containing tryptophan (5 µg/ml) and tetracycline as indicated. Colony formation was inspected after incubation at 37 °C for 40 h.

Table 6. The effect of an ochre suppressor supB on the tetracycline resistance of bacteria containing plasmid DNA.

Plasmid	Tetracycline resistance (µg/ml) Bacterial strains	
	CA165	JA221
pEP44	10	< 1
pEP165	>20	>20
pEP41	< 1	< 1

The effect of an ochre suppressor on the expression of the tet gene was determined by measuring the tetracycline resistance of bacteria (CA165) containing pEP44, pEP165 or pEP41. The tetracycline resistance in the absence of the ochre suppressor was determined in the bacterial strain JA221 containing the various plasmids. Plasmid pEP44 has an amber stopcodon and plasmid pEP41 has an opal stopcodon located before the pseudo-terminator. Plasmid pEP165 doesn't contain the trpB fragment with the pseudo-terminator.

proceeds beyond the pseudo-terminator, relieving the polar effect on the expression of the tet gene.

The trpB fragment was cloned into different plasmids through which the sequence was translated in the three possible reading frames. Knowing the sequence of the trpD (16) and trpB genes (17) it is possible to predict the translation reading frame of the HindIII-HpaI fragment cloned in different plasmids (Fig. 4). Plasmids pEP31 and pEP61 have an open reading frame all through the trpB fragment. In plasmid pEP41 and pEP45 the trpB fragment is translated in the other two reading frames with translation stopsignals occurring at the 39th (TGA) and 49th (TGA) triplet of the trpB gene, respectively. Plasmid pEP44 has the same reading frame as pEP45 but contains a translation stopsignal at the junction of the linker and the trpB sequence.

GAA GCT CAT GAA TTC CAA GCT TTT GTC AGT GCG CAA AAA GAT CCT GAA TTT CAG pEP31

GAA GCT CAT GAA TTC CAA GCT AGC TTT TGT CAG TGC GCA AAA AGA TCC TGA pEP41

GAA GCT CAT GAA TTC CAA GCT ATG GTA CCA TAG CTT TTG TCA GTG CGC AAA AAG
ATC CTG AAT TTC AGG CTC AGT TCA ACG ACC TGC TGA pEP44

GAA GCT CAT GAA TTG CTG CAG CAG CTT TTG TCA GTG CGC AAA AAG ATC CTG AAT
TTC AGG CTC AGT TCA ACG ACC TGC TGA pEP45

GAA GCT TTT GTC AGT GCG CAA AAA GAT CCT GAA TTT CAG pEP61

Figure 4. Nucleotide sequence of the linker and the beginning of the cloned trpB fragment in different plasmids. The nucleotide sequence of the different plasmids indicated comprises the junction of trpD and trpB via a linker. The first triplet represents the 92th codon of trpD (16) and the sequence of the trpB fragment starts at the 30th codon (17). The structure of the linkers used is shown in Table 3. Plasmids pEP31 and pEP61 have an open reading frame all through trpB. The stopcodons in the other plasmids are underlined. The nucleotide sequence is written in the 5'—— 3' direction.

Bacteria containing plasmid pEP31, pEP61 or pEP45 show the same tetracycline resistance as is found for bacteria containing pEP165. However, the two other plasmids (pEP41 and pEP44) don't confer the bacteria to tetracycline resistance. From these results we conclude that the change of the translation reading frame of the trpB fragment, affects the expression of the tet gene.

DISCUSSION

In this study we have exploited the tetracycline resistance marker to construct plasmid vectors which can be used to clone transcription termination signals. This was achieved by splitting of the tet gene and placing its structural part behind trpE, under control of the trp promotor. This has yielded a plasmid, which confers tetracycline resistance to the host bacteria. As the site to insert DNA fragments into the plasmid we have chosen one between trpE and tet. This has the advantage that expression from the promotor which controls the tet gene is assured, if one selects for the product of the gene upstream of the insertion, trpE. A decrease of the tetracycline resistance then signifies the presence of a transcription termination signal on a cloned DNA fragment.

The loss of the tetracycline resistance can be used indeed as a selection for cloning transcription terminator containing DNA fragments between trpE and tet, as was demonstrated by cloning a DNA fragment containing the trp terminator. The following arguments lead to the conclusion that the tetracycline sensitivity of pEP1651, in which the trp terminator is cloned, is due to transcriptional termination at the trp terminator.

I. Tetracycline resistance of bacteria containing pEP1651 is Rho dependent. The bacteria become tetracycline resistant when they lack a functional Rho protein. This indicates that the tetracycline sensitivity is due to transcriptional termination. The tetracycline resistance level, observed for pEP1651 is 8% of that found for pEP165. This level closely corresponds to the value which one would expect, assuming 7% readthrough at the trp terminator (15). We conclude that the absence of tet gene expression in pEP1651 is due to transcription termination at the trp terminator which is present between the tet gene and the trp promotor.

II. In pEP1651 a segment of trpB is fused to the trpD segment of the

vector and is translated in the correct reading frame. Therefore transcriptional polarity, caused by a premature arrest of translation of the trpB segment cannot account for the Tet^S phenotype. In addition, transcription proceeds unimpeded to the end of the trpA gene, as can be concluded from the finding that expression of trpA in plasmids, like pEP121 (9) or pEP1651, in which trpB and trpD have been fused correctly, is as efficient as in plasmids which contain an intact trp operon (our unpublished observations).

III. pEP1651 contains an inverted repeat (IR) formed by two copies of the SalI-HindIII fragment of the tet gene. Bacteria containing pEP1651 might become tetracycline sensitive due to the occurrence of a deletion which eliminates the IR (18; Pannekoek, personal communication). This is not the case since the structure and size of the plasmid in the tetracycline sensitive bacteria containing pEP1651 does not change.

If a Tet^S phenotype is due to polarity (pseudo-terminator) one would expect that the polarity would be alleviated if the cloned fragment is translated in the correct reading frame. By the cloning of a fragment containing a pseudo-terminator, at different distances from the translation startsignal, it is possible to change the reading frame into the correct one. We have introduced PstI and KpnI restriction sites at different distances from the translational startsignal to guarantee translation of the inserted DNA in the three possible reading frames.

The conclusion that the plasmids constructed can be used also to isolate and identify pseudo-terminators in cloned fragments rests upon experiments with the HindIII-HpaI fragment from trpB. The assumption that this fragment contains a pseudo-terminator is based upon the results of experiments showing that bacteria containing pEP44 are Tet^R in the presence of an ochre suppressor, but are Tet^S in the absence of this suppressor.

An analysis of the nucleotide sequence of the HindIII-HpaI fragment from trpB and of the effects of a change of the reading frame on the Tet phenotype of different plasmids enables one to tentatively identify the pseudo-terminator. Inspection of the nucleotide sequence of the HindIII-HpaI region and of the linkers used (see Table 2) in the construction of the different plasmids reveals that in pEP31 and pEP61 the inserted trpB fragment is read in the correct frame (Fig. 4). The reading frame of

pEP45 has shifted by one basepair (+1) and contains stopcodons, the first one being an opal codon (TGA) at the 49th triplet of trpB. These plasmids confer a Tet^R phenotype to bacteria. The reading frames of pEP44 and pEP45 are the same but pEP44 contains an amber codon (TAG) at the junction of the linker and trpB, that is absent from pEP45. In pEP41 the reading frame has shifted 2 basepairs (-1). In this plasmid the first stopcodon is an opal codon at the 39th triplet of trpB. Bacteria containing pEP41 are Tet^S. The results can be explained by assuming that transcription of the tet gene is strongly reduced, when translation is arrested at or before the 39th triplet of trpB, but proceeds uninterrupted, when translation passes beyond the 49th triplet. Consistent with this interpretation is the finding that pEP44, although it is read in the same frame as pEP45, yields a Tet^S phenotype, because of the presence of an amber codon before the trpB sequence.

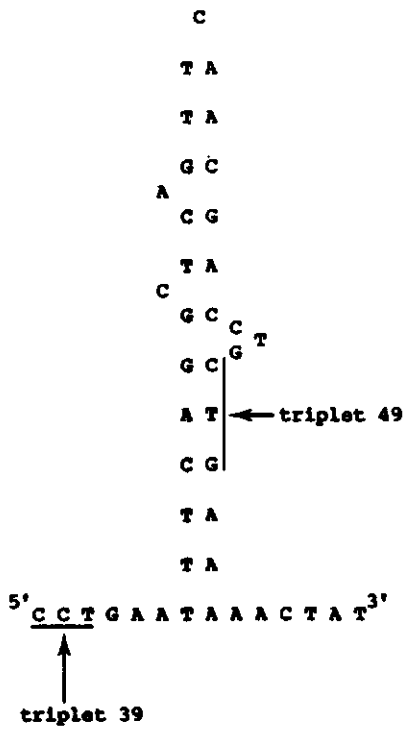

Figure 5. Representation of the sequence of the pseudo-terminator in the trpB sequence.

Interestingly the sequence between the 41th and 50th triplet of trpB can be folded into a stem and is followed by a row of A residues. This structure is reminiscent of the structures found at termination signals (3; Fig. 5). We propose that RNA synthesis is arrested at this site under conditions that translation of this region of trpB is prohibited. From in vitro transcription studies Shimizu and Hayashi (19) and Pannekoek, Perbal and Pouwels (20) have postulated the presence of a Rho dependent transcription terminator near the trpC-trpB border. The pseudo-terminator investigated in this study might be the structure that was suggested by those investigators.

