

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Klonierung, Expression und Kristallisation

3.1.1 Das Expressionssystem für den WT ω -Repressor

Als Ausgangsmaterial für die Klonierung des ω -Repressors wurde das Plasmid pTrc99A- ω von Prof. Juan C. Alonso (Madrid) zur Verfügung gestellt. Der Vektor trägt in seiner *multiple-cloning-site* (MCS) das Gen ω des Plasmids pSM19035, welches zuerst aus *Streptococcus pyogenes* isoliert wurde (siehe Kap. 1.3). Als Selektionsmarker enthält dieser Vektor das *amp* Gen, welches mit dem zugehörigen Genprodukt Ampicillinresistenz vermittelt. Die Expression des WT ω -Proteins unter Verwendung von *E. coli* BL21 und ER2566 als Wirtsstämme erzielte im Hinblick auf die bei der Reinigung und Kristallisation der ω -DNA Komplexe benötigten Mengen von mindestens 10 mg ω -Protein nur unzureichende Ausbeuten von 3-5 mg pro 8 L Zellanzucht. Um die Expression zu verbessern, wurde das ω Gen mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und BamHI aus dem Vektor pTrc99A- ω herausgeschnitten und in die mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittene *multiple cloning site* des Vektors pET28A (Novagen) ligiert (siehe Kap.2.3.6). Dieser Vektor hat den Vorteil, den sehr effizienten T7 Promotor zu tragen. Als Selektionsmarker dient eine Kanamycinresistenz. Das erhaltene Konstrukt wurde in den proteasedefizienten *E. coli* Expressionsstamm ER2566 transformiert. In beiden verwendeten Plasmiden pTrc99A- ω und pET28a- ω befindet sich die Expression der Proteine unter der Kontrolle des Lactose-Operon-Promotors, dessen lac-Repressor durch das Substratanalogon Isopropylthiogalactopyranosid (IPTG) induziert werden kann.

3.1.2 Expression und Reinigung von WT ω

3.1.2.1 Expression

Für die Expression und Reinigung von WT ω -Protein wurde von A. de la Hoz ein Expressions- und Reinigungsprotokoll aufgestellt (pers. Mitteilung). Es wurde berichtet, dass das ω -Protein in höheren Konzentrationen toxisch auf *E. coli* wirkt

(A. de la Hoz, pers. Mitteilung), daher sollte 30 min nach Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von IPTG die Bakterienanzucht mit 100 mg/L des Transkriptioninhibitors Rifampicin versetzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen zunehmenden ω -Konzentrationen und abnehmender Zellviabilität festgestellt werden. Auf die Zugabe von Rifampicin wurde daher verzichtet. Die Expression erfolgte wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben.

3.1.2.2 Reinigung

Alle Arbeiten zum Aufschluss der Bakterienzellen und zur Reinigung des ω -Proteins wurden bei 4°C durchgeführt. Das Reinigungsprotokoll umfasst den Bakterienaufschluss mit Hilfe einer French[®]Press-Druckentspannungs-Anlage (Kap. 2.4.2) und als ersten Chromatographieschritt Kationenaustausch an Phosphocellulose (Kap. 2.4.4.1). Im Anschluss wurde in einem zweiten Kationenaustausch-Chromatographieschritt an Trägermaterial gebundenes Heparin verwendet (Kap. 2.4.4.2). Abschließend wurde WT ω an Superdex75 gelfiltriert (Kap. 2.4.6). WT ω eluierte mit einer apparenten Molekularmasse von 20 kDA als Dimer. Der Reinheitsgrad des Proteins wurde mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung nach Kap. 2.2.1 überprüft und die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt (Kap. 2.5.1). Wurde das Plasmid pET28A- ω (Kap. 3.1.1) zur Proteinexpression eingesetzt, betrug die Proteinausbeute aus einer typischen 8 L Zellanzucht nach der Reinigung etwa 40 mg.

3.1.2.3 Planung und Herstellung der Deletionsmutante $\Delta 19\omega$

Die zunächst nicht erfolgreichen Kokristallisations-Experimente des WT ω -Repressors mit DNA (Kap. 3.1.5.2) veranlassten die Herstellung einer N-terminalen Deletionsmutante ($\Delta 19\omega$). Das Ergebnis einer Sekundärstruktur-Vorhersage mit dem Programm PHD (Rost und Sander, 1993) in Abb. 7 zeigt, dass die 19 N-terminalen Aminosäuren von ω einen Schlaufenbereich ausbilden, während für die Reste 20-23 eine helikale Struktur vorgeschlagen wird (vgl. detaillierte Sekundärstruktur-Vorhersage in Kapitel 3.4). Diese Vorhersage wurde mit der Beobachtung untermauert, dass röntgentaugliche Kristalle des WT ω -Repressors erst nach mehreren Monaten beobachtet wurden, nachdem im Kristallisationsansatz die 20 N-terminalen Aminosäuren proteolytisch abgespalten wurden ($\Delta 20\omega_2$) (Murayama *et al.*, 2001). Die

Spaltstelle konnte durch Bestimmung des Molekulargewichts mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert werden. Des Weiteren wurde auch für die Reste 21 und 22 keine Elektronendichte beobachtet, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass der N-Terminus des ω -Repressors tatsächlich ungeordnet vorliegt und die Abspaltung dieses Bereichs der Polypeptidkette die Kristallisationseigenschaften verbessern würde.

Ob der N-Terminus des ω -Repressors an der DNA-Bindung beteiligt ist, war zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt. Zum einen enthalten die 24 N-terminalen Aminosäuren 4 positiv geladene Lysine und ein Arginin (siehe Abb. 7), die potentielle Partner für die Bindung an das negativ geladene Phosphodiesterückgrat der DNA darstellen. Daher könnte eine Deletion aller 24 Reste mit verminderter Bindungsaffinität des ω -Repressors an Operator-DNA einhergehen. Zum anderen war nicht geklärt, ob nicht der N-Terminus im Zuge der DNA-Bindung eine Sekundärstruktur ausbildet. Auch eine Beteiligung an eventuellen Dimer-Dimer Kontakten war denkbar. Um einerseits die DNA-Bindungseigenschaften des ω -Repressors möglichst unverändert zu belassen, andererseits einen möglichst langen N-terminalen Schlaufenbereich zu entfernen, wurde als erste Aminosäure des verkürzten ω -Repressors Ala20 gewählt. Auf Ala20 folgen Lys21 und Lys22 so dass nur noch drei positiv geladene Reste im N-Terminus von $\Delta 19\omega$ verbleiben. Für die Initiation der Translation wurde zusätzlich ein Startkodon für Methionin vor Ala20 angefügt; die Deletionsmutante wird im Folgenden nur $\Delta 19\omega$ genannt statt Met19- ω (20-71).

Das verkürzte Konstrukt wurde, wie in Kap. 2.4.7 beschrieben, in Zusammenarbeit mit Aslan Cicek hergestellt. Das Konstrukt pET28A- $\Delta 19\omega$ wurde in *E. coli* BL21 transformiert und $\Delta 19\omega$ wie in Kap. 2.4.1 beschrieben produziert.

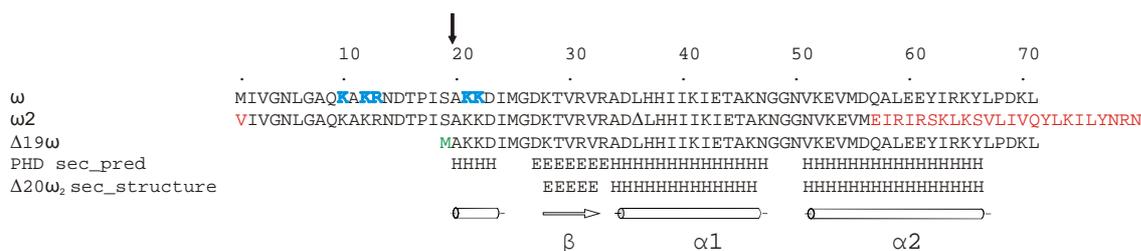


Abbildung 7 Planung der Mutante $\Delta 19\omega$

Die Aminosäuresequenzen sind aus den Nucleotidsequenzen der entsprechenden Gene abgeleitet. Während das Plasmid pSM19035 nur ω kodiert, wird sowohl ω als auch ω_2 von den Plasmiden pIP501 und pAM β 1 der *inc18* Plasmidfamilie kodiert (vgl. Kapitel 1.6.3 der Einleitung). In rot sind Aminosäuren von ω_2 angegeben, die sich von ω_1 unterscheiden. Mit einem Pfeil ist die Schnittstelle des prozessierten $\Delta 19\omega$ markiert, in grün das zusätzliche N-terminale Methionin als Artefakt der Klonierung. In blau sind positiv geladene Reste der N-terminalen Region vor der RHH-Domäne markiert. Die PHD-Sekundärstruktur-Vorhersage kennzeichnet potentielle α -Helizes mit „H“ und β -Stränge mit „E“. Für die Reste 20-23 wird eine α -Helix (H) vorgeschlagen. Daher wurde die Deletionsmutante $\Delta 19\omega$ vor der eventuell vorliegenden α -Helix gewählt. Die unter „ $\Delta 20\omega_2$ sec_structure“ angegebene Sekundärstruktur ist der Kristallstruktur von $\Delta 20\omega_2$ entnommen (PDB Eintrag 1IRQ (Murayama *et al.*, 2001)).