The distinction between tetracycline sensitive and tetracycline resistant bacteria forms the basis of the selection of transcription terminator containing fragments. In principle plasmids with a cloned terminator also offer the oppertunity to isolate mutations in the terminator by selecting bacteria with a tetracycline resistant phenotype, starting from tetracycline sensitive bacteria.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Dr. H. Pannekoek for the help with the preparation of the manuscript. These studies were supported (in part) by the Netherlands Foundation for Chemical Research (SON) of the Netherlands Organization for the Advancement of Pure Research (ZWO).

REFERENCES

1. Chamberlin, N.J. (1976) in RNA polymerase (Losick, R. and Chamberlin, M., eds.), pp. 17-67, Cold Spring Harbor Laboratory.
2. Roberts, J.W. (1969) Nature (Lond.) 224, 1168-1174.
3. Rosenberg, M. and Court, D. (1979) Ann. Rev. of Genet. 13, 319-353.
4. Crombrugghe, B. de, Mudryj, M., Dilauro, R. and Gottesman, M. (1979) Cell 18, 1145-1151.
5. Casadaban, M.J. and Cohen, S.N. (1980) J. Mol. Biol. 138, 179-207.
6. Morse, D.E. and Yanofsky, C. (1969) Nature 224, 329.
7. Adhya, S., Gottesman, M., Crombrugghe, B. de and Court, D. (1976) in RNA polymerase (Losick, R. and Chamberlin, M., eds.) pp. 719-730, Cold Spring Harbor Laboratory.
8. Kushner, S.R. (1978) in Genetic Engineering (Boyer, H.W. and Nicosia, S., eds.) pp. 17-25, Elsevier/North Holland, Amsterdam.
9. Enger-Valk, B.E., Heijneker, H.L., Oosterbaan, R.A. and Pouwels, P.H. (1980) Gene 9, 69-85.
10. Bolivar, F., Rodriquez, R.L., Betlach, M.C. and Boyer, H.W. (1977a) Gene 2, 75-93.
11. Bolivar, F., Rodriquez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heijneker, H.L., Boyer, H.W., Arosa, J.H. and Falkow, S. (1977b) Gene 2, 95-113.
12. Tait, R.C., Rodriquez, R.L. and Boyer, H.W. (1977) Molec. gen. Genet. 151, 327-331.
13. Hallewell, R.A. and Emtage, S. (1980) Gene 9, 27-47.
14. Mitchell, D.H., Reznikoff, W.S. and Beckwith, J. (1976) J. Mol. Biol. 10, 441-457.
15. Guarante, L.P., Mitchell, D.H. and Beckwith, J. (1977) J. Mol. Biol. 112, 423-436.
16. Nichols, B.P., Miozzari, G.F., Cleemput, M. van, Bennett, G.N. and Yanofsky, C. (1980) J. Mol. Biol. 142, 503-517.
17. Crawford, J.P., Nichols, B.P. and Yanofsky, C. (1980) J. Mol. Biol. 142, 489-502.
18. Sadler, J.R., Betz, J.L., Tecklenburg, M., Goeddel, D.V., Yansura, D.G. and Caruthers, H.H. (1978) Gene 3, 211-232.
19. Shimizu, N. and Hayashi, M. (1974) J. Mol. Biol. 84, 315-335.
20. Pannekoek, H., Perbal, B. and Pouwels, P.H. (1974) Molec. gen. Genet. 132, 291-306.

CHAPTER 4

The importance of the -35 and -10 region for the functioning of the promotor of the tetracycline resistance gene

SUMMARY

By in vitro recombination we have joined the -35 region of the tet promotor to different sequences. This results in the formation of promotors with different -10 regions but with the same -35 region. The in vivo activity of these promotors was determined by measuring the expression of a downstream gene, trpA or trpE. The in vitro properties of the promotors were determined by measuring the protection of restriction sites within the promotor region by RNA polymerase. Our results suggest that the -35 region of the tet promotor is sufficient for the formation of a stable promotor-RNA polymerase complex at this region,whereas the formation of the initiation complex is determined by the structure of the -10 region.

INTRODUCTION

Sequence homologies have been noted among many promotors recognized by Escherichia coli RNA polymerase (1, 2). Each promotor contains a seven basepair (bp) sequence known as the Pribnow box (3, 4, 5) or -10 sequence located at about 10 bp upstream of the RNA initiation site. Sequence homology among different promotors can also be found in a region centered around position -35 (6, 7). The importance of these two regions for promotor function is based on the finding that the great majority of mutations that affect promotor function map either in the "-35" or in the "-10" region (2). Besides, physical and chemical studies clearly show that the RNA polymerase molecule predominantly interacts with the regions at -35 and -10 (8).

The interaction of the RNA polymerase molecule with the promotor region is a complex process comprising several discrete steps. The importance of the two regions seems to be at different steps of this process. The -35 region has been implicated in the recognition of the promotor by RNA polymerase (5) after which a "closed" complex is formed (10). The -10 region is thought to be involved in a so called isomerization reaction (9)

by which a closed complex is converted into an "open" complex (10, 11). The latter process, which involves the unwinding of a limited number of basepairs, probably is the rate limiting step in the initiation process (9), since the last step, the initiation of transcription proceeds very rapidly as soon as an open complex is formed.

The promotor of the tetracycline (tet) resistance gene of plasmids like pBR313 (12) and pBR322 (13) contains a HindIII restriction site which partially overlaps with the -10 region (14). Thus it is possible to split the promotor and replace the -10 region by different nucleotide sequences by in vitro recombination. We have constructed plasmid derivatives of pBR313 with reconstituted tet promotors, comprising the original -35 region but different -10 regions.

We have used these plasmids to study the expression in vivo of a gene (trpA) which was fused to these reconstituted promotors. We have also measured the effect of differences in the -10 region on the in vitro interaction of RNA polymerase with the -35 and -10 region of these promotors.

Our results support the conclusion that the -10 region is important for the formation of an open complex. In addition they show that the -35 region determines the formation of a stable promotor- RNA polymerase complex at this site, which can be distinguished from the open or initiation complex.

METHODS AND MATERIALS

Bacterial strains The bacterial strains used are C600 $trpE^{del5}$ recA (JA221), obtained from J. Carbon, HfH $trpA_{am}$ recA (KMBL 3751) and $W3110EA^{del2}$ with a deletion which has removed the entire trp operon.

Construction of plasmids

Plasmid pEP301 (Fig. 1; 15) was used for the construction of pEP3017 and pEP3018.

- Plasmid pEP3017.

Plasmid pEP301 was digested with HpaI and a HindIII linker (CCGAATTCGG) was ligated to this DNA. After HindIII digestion a fragment of 8.2 kb, containing the amp gene and the trpA gene was isolated

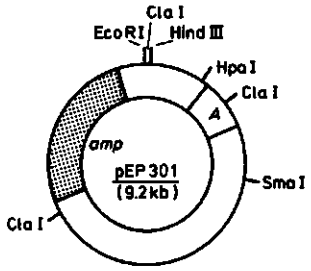

Fig. 1. Representation of the plasmid pEP301
The plasmid pEP301 contains the trpA gene, without the trp promotor and the amp gene. The -35 region of the tet promotor is located on the small fragment between the EcoRI site and HindIII site.

by gelelectrophoresis. Subsequently this fragment was circularized by T4 DNA ligase and used for transformation of W3110EA^{del2} bacteria. Transformants were selected for Amp^{R}.

- Plasmid pEP3018

  Plasmid pEP301 was digested with HindIII and the sticky ends were made blunt by T4 DNA polymerase in the presence of dNTP's. This DNA was circularized and after HindIII digestion (to digest the parental plasmid pEP301) used for transformation of trpArecA (KMBL3751) bacteria. Transformants were selected for Amp^{R}.

- Plasmid pEP306.

  For the construction of pEP306 we have made use of pEP301 and pEP166. Plasmid pEP166 is a derivative of pEP165 (16) with a single EcoRI site between the origin of replication and the trp promotor (see chapter 3, Fig.1). DNA of pEP301 was digested with EcoRI and HpaI and the promotor containing fragment of 1.0 kb was isolated by gelelectrophoresis. Plasmid pEP166 was digested with the same enzymes and the 5.7 kb fragment containing trpE was isolated. The fragments were ligated with T4 DNA ligase and used for transformation of trpE^{del5}recA bacteria (JA221). Transformants were selected for tryptophan independence.

- Plasmid pEP308.

  In the same way as described for pEP306, the 1.0 kb EcoRI-HpaI fragment of pEP3018, containing the promotor, was cloned into plasmid

pEP166, yielding pEP308.