3.1.3 Reinigung von $\Delta 19\omega$

Das Reinigungsprotokoll von $\Delta 19\omega$ stimmt mit dem zur Reinigung von WT ω verwendeten Protokoll überein (Kap. 3.1.2.2). Als zusätzlicher Reinigungsschritt wurde eine Hitzedenaturierung durchgeführt (Kap. 2.4.3). Zwar ist das WT ω -Protein nicht thermostabil und entfaltet in Abhängigkeit von der Ionenstärke bei Temperaturen zwischen 43 und $\sim 75^\circ$ (Misselwitz *et al.*, 2001), aber $\Delta 19\omega$ ist nach Erhitzung auf 70°C und anschließender Abkühlung auf Raumtemperatur in der Lage, reversibel zum Dimer zurückzufalten. Das WT ω -Protein hingegen faltet nur zu geringen Anteilen von schätzungsweise 10% zurück, das restliche Protein verbleibt nach Zentrifugation im Pellet, wie durch SDS-PAGE nachgewiesen wurde. Mit Hilfe der Hitzedenaturierung konnten schon vor dem ersten Chromatographieschritt die meisten Proteine des heterologen Wirts abgetrennt werden.

Die weiteren Reinigungsschritte umfassten, wie in Kap. 3.1.2.2 beschrieben, eine Kationenaustausch-Chromatographie an Phosphocellulose vor der abschließenden Gelfiltration. Auf den Kationenaustausch an Heparin konnte für die Reinigung von $\Delta 19\omega$ verzichtet werden. Ausgehend von einer 8 L Bakterienanzucht konnten nach erfolgter Reinigung 45 mg an $\Delta 19\omega$ -Protein erhalten werden.

3.1.3.1 Kristallisation von $\Delta 19\omega$

Um die Eignung von $\Delta 19\omega$ für Kristallisationsexperimente nachzuweisen, wurde versucht, von $\Delta 19\omega$ unter den Bedingungen der *Crystal screens I* und *II* Kristalle zu züchten. Unter mehreren Kristallisationsbedingungen, die verschiedene Polyethylenglykole (PEG) als Fällungsmittel enthielten, konnten Kristalle beobachtet werden. Auch die von Murayama *et al.* (2001) gezüchteten Kristalle in der tetragonalen Raumgruppe $P4_12_12$ konnten mit $\Delta 19\omega$ unter ähnlichen Kristallisationsbedingungen (50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 100 mM Natriumacetat und 20% (w/v) PEG 4K) reproduziert werden. Diese Kristalle wurden an der hauseigenen Drehanode bei RT auf ihre Röntgentauglichkeit getestet und zeigten sehr gute Diffraktion bis zu einer Auflösung von 1,4 Å. Wie in Kap. 1.3 beschrieben, wurden von K. Murayama erst nach einiger Zeit Kristalle beobachtet, welche proteolytisch gespaltenes ω -Protein ($\Delta 20\omega_2$) enthielten.

3.1.3.2 Hybridisierung der DNA und Herstellung des WT ω -DNA Komplexes

Die Hybridisierung zweier zueinander komplementärer Oligodesoxyribonucleotide erfolgte wie in Kapitel 2.4.7 beschrieben, durch Aufheizen auf 85°C und anschließendes, langsames Abkühlen auf 4°C. Die erzeugte Doppelstrang-DNA (dsDNA) wurde durch Chromatographie an MonoQ von überschüssiger Einzelstrang-DNA (ssDNA) befreit (Kap. 2.4.7). Die Herstellung des ω -DNA-Komplexes erfolgte wie in Kap. 2.7 beschrieben. Da die verwendete Operator-DNA mit Ausnahme einer kurzen 22-mer Haarnadel-DNA (Tab. 6) immer mindestens zwei Bindungsstellen für zwei ω -Dimere aufwies, wurde ω -Protein gegenüber den vorhandenen Heptaden immer im leichten Überschuss eingesetzt, um eine vollständige Absättigung der Heptaden sicherzustellen. So sollten Mischformen z. B. $(\omega_2)_2$ -DNA, ω_2 -DNA und freie DNA vermieden werden, die bei der Kristallisation stören.

Tabelle 6 Zur Kokristallisation mit WT ω und $\Delta 19\omega$ verwendete Oligonucleotide und Ergebnisse der Kristallisationsexperimente.

Neben der Länge und der Gestaltung der Enden sind die Sequenzen der Oligonucleotide angegeben. Die Erkennungssequenzen (Heptaden) der ω -Dimere und ihre Orientierung zueinander sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Mit „*“ markierte Oligonucleotide wurden von K. Murayama entworfen und kokristallisiert (persönliche Mitteilung). Die obere Sequenz der jeweiligen ssDNA besitzt auf der linken Seite das 5'-Ende. Die Ergebnisse der Kokristallisations-Experimente sind angegeben und, sofern bestimmbar, auch die Raumgruppe. Die Pfeile in den Sequenzen der Haarnadel-Oligonucleotide zeigen den Verlauf der Sequenz an. IU steht für Iod-Uracil.