DNA protection by RNA polymerase

The protection by RNA polymerase of DNA against endonucleolytic attack by a restriction enzyme, was measured as follows. Experiments were carried out with sigma-saturated RNA polymerase (E^{σ}) provided by J. Hamming, University of Groningen.The enzyme was prepared from E.coli K12 according to the method of Burgess and Jendrisak (17). RNA polymerase was bound to plasmid DNA at a molar ratio of 20:1 (E^{σ}/DNA). A reaction mixture of 20 µl contained 2.5% glycerol, 20 mM Morpholinopropane-sulfonic-acid (MOPS) buffer pH 7.0, 10 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl and 0.15 µg plasmid DNA. Upon the addition of 5 µl RNA polymerase the mixture was incubated at 37°C for 1-10 min, or at 14°C for 1-10 min to form a complex between the enzyme and DNA. Subsequently heparin was added to a final concentration of 20 µg/ml, to eliminate non specific interaction of DNA and enzyme. Two min later an amount of restriction enzyme, sufficient to yield complete digestion of the control sample (without E^{σ}), was added and the incubation was continued for 10 min. In experiments, in which the initiation of RNA synthesis was measured, a mixture of 4 ribonucleoside-triphosphates (final concentration ATP and GTP 10^{-4}M, CTP and UTP 0.5 x 10^{-4}M) was added after 2 min incubation in the presence of heparin. After heat treatment of the incubation mixture (10 min at 60°C in the presence of 0.4% SDS) the DNA samples were analyzed by gelelectrophoresis on 0.85% agarose gels. The gels were stained with ethidiumbromide, photographed and the negative was used to measure the density of the bands. The density of the different bands was measured with a Steinhill microdensitometer. The percentage protection is given by the ratio of the density of uncleaved DNA and cleaved + uncleaved DNA, after correction for differences in molecular weight of the DNA fragments. For the ClaI experiment, uncleaved DNA is the fragment which arises when the ClaI site in the promotor is not recognized; for the experiments with EcoRI, incleaved DNA is circular DNA.

In vivo RNA synthesis and RNA-DNA hybridization

Bacteria (W3110EA^{del2}) containing plasmid DNA (pEP301 or pEP3018), were grown in M9 medium (8 ml) in the presence of 20 µg/ml ampicillin and 2 µg/ml tryptophan. After the bacterial culture had reached a density of 0.1 ($1x10^8$/ml), the bacteria were sedimented by centrifugation, resuspended in fresh medium and labelled for 90" with 500 µCi (^{3}H)-uracil. ^{3}H-labelled RNA was isolated as described before (18). Determination of the amount of (^{3}H)-RNA hybridizing to the 1-DNA strand of λEDCBA-BG2 DNA, containing the 5 genes of the trp operon (19), was performed as described before. The hybridization values were corrected for non specific hybridization by measuring the hybridization with 1-λDNA.

Determinations of TSase A and β-Lactamase

The trpA protein (Tryptophan sythetase A; TSase A) activity was determined by the method of Smith and Yanofsky (20). This assay is based upon the conversion of indole into tryptophan. The disappearance of indole, is measured spectrophotometrically at 540 mµ. One unit of TSase A is defined as the amount of enzyme that catalyses the conversion of 0.1 µmol of substrate to product in 20 min at 37°C under the conditions of the experiment. β-Lactamase activity was determined by the method of O'Callaghan et al., (21). The assay is based on the rate of hydrolysis of the amide bond of the β-lactamring of an aromatic compound (nitrocefin) by which the absorption at 482 nm increases. One unit of β-lactamase is defined as the amount of enzyme that causes a ΔOD at 482 nm of 1.7 per minute at 37°C. Determination of the trpE protein (Antranilate synthetase; ASase) activity was performed by the method of Ito and Yanofsky (23). ASase activity can be measured by fluorometrically following the formation of anthranilic acid from chorismic acid. One unit of trpE enzyme is defined as the amount of enzym catalyzing the conversion of 0.1 µmol of chorismic acid into anthranilic acid in 20 min at 37°C, under the conditions of the experiment.

Protein concentrations were determined according to the method of Lowry et al. (22), with bovine serum albumin as a standard.

Enzymes and conditions of incubation

EcoRI and HindIII were purchased from Boehringer, HpaI, T4 DNA ligase and T4 DNA polymerase were purified as described elsewhere (24). All incubations with the enzymes were carried out as described before (24).

Recombinant DNA techniques

The preparation of plasmid DNA, the electrophoretic separation of DNA fragments on agarose gels, the ligation of DNA fragments and the transformation of E.coli bacteria with plasmid DNA was carried out as described before (24).

RESULTS

Plasmid pEP301 is a derivative of pHP3 (24) and contains the complete trp A gene but not the trp promotor (Fig. 1; see also chapter 2). By digestion of pHP3 with HindIII the trpB gene and the promotor of the tet gene (14) are split such that the -35 region of the tet promotor is joined to the C terminal end of the trpB gene (Fig. 1; 15). Derivates of pEP301 with different sequences at the fusions between the tet promotor region and the trpB gene, were obtained by filling in the HindIII restriction site (pEP3018) or by replacing the HindIII-HpaI fragment by an HindIII linker (pEP3017). Bacteria (trpA recA) harbouring pEP301 or pEP3018 can grow in the absence of tryptophan, but bacteria containing pEP301 grow very slowly. These results suggest that the expression of trpA in these plasmids differs significantly.

The specific activity of the trpA product (TSase A) in extracts of bacteria containing these plasmids is remarkably different (Table 1). Since the specific activity of β-lactamase, which is correlated with the copy number of the plasmids (25), varies less than two times, these results indicate that the expression of trpA in these plasmids differs considerably. The amount of TSase A in bacteria containing another derivative of pEP301 - the plasmid pEP3017 - is very low. In comparison with a plasmid, in which trpA is controlled by the trp promotor (pEP121), trpA expression for pEP3018 is approximately two times and for pEP301 approximately 50 times lower (Table 1). The level of expression for pEP3017 is at least

Table 1 The activities of TSase A and β-lactamase in bacteria containing plasmid DNA.

plasmid	TSase A (units/mg protein)	β-lactamase (units/mg protein)	TSase A / β-lactamase
pEP301	3	5.8	0.5
pEP3018	83	4.6	18
pEP3017	<0.11	n.d.	n.d.
pEP121	150	7.9	19

Plasmid containing bacteria (W3110EA^{del2}) were grown in M9 medium, containing ampicillin (20 µg/µl) in the presence of 2 µg/ml tryptophan. The TSase A and β-lactamase activities in the extracts were determined as described in Methods and Materials and the ratio of these activities is given as units TSase A per unit β-lactamase (n.d. = not determined).

1000 fold lower and probably not significant.

To resolve the question whether these differences are due to differences in the efficiency of transcription or translation, we have measured the amount of trp- mRNA in bacteria containing pEP301 or pEP3018. The results (Table 2) show that the amount of trp-mRNA synthesized on pEP3018 is 15-

Table 2 The amount of trpmRNA in bacteria containing plasmid DNA.

plasmid	trpmRNA
pEP301	0.15%
pEP3018	1.23%

Plasmid containing bacteria (W3110EA^{del2}) were grown in M9 medium in the presence of 20 µg/ml ampicillin and 2 µg/ml tryptophan. The procedures for labeling and hybridization are as described in Methods and Materials.

times higher than that made on pEP301. Most probably therefore, the differences of the amount of TSase A reflect differences in the transcription. The three plasmids, pEP301, pEP3017 and pEP3018, contain the same part of the tet promotor, i.e. the -35 region, but have different sequences downstream of this region, which replace the -10 region of the tet promotor. Therefore, the differences in expression of the trpA gene can be explained by assuming that these plasmids contain reconstituted tet promotors from where transcription of trpA is initiated with different efficiency.

To substantiate this view we have isolated an EcoRI-HpaI fragment containing the putative promotors from pEP301 and pEP3018, inserted it before trpE and measured the production of trpE protein (ASase). Our results (Table 3) show that the presence of the promotor region of either pEP301 or pEP3018 gives rise to the synthesis of the trpE gene protein, when inserted before trpE. These results suggest that the DNA fragments contain a nucleotide sequence from where transcription is initiated. The reconstituted promotors direct the same expression, irrespective of whether they are present before trpE or trpA. Plasmid pEP306 containing the reconstituted tet promotor from pEP301 synthesizes approximately 50 times less trpE protein than a plasmid with the genuine trp promotor. The amount of trpE protein made under control of the reconstituted tet promo-

Table 3 The activities of ASase in bacteria containing plasmid DNA.

plasmid	ASase (units/mg protein)
pEP306	0.06
pEP308	1.3
pEP166	2.8

Plasmid containing bacteria (trpE recA) were grown in M9 medium, containing 2 µg/ml tryptophan. The ASase activities in the extracts were determined as described in Methods and Materials.

tor on pEP3018 (pEP308) is only two-fold lower as compared to the amount made under control of the trp promotor (pEP166).

Sequence of the reconstituted tet promotor

For the three plasmids pEP301, pEP3017 and pEP3018 the nucleotide sequence of the region around the fusion of the tet promotor region and trpB is given in Fig. 2. These sequences can be aligned with respect to the -35 region of the tet promotor such that the sequence around the -10 region can be compared. For two of the three promotors studied, the sequences at -10 resembles the concensus sequence TATAATG (3, 4, 5). The promotors of pEP301 and pEP3018, which show significant activity in vivo, both contain, besides the essential T (2) at the sixth position, two residues of the concensus sequence. The reconstituted promotor in pEP3017 which does not show activity in vivo, contains two basepairs of the Pribnow sequence but lacks the essential T residue.

	TTGACA		TATAATG	Plasmid
EcoRI	-35	ClaI	-10	
GAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTTTGTCAGTGCGCA				pEP301
GAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTAGCTTTTGTAGTG				pEP3018
GAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTGGAACCTTTCGG				pEP3017
GAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTTAATGCGGTAG				pBR322

Fig. 2. Promotor sequences of the reconstituted tet promotor
The antisense strand for the promotors of pEP301, pEP3018, pEP3017 and pBR322 is shown. The sequences are aligned with respect to the invariable sequence i.e. the -35 sequence (TTGACA). In this way the sequences at -10 can be compared with the Pribnow sequence (TATAATG). Homologies in the -35 region and in the -10 region are underlined. Large capital letters indicate highly conserved nucleotides; small capital letters indicate less conserved nucleotides.

Complex formation in vitro between RNA polymerase and promotor

To verify whether the expression of trpA in pEP301 and pEP3018 is due to transcription initiated at the reconstituted promotors we have measured the in vitro interaction of RNA polymerase with this region, by determining the protection by RNA polymerase of a restriction site (ClaI) present in this region.

Plasmid pEP301 and pEP3018 contain two additional ClaI sites; one in the trpA gene at a distance of 1.3 kb from the tet promotor and another one

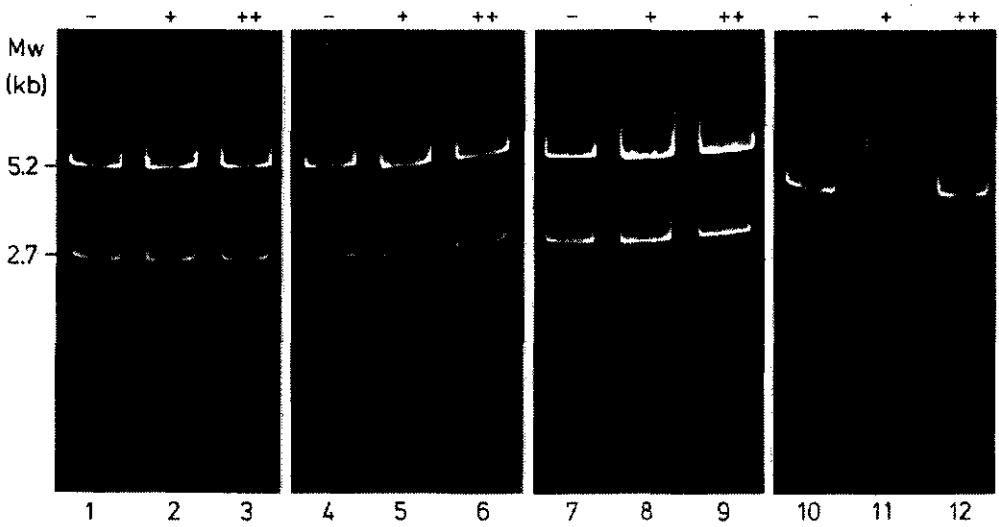

Fig. 3. Protection of the ClaI site by RNA polymerase

The protection of the ClaI site by RNA polymerase was measured as described in Methods and Materials. Formation of an RNA polymerase DNA complex was for 3 min at 37°C. The protection of the ClaI site in the promotor yields a 4.0 kb fragment for pEP301 and pEP3018, a 2.9 kb fragment for pEP3017 and a circular DNA for pBR322. Fragment sizes are indicated in number of basepairs and the circular DNA is indicated by C.

An example of a scanning pattern of such a protection experiment of the ClaI site by RNA polymerase is shown in Fig. 4. The DNA of the plasmids pEP301 (lanes 1—3), pEP3018 (lanes 4—6), pEP3017 (lanes 7—9) and pBR322 (lanes 10——12) was incubated without RNA polymerase (-), with RNA polymerase (+), and with RNA polymerase and dXTP (++) in the incubation mixture before digestion with ClaI.

at a distance of 5.2 kb, downstream of the trpA gene (Fig. 1). Digestion of pEP301 or pEP3018 with ClaI yields three fragments of 5.2, 2.7, and 1.25 kb. The deletion of the HindIII-HpaI fragment in pEP3017 does not change the number of ClaI sites for this plasmid but the 1.25 kb fragment is shortened to 0.2. Protection of the ClaI site in the promotor by RNA polymerase is expected to yield a 4.0 kb fragment for pEP301 and pEP3018 and a 2.9 kb fragment for pEP3017. For comparison we have also measured the protection of the ClaI site in the original tet promotor on pBR322 (13). Fig. 3 shows the results of an experiment in which plasmid DNA was incubated with RNA polymerase at a molar ratio of 20:1, prior to digestion with ClaI. It can be seen that the ClaI site in the promotor region is partially protected by RNA polymerase. This holds for the three

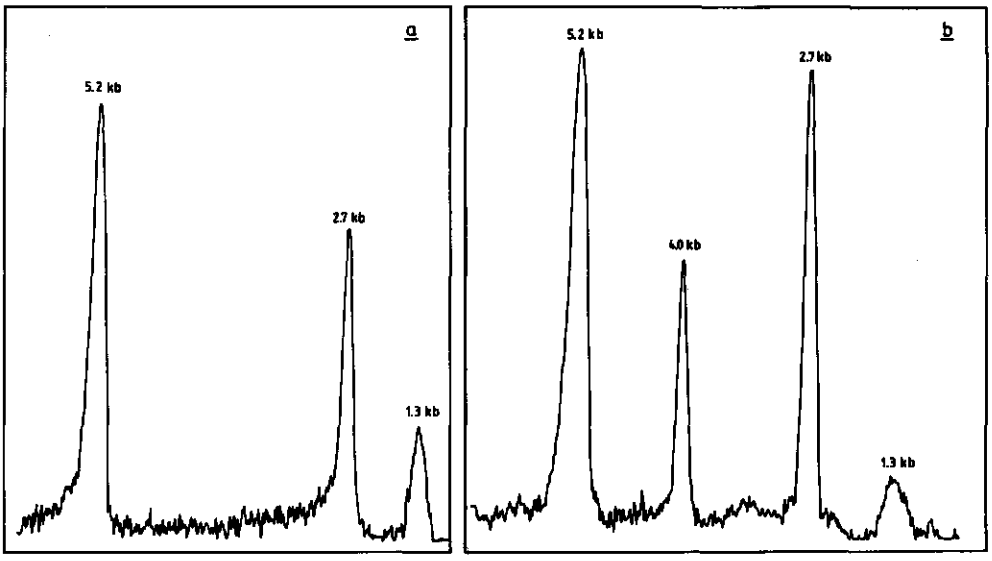

Fig. 4. Scanning pattern of a gel

Scanning pattern of the densities of the fragments of pEP3018 obtained by digestion with ClaI after incubation without (a) or with (b) RNA polymerase. The fragments were separated by gelelectrophoresis, stained with ethidiumbromide and photographed. The density of the bands was measured with a Steinhill micro densitometer. In the presence of RNA polymerase the scanning pattern shows one extra band, representing the uncleaved fragment of 4.0 kb.

plasmids pEP301, pEP3018 and pBR322 (lanes 2,5, and 11), but not for pEP3017 (lane 8). Fig. 5 shows the time course of the formation of a DNA-RNA polymerase complex. After 1-3 min the complex formation reaches its maximum value of 50-60% for pBR322, 30% for pEP3018 and 18% for pEP301.

Protection by RNA polymerase of the ClaI site in the promotor region is specific as evidenced by the inability of RNA polymerase to protect the other ClaI sites on these plasmids. Under conditions that RNA synthesis can initiate - by addition of a mixture of the 4 ribonucleoside triphosphates, after the formation of the DNA enzyme complex - the protection of the ClaI site was not observed (Fig. 3, lane 3, 6 and 9). Evidently the region at which RNA polymerase is bound on the plasmids pEP301 and pEP3018 functions as a site for initiation of RNA synthesis.

We have also determined protection of the EcoRI site, located 25 bp upstream of the ClaI site. The EcoRI site of pEP301 and pEP3018 is partial-

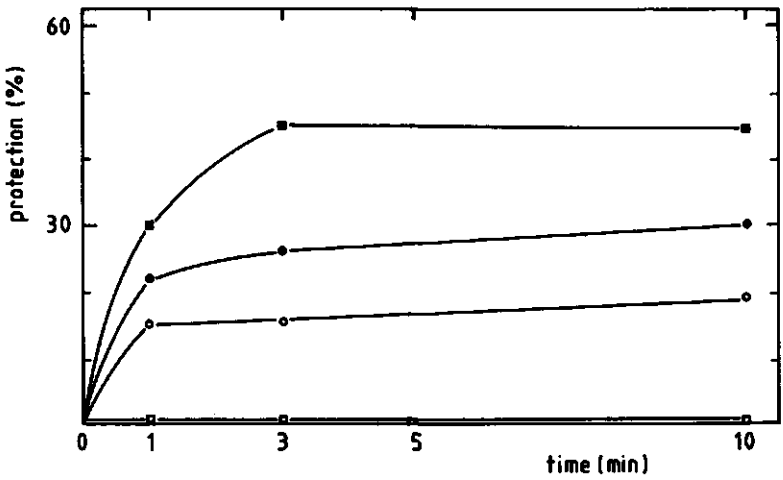

Fig.5. Time course of the protection of the ClaI site by RNA polymerase The protection of the ClaI site is plotted as a function of the time of incubation of plasmid DNA and RNA polymerase. Protection of the ClaI site by RNA polymerase is as described in Methods and Materials and in the Legend to Fig. 3.

pEP301 (O); pEP3018 (●); pEP3017 (□); pBR322 (■).