Länge/ Bezeichnung	Enden	5'-Sequenz-3' 3'-Komplementärstrang-5'	Protein	Kristallform	Raumgruppe
34	Haarnadel	<pre> → AATCACA TGTGATT TTT TTAGTGT AACTAA TTT </pre>	$\Delta 19\omega$	verwachsen	
18	Haarnadel	<pre> → AATCACA TT TTAGTGT TT </pre>	$\Delta 19\omega$	-	
25	TA	<pre> → G AATCACA AATCACT TATCACA AGT AC TTAGTGT TTAGTGA ATAGTGT TC </pre>	$\Delta 19\omega$	-	
23	GC	<pre> ← C AATCACT TGTGATT TGTGATT G CG TTAGTGA AACTAA AACTAA </pre>	WT ω	verwachsen	
23 23mer	blunt	<pre> ← C AATCACT TGTGATT TGTGATT G G TTAGTGA AACTAA AACTAA C </pre>	WT ω $\Delta 19\omega$	verwachsen	
22*	TT	<pre> → TATCACA AATCACT TATCACA A TAGTGT TTAGTGA ATAGTGT TT </pre>	WT ω	verwachsen	
22	blunt	<pre> → C TATCACA AATCACT TGTGATT G ATAGTGT TTAGTGA AACTAA </pre>	WT ω	verwachsen	
22	blunt	<pre> ← TAACACA AATCACT TGTGATT C ATTGTGT TTAGTGA AACTAA G </pre>	WT ω	verwachsen	
21*	blunt	<pre> → ATCACA AATCACA AATCACA A TAGTGT TTAGTGT TTAGTGT T </pre>	WT ω	verwachsen	
19 19mer	blunt	<pre> ← GCG AATCACA TGTGATT GG CGC TTAGTGT AACTAA CC </pre>	$\Delta 19\omega$	verwachsen	
18 18dirAT	AT	<pre> → G AATCACA AATCACA AGT AC TTAGTGT TTAGTGT TC </pre>	$\Delta 19\omega$	hexagonal Abb. 10	$P6_1/P6_5$
18 18invTA	TA	<pre> ← CA AATCACA AGTGATT CA TGT TTAGTGT TCACTAA G </pre>	WT ω $\Delta 19\omega$	hexagonal und orthorhombisch	$P6_1/P6_5$ und P222
18 18invTA- 3xIod-Uracil	TA	<pre> ← C A AATCACA A GTGATT CA TG (IU)TAGTG (IU) (IU)CACTAA G </pre>	$\Delta 19\omega$	hexagona	$P6_1/P6_5$
18	blunt	<pre> ← GG AATCACT TGTGATT TG CC TTAGTGT TCACTAA AC </pre>	WT ω	verwachsen	
18	TT	<pre> → G AATCACA AATCACA AGT TC TTAGTGT TTAGTGT TC </pre>	$\Delta 19\omega$	verwachsen	
18 (→←)	GC	<pre> ← G AATCACT TGTGATT TCC GC TTAGTGA AACTAA AG </pre>	$\Delta 19\omega$	Rauten Abb. 12A	$P2_1$
18 (→→)	GC	<pre> → G AATCACA AATCACA AGC GC TTAGTGT TTAGTGT TC </pre>	$\Delta 19\omega$	Rauten Abb. 12B	$C2$
18 (→→)A9T6'→G9C6'	GC	<pre> → G AATCACA AGTCACA AGC GC TTAGTGT TCAGTGT TC </pre>	$\Delta 19\omega$	Rauten	$C2$
18 (←→)	GC	<pre> ← G AGTGATT AATCACA AGC GC TCACTAA TTAGTGT TC </pre>	$\Delta 19\omega$	Nadeln, verwachsen	
17	TA	<pre> → G AATCACA AGTCACA AT AC TTAGTGT TCAGTGT T </pre>	WT ω	-	
16	CG	<pre> → TATCACA AATCACA TG C ATAGTGT TTAGTGT A </pre>	WT ω	-	
15* 15mer	TT	<pre> → ATCACA AATCACT TT T TAGAGT TTAGAGA A </pre>	WT ω	Abb. 9A	$P1?$
14*	blunt	<pre> → ATCACA AATCACA A TAGAGT TTAGAGT T </pre>	WT ω	verwachsen	