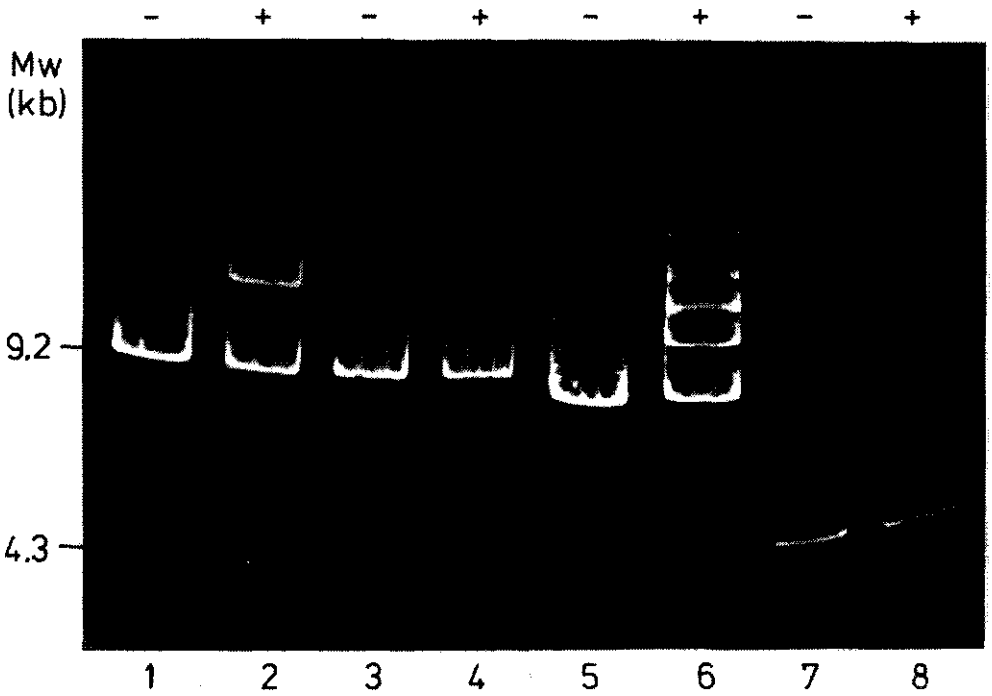

Fig. 6. Protection of the EcoRI site by RNA polymerase
Protection of the EcoRI site by RNA polymerase was measured as described in Methods and Materials. Formation of an RNA polymerase-DNA complex was for 3 min at 37°C. Protection of the EcoRI site yields a circular DNA, indicated by a C. Fragment sizes are indicated in number of basepairs. The DNA of plasmids pEP301 (lanes 1, 2), pEP3018 (lanes 3, 4), pEP3017 (lanes 5, 6) and pBR322 (lanes 7, 8) was incubated without (-) or with (+) RNA polymerase prior to digestion with EcoRI.

ly protected by RNA polymerase (Fig. 6, lanes 2 and 4) However, opposite to the results with ClaI, RNA polymerase efficiently protects the EcoRI site in pEP3017 (Fig. 6, lane 6), but it doesn't protect this site in pBR322 (Fig. 6, lane 8).

The results presented so far might be explained by assuming that protection of the ClaI and EcoRI sites can occur independently and represent different stages of the initiation process. To resolve this question we have determined complex formation between RNA polymerase and DNA - by measuring the protection of the EcoRI site - under conditions that formation of an open complex does not take place. Our results show that at 14°C RNA polymerase partially protects the EcoRI site of all four plas-

mids. Under these conditions no protection of the ClaI site was found, except for the ClaI site of pBR322 which was partially protected (results not shown).

DISCUSSION

Promotors contain two conserved regions, one at -10 and the other at -35, which determine the activity of the promotor. The contribution of each of these regions for promotor activity has been studied by substitution of basepairs or by replacement of one of the regions by other sequences (26-31).

We have taken advantage of the presence of a HindIII site in the -10 region of the tet promotor (14) to reconstitute promotors consisting of the -35 region of the tet promotor and sequences derived from the trpB gene. The effect of the -10 region on the efficiency of the promotor was determined in vivo by measuring the expression of a downstream gene, trpA or trpE, and in vitro by measuring the formation of a transcription initiation complex.

The differences in expression of the trpA gene for pEP301 and its derivatives may be explained by assuming that transcription is started at a common promotor before the EcoRI site, but is modulated differently in the two plasmids by a transcription attenuator, located at or around the HindIII site. This is not the case since the EcoRI-HpaI fragment also acts as a promotor when placed before the trpE gene. In these plasmids (pEP306 and pEP308) the DNA sequence before the EcoRI site clearly is different from that of pEP301 or one of its derivatives. Besides one would also expect, if the sequence around the HindIII site contained an attenuator, that the deletion of the sequence between the HindIII and the HpaI site (e.g.pEP3017) would result in an increase of the expression of the trpA gene. This is not the case; therefore it can be excluded that the difference in expression of the trpA gene on pEP301 and its derivatives is caused by a change in termination at a region between a common promotor, located before the EcoRI site, and the gene.

The differences of the levels of expression of the trpA (Table 1) and the trpE (Table 2) gene in the plasmids studied, can be explained by assuming that different promotors in front of the gene were formed. By recombina-

tion of the -35 region of the original tet promotor with foreign DNA sequences, promotor like structures were formed with different -10 region The importance of this structure for trpA expression is supported by the presence of a Pribnow box in the active promotors of pEP301 and pEP3018 and the absence of such a sequence in the virtually inactive promotor of pEP3017 (Fig.2).

Analysis of the sequences of 54 promotors has revealed one invariable T residue located at the sixth position of the sequence at the -10 region and a strong preference for a T and an A residue at position 1 and 2, respectively. The other three residues (position 3, 4 and 5) are also conserved but less stringently (2, 8). Besides, chemical protection studies of four different promotors point out the A residue at position 2 of the -10 region as the site for direct contact with the enzyme. The -10 region of pEP 3018, the plasmid with the most active promotor in vivo, contains 3 preferred bases. The two highly conserved bases at position 1 and 2, respectively and the invariable T at position 6. The -10 region of pEP301, the plasmid with a less active promotor in vivo, also contains the essential T at position 6 but has in addition only the highly conserved T residue at position 1. The -10 region of the plasmid pEP3017 with the inactive promotor shows very little resemblance with the consensus structure. Most importantly it lacks the essential T residue at position 6.

Current models of the transcription initiation process involve the formation of a closed complex followed by the "isomerization" (9) of this complex to an open or initiation complex (10, 11). The isomerization reaction which is thought to be the rate limiting step in the initiation process (9), is dependent on the structure of the -10 region (10, 11). Chemical protection studies have shown that the -10 region and the adjacent -16 region make direct contact with RNA polymerase, if present in an open complex (8).

In this study we have determined the formation of promotor-RNA polymerase complexes by measuring the protection of the ClaI site by RNA polymerase. These complexes represent open complexes since they are able to initiate RNA synthesis (Fig. 3). The correlation we find between the levels of protection of the ClaI site, located at -16 to -22, and the in vivo activity of the different promotors supports the conclusion that the struc-

ture at -10 is an important parameter for the formation of an open initiation complex. Oppenheim and Yanofsky (31) using a comparable approach to assess the importance of the structure at -10 for trp promotor function, have reached the same conclusion.

The functional importance of the -35 region for promotor activity is based upon sequence homology amongst many promotors (7) and upon the observation that mutations in this region affect promotor activity (2). It has been suggested that the -35 region serves to form a recognition or binding complex of enzyme and promotor (5), as an intermediate in the formation of an initiation complex (10). The necessity for the presence of a -35 region for the formation of an initiation complex has been disputed by others (26, 28, 30). Strong support for the involvement of the -35 region in the initial binding of the enzyme is provided by experiments showing that RNA polymerase makes direct contact with the -35 region (8). The protection, we find, of the EcoRI site - at -41 - may be the result of RNA polymerase proximity when the enzyme is in an open complex. Alternatively the protection may signal direct contact of the enzyme with this region, prior to the unwinding of the DNA. Our finding that at 37°C RNA polymerase protects the ClaI site and not the EcoRI site in plasmid pBR322, indicates that an RNA polymerase molecule in an open complex can not protect the EcoRI site. This result, together with the finding that the RNA polymerase protects the EcoRI site but not the ClaI site in pEP3017, supports the hypothesis that the protection of the EcoRI site is due to the formation of a stable complex at the -35 region. Rodriguez and coworkers (28) have studied also the interaction by RNA polymerase of mutant tet promotors. Their results show that RNA polymerase, present in an open complex protects the EcoRI site although less efficiently than a restriction site (HindIII) in the -10 region. The different conditions for complex formation (our conditions at pH7.0 versus their conditions at pH7.9) may explain the discrepancy between their result and ours since we find that protection of the EcoRI site on pBR322 occurs when the open complex is formed at pH7.9 but not when the complex is formed at pH7.0 (unpublished observation).

Our results suggest that transcription initiation at the tet promotor and also at the reconstituted promotors, described in this study, involves the formation of a stable complex of RNA polymerase and DNA preceding the formation of the open complex. This complex may be the closed complex.

LITERATURE

1. Gilbert, W. (1976) in RNA polymerase (eds. Losick, R. and Chamberlin M.) p. 193, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.
2. Rosenberg, M. and Court, D.C. (1979) Annu. Rev. Genet 13, 317.
3. Pribnow, D. (1975[a]) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 784.
4. Pribnow, D. (1975[b]) J. Mol. Biol. 99, 419.
5. Schaller, H. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 737.
6. Takanami, M. et al., (1976) Nature 260, 297.
7. Seeburg, P. (1977) Eur. J. Biochem. 74, 107.
8. Siebenlist, U. et al., (1980) Cell 20, 269.
9. Mc Clure, M.R. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5634.
10. Chamberlin, M.J. (1974) Annu. Rev. Biochem. 43, 721.
11. Chamberlin, M.J. (1976) in RNA polymerase (eds. Losick, R. and Chamberlin, M.) p. 159, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.
12. Bolivar, F. et al., (1977[a]) Gene 2, 75.
13. Bolivar, F. et al., (1977[b]) Gene 2, 95.
14. Tait, R.C. et al., (1977) Molec. gen. Genet 151, 327.
15. Enger-Valk, B.E. et al., (1981) see chapter 2.
16. Enger-Valk, B.E. et al., (1981) see chapter 3.
17. Burgess, R.R. and Jendrisak, J.J. (1975) Biochem. 14, 4634.
18. Pouwels, P.H. and Rotterdam, J. van (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 786.
19. Pannekoek, H. et al., (1975) Molec. gen. Genet 136, 199.
20. Smith, O. and Yanofsky, C. (1962) in Methods in Enzymology (eds. Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.) vol. 5, p. 801, New York and London: Academic Press.
21. O'Callaghan, C.H. et al., (1972) Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1, 283.
22. Lowry, O.H. et al., (1951) J. Biol. Chem. 193, 265.
23. Ito, J. and Yanofsky, C. (1966) J. Biol. Chem. 241, 4112.
24. Enger-Valk, B.E. et al., (1980) Gene 9, 69.
25. Nordström, K. et al., (1972) J. Bacteriol. 110, 562.
26. Okamoto, T. et al., (1977) Nucl. Acid Research 4, 2213.
27. Maquat, L. and Reznikoff, W.J. (1978) J. Mol. Biol. 125, 467.
28. Rodriguez, R.L. et al., (1979) Nucl. Acid Research 6, 3267.
29. Hofer, B. and Köster, H. (1980) Nucl. Acid Research 8,

30. Stefano, J.E. (1980) Nucl. Acid Research 8, 2709.

31. Oppenheim, D.S. and Yanofsky, C. (1980) J. Mol. Biol. 144, 143.

32. Hinkle, D. and Chamberlin, M. (1972) J. Mol. Biol. 70, 157.

CHAPTER 5

Summary and discussion

In this chapter we restrict ourself to a discussion of the plasmids which have properties comparable to those described in this thesis.

Plasmid vectors are of great importance for the recombinant DNA technique since they are the tools for the recombination process and the transformation of the bacterial cells. Plasmid DNA can be joined in vitro with DNA fragments from any source to make hybrid molecules. Such recombinant DNA molecules then can be introduced into bacterial cells where they can be propagated to yield large amounts of DNA. In the past few years many vector systems, suitable for the cloning of DNA fragments, have been described (1-7).

Since a cloned gene in some cases is expressed also in bacteria, it is clear that the recombinant DNA technique potentially is of great value for the large scale production of certain compounds e.g. proteins. The production of such compounds on laboratory - or even industrial scale depends on the efficient expression of cloned DNA's in suitable host micro-organisms, such as E.coli. However, many factors may influence the expression of a gene and it is clear that the availability of different systems can be of great value for the synthesis of certain products. It is possible that in one system the expression of a certain gene will be more efficient than in another system. On the basis of these considerations it appeared desirable to construct cloning vectors that would not only serve to propagate an inserted DNA fragment, but which also would allow the expression of genes to be controlled by an efficient promotor. Such expression plasmids should have a strong promotor which can be regulated.

From studies with the tryptophan (trp) operon (14, 15) it became evident that this operon might be highly suitable for such vectors, because of its strong promotor.In addition the trp operon is easily regulated and this property makes it particularly suited for the controlled expression of inserted genes. For example bacteria containing trp plasmids synthesize low levels of trp gene products when grown in medium supplemented with tryptophan. On the other hand, high levels of expression of the same genes are found when the bacteria are cultivated in medium lacking tryptophan or in medium supplemented with an inducer of the operon such as

3β-indole-acrylic acid (16).
Therefore plasmids with two or more genes of the trp operon of E.coli as a selective marker and several unique restriction sites were constructed (Chapter 1). The plasmids can be used to clone genes in one of the restriction sites in the operon. In this way expression of such genes can be controlled by the trp-regulatory region. Together with the trp plasmids described by others (12, 13) a number of plasmids is available in which genes can be expressed under control of the trp regulatory region. Other expression plasmids carry the promotor of the lac operon (17) or the leftward promotor of bacteriophage λ (p_1^{λ}; 18). A plasmid with a mutated lac promotor (lac UV5;17) has been used succesfully to produce substantial amounts of human growth hormone (19). Due to a mutation, the lac UV5 promotor is more efficient than the wildtype lac promotor, although the mutant lac promotor is much less sensitive to the catabolite activating protein (20). Under derepressed conditions the lac UV5 promotor is less efficient than the trp promotor. This can be concluded from the finding that the trp vectors synthesize more trpE protein than the lac vectors produce lacZ protein (12).
Another difference between the trp promotor and the lac promotor is the difference in the level of expression under conditions of maximal repression of the operons.Trp plasmids make, under such conditions, only small amounts of the trp gene products (12, 2), whereas the lac plasmids still synthesize quite large amounts of gene product (21, 22). This difference may be important in cases that the cloned gene product, if it is present in high concentrations, is lethal to the cell (23, 24). In such cases, i. e. if a low expression of a certain gene product is desired, the use of the trp plasmids appears to be convenient. If, for some reason, plasmids with the lac promotor still are to be prefered, it will be necessary to use a bacterial strain which overproduces the lac repressor (22). Another well investigated promotor which is used in vectors for the expression of inserted DNA is the leftward promotor region of phage λ (p_1^{λ}) (18).
Transcription, originated from p_1^{λ}, is in this case controlled by a thermosensitive repressor protein. Therefore transcription can be induced by raising the temperature such that the repressor can not affect the initiation at p_1^{λ}. This provides a very convenient way to modulate the level of expression and may be useful in case the product of the in-

serted DNA is deleterious to the cell. The amount of one gene product controlled by this promotor, if induced, amounts 6-7% of the soluble cell proteins. When the trp promotor is fully induced, e.g. by 3β-indole-acrylic acid, the trpE protein constitutes approximately 30% of the soluble proteins (12). This suggests that the p_1^λ promotor is less efficiënt compared to the trp promotor, although it is difficult to compare the strength of the two promotors. Expression, originated from the p_1^λ promotors seems to be dependent on the distance between the promotor and the gene (18), while the expression originated from the trp promotor is independent on the distance.

For the expression of genetic material regulatory elements play a central role. Therefore a thorough knowledge of the structure and function of regulatory elements is required. The recombinant DNA technique provides ample opportunity to study the function of regulatory elements by inserting them before a gene, of which the expression can be determined easily. For this purpose we have constructed plasmids for the cloning of regulatory elements (Chapters 2 and 3).

As shown in chapter 2, plasmids with the trpA gene, but without a promotor, can be used succesfully to clone promotors. One of the reasons for choosing the trpA gene as a selective marker for these vectors, was the availability of a simple quantitative assay for the trpA gene product. The plasmids were constructed in such a way that the amount of trpA product reflects the initiation, at the regulatory region inserted before trpA. The presence of another gene on the plasmid, the amp gene, coding for β-lactamase, provides the opportunity to determine the activity of a plasmid coded enzyme, not controlled by the inserted promotor. Since the β-lactamase activity is proportional to the copy number, the ratio of the amount of trpA gene product and β-lactamase yields a measure of the efficiency of expression of trpA, independently of the copy number of the plasmid. Therefore the plasmids can be used to measure the strength of a promotor.

For the cloning of promotor containing DNA fragments, plasmids with other selective markers such as the gene for β-galactosidase (lacZ), the gene

for galactokinase (galK) and the tetracycline resistance (tet) gene have been constructed (8, 9, 27-30).The lac plasmids contain the lacZ gene without a promotor and by insertion of a promotor before this gene the expression of the lacZ gene can be switched on (8, 9). This can be monitored easily by a change of the color of the bacterial colonies, if plated on the appropriate indicator plates.

Rosenberg and coworkers (27) have described a system which is comparable to ours. The difference between their plasmids and ours is that they have used the galK gene in place of the trpA gene. The presence of a promotor before the galK gene can be detected, like for the lacZ plasmid system, by a change in the colour of the bacterial strain, if plated on the appropriate indicator plates. The system appears to be suitable to distinguish weak and strong promotors by comparing the difference in colour of the bacterial colonies. However in that case, i.e. to compare weak and strong promotors, other bacterial strains are necessary, and this makes the system rather complex.

All systems described so far, i.e. the trpA, the lacZ and the galK vectors, have the disadvantage that the low expression of the selective marker may, in some cases, give problems in the cloning of very weak promotors. The possibility to detect such weak promotors in that case will be dependent on the presence of different cloning sites before the selective marker, such that only by insertion of a fragment , containing the weak promotor, the plasmid can be formed.