3.1.3.3 Reinigung der ω -DNA Komplexe

Bei ersten Kristallisationsexperimenten von ω -DNA-Komplexen, die vor der Kristallisation mit leichtem Überschuss an ω -Protein gemischt wurden, konnten zwar initiale Kristallisationsbedingungen erhalten werden, allerdings erwies sich die Reproduktion bereits erhaltener Kristalle als sehr schwierig. Deshalb wurden die ω -DNA-Komplexe zur zusätzlichen Reinigung einer Gelfiltration an Superdex75 Säulenmaterial unterzogen (Kap. 2.4.8), um das Hauptprodukt (ω -DNA-Komplex) von überschüssigem ω -Protein abzutrennen. Abb. 8C zeigt, dass die Verwendung von Laufpuffern mit NaCl-Konzentrationen von >200 mM den Zerfall des Komplexes während der Elution zur Folge hatte. Wurde hingegen mit zu geringen NaCl-Konzentrationen von <100 mM NaCl gearbeitet, trat Aggregation der ω -DNA-Komplexe auf und die den ω -DNA-Komplex enthaltende Fraktion eluierte mit dem Ausschlussvolumen (46 mL) der Säule (Abb. 8A). In einer Versuchsreihe wurde die Salzkonzentration ermittelt, bei der der Komplex monomodal vorlag und über die Elutionsdauer nicht zerfiel (Abb. 8B). Alle weiteren Gelfiltrations-Läufe verschiedener ω -DNA-Komplexe wurden mit einem Puffer durchgeführt, der 20 mM Tris (pH 7,5), 120 mM NaCl und 30 mM KCl enthielt. In diesem Puffer wurde die Probe auch für Kristallisationsexperimente verwendet. Die beobachtete Abhängigkeit der Modalität der Probe von der NaCl-Konzentration wurde mittels DLS bestätigt, Kap. 2.5.3. Unter Verwendung des oben genannten Puffers zeigten DLS-Messungen, dass die ω -DNA Komplexe monodispers vorliegen.

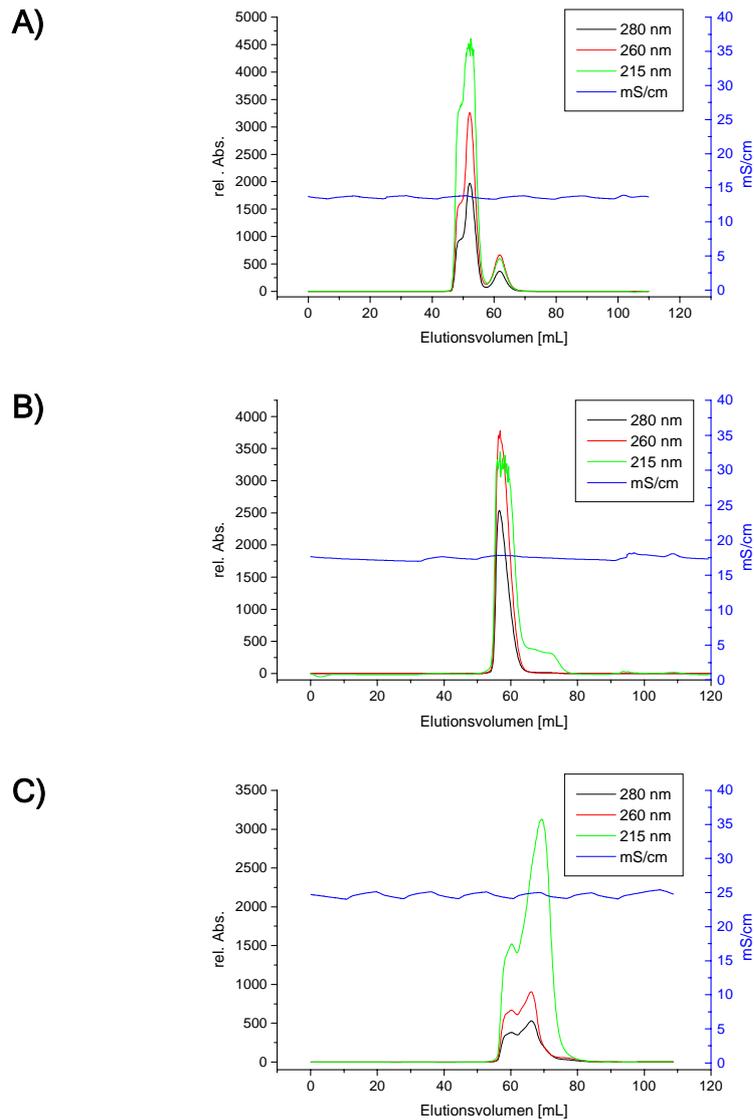


Abbildung 8 Chromatogramme für Gelfiltrationsläufe an Superdex75 16/60 von WT ω im Komplex mit 19mer DNA (Tab. 6). Der Laufpuffer enthielt 20 mM Tris/HCl (pH 7,5) und in (A) 50 mM NaCl, in (B) 130 mM NaCl und in (C) 200 mM NaCl. Das Ausschlussvolumen der Säule beträgt 46 mL. Die NaCl-Konzentration wird über die Leitfähigkeit in mS/cm (blaue Kurve) widergespiegelt. Überschuss an ω -Protein in (B) zeigt bei einem Elutionsvolumen von 70 mL gegenüber der Absorption bei 260 und 280 nm erhöhte Absorption bei 215 nm, während Überschuss an DNA in (A) durch gegenüber 215 nm erhöhte Absorption bei 260 und 280 nm bei einem Elutionsvolumen von 62 mL nachgewiesen wird.