A variety of vectors, which can be used for the cloning of promotors before the tet gene has been constructed at different laboratories (28, 29, 30). In these cases the level of tetracycline resistance is used as a measure for the strength of the cloned promotor. However correlations between tetracycline resistance levels and promotor efficiencies must be viewed cautiously. For the cloning of very active promotors the tet gene does not appear particularly suitable, since a high level of tet gene expression results in the death of the cell. For example bacteria, which are resistant to a high concentration of tetracycline (90 µg/ml), due to a certain level of expression of the tet gene, die when the tet gene expression is further increased (12). The presence of some promotors before the tet gene results in an alteration of the copy number of the plasmid. In such a case a comparison of the level of tetracycline resistance be-

tween different promotors is not a reflection of the efficiency of the cloned promotors (12, 30). In addition, it was shown for a copy mutant derivative of pBR322 that the increase of the level of tetracycline resistance was less than expected from the increase in copy number (31).
Plasmids for the cloning of promotor containing DNA fragments, such as the trp plasmids described in Chapter 2 may also be used to study promotor mutations, as was shown in Chapter 4. By in vitro recombination techniques an essential promotor region, the -35 region, was coupled to different sequences such that reconstituted promotors, yielding different levels of expression of trpA, were formed. The in vivo level of expression from these reconstituted promotors could be correlated with the in vitro interaction of RNA polymerase with these promotors. Our results suggest that the -35 region of the tet promotor is sufficient for the formation of an intermediate, stable complex between promotor and RNA polymerase, whereas the formation of the initiation complex is determined by the structure of the -10 region.
In chapter 3 the construction of plasmids for the cloning of transcription termination signals was described. The plasmids contain the trpE gene and the tet gene, both under control of the trp promotor. The distinction between tetracycline sensitive and resistant bacteria forms the basis for the selection of transcription termination signals. Fragments, containing termination signals, can be inserted at a restriction site before the tet structural gene and after the trpE gene. This has the advantage that expression originating from the trp promotor, is assured if one selects for $TrpE^+$. Besides the efficiency of expression from the trp promotor can be determined quantitatively by assaying the amount of trpE gene product synthesized. By relating the trpE expression to the tetracycline resistance a quantitative effect of the terminator sequence on tet expression can be obtained.
A comparable system in which the tet gene has been brought under control of the promotor of the galactose operon has been described (32).A restriction site between the gal promotor and the tet gene offers the possibility to insert termination signals before the tet gene (32). The presence of the nut_R site, next to the gal promotor offers the additional

advantage that the effect of the N protein on transcription antitermination at a cloned terminator can be measured by assaying the tetracycline resistance of the bacteria.

The galK vector (27) can also be used for the cloning of transcription termination signals by using one of the vectors with a promotor before this gene. Together with the bacterial strain ($galE^+T^-K^-$), terminator containing plasmids can be detected easily since expression of the plasmid galK gene is lethal to the cell. Such a positive selection can be very handy if the parental plasmid, i.e. the plasmid without the terminator, can be formed too. In our system there is no positive selection for the terminator containing plasmids. If necessary, i.e. if it is to be expected that detection of the tetracycline sensitive cells may give problems, the bacteria may be grown in the presence of tetracyclin and d-cycloserine (33). Under such conditions the growing (Tet^R) cells, i.e. the bacteria containing the plasmids without the terminator, will be killed, whereas the tetracycline sensitive cells will survive.

Casadaban and Cohen have described a vector system in which the lacZ gene is fused to the promotor of the arabinose (ara) operon (8). This plasmid can be used to clone terminator containing fragments between the ara promotor and the lacZ gene. Insertion of a terminator between the promotor and the lac Z gene results in a Lac^- phenotype. Since the ara promotor can be switched off, the plasmids can be used also for the cloning of promotor containing fragments. These fragments can be detected by selection for a Lac^+ phenotype under conditions that the ara promotor is switched off.

All systems developped for the cloning of transcription terminators share the property that they contain a gene that can be shut off by insertion of a terminator containing DNA fragment between the promotor and the gene. Contrary to other systems, the plasmids described in this thesis also allow to distinguish between shut off as a consequence of the presence of a terminator or as a result of polarity (34, 35). Shut off, as the consequence of polarity, can occur if, in the absence of translation, RNA polymerase recognizes a pseudo terminator. Our series of plasmids offer the possibility to insert the same DNA fragment at different distances from the translation startpoint, such that the DNA sequence can be translated in the three different reading frames. If the tet gene is shut

off, irrespective of the reading frame, it means that the inserted fragment contains a terminator. However, if the tet gene is shut off in only one (or two) of the reading frames, the fragment contains a pseudo terminator. We have used this approach to demonstrate the presence of a pseudo terminator in the trpB gene.

In conclusion it can be said that the trp plasmids may form a valuable contribution to the series of already available plasmids. It is clear that a wide variety of plasmid vectors, useful for expression of a gene or for the cloning of regulatory elements, has been constructed and that new ones with novel properties will become available in the future. The type and the purpose of the experiment largely will determine the choice of the vector system.

LITERATURE

1. Helinski, D.R. and Clewell, D.B. (1972) Annu. Rev. Biochem. 40,
2. Hershfield, V. et al., (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 899, 3455.
3. Bolivar, F. et al., (1977[b]) Gene 2, 95.
4. Bolivar, F. et al., (1977[a]) Gene 2, 75.
5. Bolivar, F. (1978) Gene 4, 121.
6. Chang, A.C.Y. and Cohen, S.N. (1978) J. of Bact. 34, 1141.
7. Soberon, X. et al., (1980) Gene 9, 287.
8. Casadaban, M.J. and Cohen, S.N. (1980) J. Mol. Biol. 138, 179.
9. Casadaban, M.J. et al., (1980) J. of Bact. 143, 971.
10. Guarente, L. (1980) Cell 20, 543.
11. Bruni, C.B. et al., (1980) J. of Bact. 142, 32.
12. Hallewell, R.A. and Emtage, S. (1980) Gene 9, 27.
13. Tacon, W. (1980) Molec. gen. Genet 177, 427.
14. Platt, T. (1978) in The Operon (eds. Beckwith, J.H. and Reznikoff, W.S.) p. 263, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.
15. Umbarger, H.E. (1978) Annu. Rev. Biochem. 47, 533.
16. Morse, D.E. et al., (1969) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 725.
17. Backman, K. and Ptashne, M. (1978) Cell 13, 65.
18. Bernard, H. et al., (1979) Gene 5, 59.
19. Itakura, K. et al., (1977) Science 198, 1056.
20. Maquat, L. and Reznikoff, W.J. (1978) J. Mol. Biol. 125, 467.
21. Gelfland, D.H. et al., (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5869.
22. O'Farrell, P.H. et al., (1978) J. of Bact. 134, 645.
23. Kelley, W.S. et al., (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5632.
24. Fiil, N.P. et al., (1979) Molec. gen. Genet 173, 39.
25. Jackson, E.N. and Yanofsky, C. (1973) J. Mol. Biol. 76, 89.
26. Bertrand, K. et al., (1975) Science 189, 22.
27. Mc Kenney, K. et al., (1981) in Gene amplification and Analysis (eds. Chirikjian, J.G. and Papas, T.S.) Elsevier-North Holland, in press.
28. An, G. and Friesen, J.D. (1979) J. of Bact. 140, 400.
29. Widera, G. et al., (1978) Molec. gen. Genet 163, 301.
30. Twigg, A.J. and Sherratt, D. (1980) Nature 283, 216.

31. West, R. et al., (1979) Gene 7, 271.

32. Crombrugghe, B. de (1979) Cell 18, 1145.

33. Bochner, B.R. et al., (1980) J. of Bact. 143, 926.

34. Franklin, N.C. and Luria, S.E. (1961) Virology 15, 229.

35. Jacob, F. and Monod, J. (1961) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 26, 193.

SAMENVATTING

Vectoren zijn van groot belang voor de rekombinant DNA techniek aangezien ze nodig zijn voor het in vitro rekombinatie proces en voor de transformatie van de bakteriecellen. Men maakt veelal gebruik van plasmiden als vektor.Vreemd DNA kan aan een plasmide gekoppeld worden, zodat er hybride molekulen ontstaan. Deze rekombinant DNA molekulen kunnen, nadat ze in de cel zijn teruggebracht, vermeerderd worden, waardoor grote hoeveelheden van het vreemde DNA geïsoleerd kunnen worden.
Wanneer men het gekloneerde genetische materiaal ook tot expressie wil brengen is het van belang de beschikking te hebben over z.g. expressie plasmiden. Deze expressie plasmiden bevatten een efficiënte promotor met daar achter één of meer restriktie-sites die gebruikt kunnen worden voor insertie van een DNA fragment. Daardoor kan de expressie van een gen, gelegen op het gekloneerde fragment, onder kontrole gebracht worden van die promotor.
De vele gegevens die beschikbaar zijn over het tryptofaan (trp) operon van E.coli maken dit operon met zijn efficiënte promotor bijzonder geschikt voor het maken van een expressie plasmide. Het trp regulatiegebied bevat een promotor, operator en leader sekwentie, zodat de expressie afkomstig van die promotor via het repressor mechanisme aan- en uitgezet kan worden. Bovendien kan de expressie afkomstig van de trp promotor nog eens extra geïnduceerd worden door stoffen zoals 3β-indool-acrylzuur. Om die reden hebben wij een aantal plasmiden gemaakt met twee of meerdere genen van het trp operon als selektie kenmerk (Hoofdstuk 1). De plasmiden kunnen gebruikt worden voor het kloneren van DNA fragmenten in één van de restriktie-sites in het operon, waardoor de expressie van het gekloneerde gen onder kontrole kan komen te staan van het trp regulatiegebied.