3.1.4 Kristallisation von WT ω -DNA Komplexen

3.1.4.1 Eigenschaften der eingesetzten DNA

Die Parameter Länge und Sequenz des jeweiligen DNA-Fragments, das in den Kokristallisations- Experimenten eingesetzt wurde, stellen zusätzliche Variablen für die Optimierung der Kristallisationsbedingungen dar. Der ω -Repressor bindet als Dimer

kooperativ und mit hoher Affinität ($k_D \sim 20$ nM) an mindestens zwei aufeinander folgende Heptaden, die nicht-palindromisch, direkt ($\rightarrow\rightarrow$) oder palindromisch, invertiert ($\rightarrow\leftarrow$) wiederholt werden. Demgegenüber ist die Dissoziations-Konstante für die Bindung an ($\leftarrow\rightarrow$) mit ~ 120 nM sechsfach höher.

Die Affinität steigt mit zunehmender Zahl wiederholter Heptaden. Im Falle von drei aufeinander folgenden Heptaden in den Anordnungen ($\rightarrow\rightarrow\rightarrow$) und ($\rightarrow\rightarrow\leftarrow$) konnten Dissoziations-Konstanten von ~ 12 nM gemessen werden, bei vier wiederholten Heptaden, wie in ($\rightarrow\rightarrow\rightarrow\rightarrow$) oder ($\rightarrow\rightarrow\leftarrow\leftarrow$) organisiert, sind es 6-8 nM. Aber auch hier ist die Anordnung der Heptaden wesentlich, denn wenn die vier Heptaden wie in ($\rightarrow\rightarrow\leftarrow\rightarrow$) angeordnet sind, steigt die Dissoziations-Konstante auf 14 nM an (Tab. 13).

Die Anordnung der Heptaden trägt also wesentlich zur Stabilität des Komplexes bei, was sich insbesondere bei der Reinigung bemerkbar machte. Während $\Delta 19\omega$ im Komplex mit ($\rightarrow\rightarrow$)- und ($\rightarrow\leftarrow$)-DNA (Tab. 6) über Gelfiltration an Superdex75-Material gereinigt werden konnte, wurde ein Zerfall des Komplexes für ω gebunden an ($\leftarrow\rightarrow$)-DNA bei der Elution beobachtet, was sich in breiten und zu kleinen Molekularmassen auslaufenden Absorptionsmaxima äußerte.

Um den Zerfall von ω -DNA-Komplexen unter möglichst vielen Kristallisationsbedingungen zu vermeiden, wurden daher nur die Anordnungen ($\rightarrow\rightarrow$), ($\rightarrow\leftarrow$), ($\rightarrow\rightarrow\rightarrow$) und ($\rightarrow\rightarrow\leftarrow$) für Kokristallisations-Experimente gewählt. Die kürzesten eingesetzten DNA-Fragmente enthielten zwei aufeinander folgende Heptaden mit insgesamt 14-bp, über diese minimalen Operatoren hinaus wurden Überhänge entworfen, die sich hinsichtlich Ihrer Länge und der Gestaltung der Enden mit abschließenden gepaarten Basenpaaren oder überhängenden, nicht gepaarten Nucleotiden unterscheiden (Tab. 6). Diese Überhänge sollten die Kristallisationseigenschaften der Komplexe variieren, indem möglichst verschiedene Kristallkontakte zwischen den Enden der Oligonucleotide geknüpft werden, die dann in verschiedenen Kristallformen (Raumgruppen) und damit Packungsmustern resultieren sollten.

Für dsDNA mit zwei Heptaden wurden Längen von 14- bis 19-bp getestet und mit drei Heptaden 21- bis 25-bp. In Tab. 6 sind alle zur Kristallisation eingesetzten Oligonucleotide aufgeführt und die Ergebnisse der Kristallisation mit ω oder $\Delta 19\omega$ vermerkt. Sofern Kristalle gezüchtet werden konnten und die Raumgruppen bestimmt wurden, ist dies vermerkt. Außerdem wurden zwei Oligonucleotide entworfen, die eine Haarnadel-Struktur ausbilden (Tab. 6).

3.1.5 Kristallformen von WT ω -DNA

3.1.5.1 Vorarbeiten

Erste Kristallisationsexperimente von WT ω -Repressor im Komplex mit hybridisierten 14-, 15-, 21- und 22-mer Oligonucleotiden (Tab. 6) wurden von K. Murayama (pers. Mitteilung) durchgeführt. Bis auf die 22-mer DNA fehlt diesen Oligonucleotiden ein AT-Basenpaare für die erste Heptade (Tab. 6). Für ω -15mer (Tab. 6) konnten aus Kristallisationsbedingungen, die 1,5 - 2,0 M Dinatrium-Malonat enthielten, $0,2 \times 0,2 \times 0,2$ mm große Kristalle gezüchtet werden (Abb. 9A). Diese Kristalle streuten bei Diffraktionsmessungen am hauseigenen Drehanodengenerator bis zu einer Auflösung von 3 Å. Eine Indizierung der Diffraktionsdaten schlug jedoch mit den verwendeten Programmen DENZO (Otwinowski und Minor, 1997), XDS (Kabsch, 1988) und MOSFLM (Leslie, 1992) fehl. Auch die Reproduktion dieser Kristallform war nicht möglich. In weiteren Kristallisations-Experimenten von K. Murayama von WT ω mit 22-mer DNA (Tab. 6) wurden Kristalle unter PEG-Bedingungen beobachtet, welche jedoch keine Diffraction zeigten (siehe Kap. 3.1.5.2 im Anschluss).

3.1.5.2 Kristallformen von WT ω -DNA

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vorwiegend Oligonucleotide gewählt, welche mehrere zusätzliche Basenpaare zur reinen Operator-Sequenz aufweisen (Tab. 6). Die meisten Oligonucleotide konnten mit WT ω erfolgreich kokristallisiert werden. Die Kristalle zeigten dabei meist eine ähnliche tetragonale Kristallform (Abb. 9B,D) und wurden vorwiegend unter Bedingungen erhalten, welche PEGs verschiedener Größe als Fällungsmittel enthielten. Für Diffraktionsexperimente eigneten sich diese Kristalle nicht, da bei Messungen am hauseigenen Drehanodengenerator und bei RT nur wenige Reflexe bei niedriger Auflösung beobachtet werden konnten. Die Raumgruppe dieser Kristalle konnte in keinem Fall bestimmt werden. Offensichtlich spielte die Länge des eingesetzten DNA-Fragments für das Wachstum dieser morphologisch ähnlichen Kristalle eine untergeordnete Rolle, so dass die Kristallkontakte wahrscheinlich nur durch Protein-Protein Wechselwirkungen aufgebaut werden. Die Fragilität der Kristalle deutete darauf hin, dass die Kristallkontakte nur sehr schwach sind und keinen geordneten Kristallaufbau vermitteln.

In Reservoirlösung gewaschene ω -DNA Kristalle wurden aufgelöst und mittels SDS-PAGE auf ihren Proteingehalt analysiert. Die Anwesenheit von DNA in den Kristallen wurde durch Anfärben mit Ethidiumbromid in Reservoirlösung (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) bestätigt.

Mittels Kristallisation in mit Agarose-Gel gefüllten Kapillaren konnten in einigen Fällen größere Kristalle erhalten werden (Abb. 9C), die Tauglichkeit für röntgenkristallographische Untersuchungen konnte jedoch nicht verbessert werden.

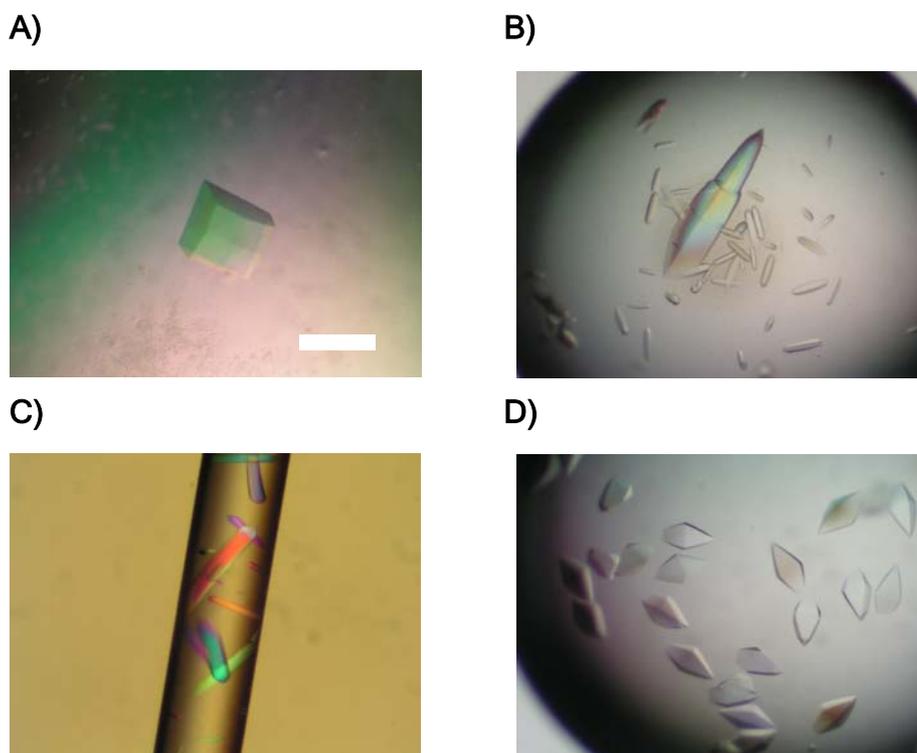


Abbildung 9 Kristalle des WT ω -Repressors im Komplex mit DNA.