Om inzicht te krijgen in de wijze waarop de expressie van gekloneerd DNA verbeterd kan worden is het noodzakelijk onderzoek te verrichten naar de struktuur en funktie van de regelgebieden zelf. De rekombinant DNA techniek biedt de mogelijkheid om verschillende regulatiegebieden te koppelen aan hetzelfde gen zodat deze veel eenvoudiger bestudeerd en vergeleken kunnen worden. We hebben daarom een serie plasmiden gemaakt, die gebruikt kunnen worden voor het kloneren van dit soort regulatiegebieden (Hoofdstuk 2 en 3). Ook deze plasmiden hebben een trp gen als genetisch ken-

merk.

In hoofdstuk 2 wordt de konstruktie van plasmiden beschreven die gebruikt kunnen worden voor het kloneren van promotoren voor een gen. De plasmiden bevatten het trpA gen met enkele restriktie-sites gelegen voor dit gen, zodat door insertie van een promotor in één van deze sites trpA tot expressie komt. Bakteriën (trpA recA) die zo'n plasmide hebben kunnen dan herkend worden doordat ze Trp^+ zijn. De expressie van het tweede gen, het amp gen, op het plasmide is evenredig met het aantal kopieën van dat gen en bepaling van de hoeveelheid amp genprodukt is dus een maat voor het aantal aanwezige kopieën van het plasmide. De vektoren kunnen gebruikt worden om de sterkte van gekloneerde promotoren te vergelijken, omdat de hoeveelheid van het trpA genprodukt, onafhankelijk van het kopieaantal van het plasmide, bepaald kan worden. Vergelijking van bijvoorbeeld de sterkte van de tet promotor en de trp promotor laat zien dat de expressie afkomstig van de trp promotor veel efficiënter is dan die van de tet promotor.

In hoofdstuk 4 wordt één van de trpA plasmiden gebruikt om het effekt te bestuderen van veranderingen in één van de gebieden - de -10 sekwentie - op het funktioneren van de promotor van het tetracycline resistentie gen. De invloed van verschillende -10 sekwenties op het niveau van expressie van het trpA gen kon gekorreleerd worden met de in vitro interaktie van RNA polymerase met deze promotoren. De experimenten tonen bovendien aan dat het -35 gebied van deze promotor voldoende is voor de vorming van een stabiel komplex van RNA polymerase en DNA, terwijl de vorming van een initiatiekomplex bepaald wordt door de sekwentie van het -10 gebied.

In hoofdstuk 3 wordt de konstruktie van vektoren beschreven die gebruikt kunnen worden voor het kloneren van terminatie signalen. Het karakteristieke van de gekonstrueerde plasmiden is de aanwezigheid van een restriktie-site tussen het trpE en het tet gen. Omdat beide genen onder kontrole staan van dezelfde promotor, de trp promotor, leidt de insertie van een terminator in die restriktiesite tot het uitzetten van het tet gen, terwijl de expressie van trpE niet verandert. Bakteriën die zo'n plasmide met een terminator bevatten kunnen herkend worden aan het $TrpE^+Tet^S$ fenotype. De plasmiden kunnen bovendien gebruikt worden om onderscheid te maken tussen terminatoren en polariteit. Bij polariteit stopt de RNA synthese bij een DNA sekwentie - een pseudo terminator -

midden in een gen. De plasmiden, beschreven in hoofdstuk 3, zijn gebruikt voor het identificeren en lokaliseren van zo'n pseudo terminator in het trpB gen. Deze terminator blijkt qua struktuur erg veel overeenkomst te vertonen met een terminator zoals die voorkomt aan het einde van een gen of in een leader sekwentie.

EPILOOG

Op de voorkant van dit proefschrift is weergegeven hoeveel "plezier" ik heb gehad in het werk, beschreven in de voorafgaande hoofdstukken. Voor menigéén zal de inhoud van dit proefschrift alleen maar een verzameling van cirkeltjes lijken, waar geen touw aan vast te knopen is. Ook zullen ze zich afvragen waarom je nu zo'n plezier kan hebben als je één zo'n plasmide "vangt". In de tekst staat alleen maar dat je na het verrichten van een paar handelingen het gewenste plasmide in handen hebt. In het algemeen heb je echter bij een bepaald experiment niet één, maar heel veel verschillende plasmiden. Het was dan altijd weer heel "spannend" of er nu inderdaad ook het goede plasmide bij was. Op papier kon je dan nog wel heel wat voorbereid hebben, maar in de praktijk bleek het toch heel vaak anders te gaan. Ik denk dan ook nog steeds met veel plezier terug aan al die keren dat het weer gelukt was om het goede plasmide in handen te krijgen.

Hoewel alleen mijn naam op dit proefschrift staat vermeld, zal het iedereen duidelijk zijn dat ik dit nooit alleen heb gedaan. Zowel de voorkant als de inhoud van dit proefschrift zijn alleen maar tot stand gekomen dankzij vele anderen. Graag had ik iedereen, die eraan mee gewerkt heeft, persoonlijk willen noemen, maar dat zou dan een soort "continuing story" worden. Toch wil ik van deze gelegenheid gebruik maken om enkelen, zonder wie dit proefschrift echt niet af was gekomen, te noemen.

Ab van Kammen, voor je waardevolle bijdrage en kritiek tot in de laatste uurtjes; hierdoor kon er nog heel wat verbeterd worden aan dit proefschrift. Ik sta er nog steeds versteld van dat je in zo'n korte tijd alle hoofdstukken door hebt kunnen werken.

Co van Rotterdam, niet alleen voor het uitvoeren van de experimenten, beschreven in hoofdstuk 4, maar ook voor alle gesprekken over alles wat niet met DNA te maken heeft.

Mijn kamergenoten - en dat zijn er intussen al heel wat - voor jullie steun tijdens het schrijven van dit proefschrift. In het bijzonder Marijke, want dankzij jou kon het mond- en klauwzeer werk ook zonder mij gewoon doorgaan.

Ook de andere afdelingsgenoten, niet alleen voor jullie belangstelling tijdens het schrijven van dit proefschrift, maar ook voor alle gezelligheid op de afdeling.

Henny Wilhelmi en Ria Engelen voor het altijd maar weer uittypen van alle vreemde "composities" van bladzijden. Henny voor de enorme snelheid waarmee je de laatste weken steeds maar weer de hoofdstukken van dit proefschrift verbeterd hebt.Ria voor het geduld waarmee je me de ingewikkelde typemachine uitgelegd hebt, en voor je inspanning in de laatste dagen. Dankzij jullie inspanning is alles toch nog op tijd afgekomen.

De afdeling fotografie voor het vele werk dat jullie besteed hebben aan het perfectioneren van alle figuren. Groot Bramel voor het maken van alle cirkeltjes, die altijd maar weer bij jullie de deur uit rolden.

En "last but not least" uiteraard Peter Pouwels. Optimisme en pessimisme botsten wel eens, maar dan was er altijd nog de gulden middenweg. Peter, bedankt voor je bijdrage aan mijn wetenschappelijke "vorming" en voor het eindeloze geduld waarmee je toch altijd weer probeerde mijn logika te volgen. De vele discussies met jou zijn voor mij altijd een geweldige stimulans geweest. Op jou is beslist het gezegde "na gedane arbeid is het goed rusten" van toepassing, want het spannende werk van de afgelopen jaren en het inspannende werk van de afgelopen maanden heeft je werkdag regelmatig met een fors aantal uren verlengd.

Tenslotte wil ik nog in het bijzonder noemen:

Willem, voor je steun op de achtergrond en voor het overnemen van heel wat werk waar ik in de afgelopen maanden helemaal niet meer aan toe kwam. Je had er altijd weer begrip voor als ik weer eens "even" naar het lab ging of me opsloot om te werken.

Annelies Oosterlee voor het maken van de tekening op de voorkant van dit proefschrift.

Ouders ,bedankt voor de gelegenheid die ik heb gehad om een akademische studie te volgen.

CURRICULUM VITAE

nov. 1951 -de 20e geboren op Aruba (Ned. Ant.)

mei. 1969 -eindexamen HBS-B aan het Wagenings Lyceum

sep. 1969 -inschrijving aan de Landbouwhogeschool te Wageningen

jan. 1976 -ingenieursexamen in de richting molekulaire wetenschappen (N-43)
met als vakken molekulaire genetika, biochemie, molekulaire fysika en entomologie; als praktijkadres de Universiteit van Strasbourg.

dec. 1975 -"gastarbeider" op het Medisch Biologisch Laboratorium (MBL) TNO te Rijswijk.

feb. 1976 -tot feb. 1980 in dienst van de Nederlandse Organisatie voor Zuiver Wetenschappelijk Onderzoek (ZWO) binnen de werkgemeenschap nucleïnezuren van de Stichting Scheikundig Onderzoek Nederland (SON).

mrt. 1980 -in dienst van TNO en werkzaam binnen de sektie rekombinant DNA van het MBL.

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift werd uitgevoerd van januari 1978 tot eind 1980; daarvoor werd gewerkt aan de zuivering van een antiterminatie eiwit. Het onderzoek stond onder leiding van Dr. P.H. Pouwels.