- (A) WT ω -Repressor im Komplex 15mer-DNA (Tab. 6). Der weiße Balken entspricht einer Länge von 200 μm . Kristallisationsbedingung: 100 mM Natrium-Cacodylat (pH 6,5), 2,0 M Dinatrium-Malonat (pH 7,5), 100 mM NaCl. Kristalle streuten am hauseigenen Drehanodengenerator bei 100 K bis zu einer Auflösung von 3 \AA , eine Indizierung war nicht möglich.
- (B) Kristalle von WT ω im Komplex mit 23mer DNA (Tab. 6). Kristallisationsbedingung: 100 mM Natrium-Cacodylat, pH 7,0; 150 mM KCl; 16% (w/v) PEG 4K.
- (C) WT ω -Repressor im Komplex mit 19mer DNA. Kristalle wurden in einer Kapillare gezüchtet ($\varnothing = 0,3 \text{ mm}$). Kristallisationsbedingung: 100 mM HEPES (pH 7,0), 2,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1% (w/v) LMP-Agarose.
- (D) Kristalle von WT ω im Komplex mit 19mer DNA. Kristallisationsbedingung: 100 mM Tris/HCl (pH 7,5), 20% PEG 3350, 150 mM KCl.

Kristalle unter (B-D) zeigten bei röntgenkristallographischen Messungen bei RT keine Diffraction.

3.1.6 Messung von Röntgen-Beugungsdaten

Die bei den Röntgenbeugungsexperimenten eingesetzte Strahlung besitzt infolge ihrer Frequenz hohe Energie, die neben der kristallspezifischen Diffraktion auch zu Ionisierung und Radikalbildung im Kristall führt. Die Radikale modifizieren in einer Kettenreaktion Nachbarmoleküle und stören die periodische Anordnung der Gitterbausteine, so dass die Diffraktionsqualität abnimmt. Da die Entstehung und Diffusion der Radikale temperaturabhängig ist, werden insbesondere unter Verwendung von Synchrotronstrahlung Datensammlungen von Proteinkristallen an eingefrorenen Kristallen bei Temperaturen um 100 K durchgeführt.

Um Eisbildung beim Einfrieren der Kristalle zu vermeiden, müssen die Kristalle abhängig von der Zusammensetzung der Mutterlauge mit einer sogenannten Cryoschutzlösung behandelt werden. Gewöhnlich wurde dazu die Mutterlauge mit 20% (v/v) Glycerin supplementiert und die Kristalle langsam in Schritten von 5% Glycerin in diese Lösung überführt. Alternativ konnten auch Polyethylenglycol 200 und 400, 2-Methyl-2,4-pentandiol, Glykol, Glucose oder Trehalose verwendet werden. Die mit Cryoschutzlösung getränkten Kristalle wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder direkt in den auf 100 K temperierten Cryostrahl überführt und vermessen. $\Delta 19\omega$ -DNA Kristalle, die in Kristallisationsexperimenten gezüchtet wurden, welche Malonat als Fällungsmittel enthielten, benötigten ab einer Endkonzentration von > 2 M Malonat keine Behandlung mit Cryoschutzlösung, da das enthaltene Malonat Eisbildung verhindert. Für diese Kristalle wurde eine hohe Mosaizität von $\sim 1^\circ$ beobachtet, die leicht vermindert werden konnte, wenn die Kristalle nach der Aufnahme mit einer Nylon-Schleife unverzüglich in den Cryostrahl gebracht wurden.

Die berücksichtigte Auflösungsgrenze für die verschiedenen Kristallformen wurde aufgrund des jeweiligen Signal-über-Rausch Verhältnisses, des R_{sym} -Wertes sowie der Vollständigkeit der Daten in Schalen mit hoher Auflösung festgelegt.

Kristalle der hexagonalen Kristallform von $\Delta 19\omega$ im Komplex mit 18dirTA und 18invTA (Tab. 6) zeigten eine stark anisotrope Diffraktion (Kap. 3.2.1). In Richtung der hexagonalen Achse wurden Reflexe bis $2,7 \text{ \AA}$ beobachtet; in den beiden anderen Richtungen konnte nur eine Auflösung bis 5 \AA gemessen werden, so dass die Vollständigkeit und Qualität der Datensätze im Bereich von $2,7 - 4,5 \text{ \AA}$ limitiert war.

3.2 Röntgenstrukturanalysen

Im Rahmen dieser Arbeit lieferte nur 17-bp lange DNA, die mit $\Delta 19\omega_2$ kokristallisiert wurde, reproduzierbare, röntgentaugliche Kristalle. Die 17-bp DNA besitzt an den 3' Enden überhängende T, A oder G, C Nucleotide, wobei im Fall der T, A Überhänge Kristalle mit hexagonalem Habitus erhalten wurden (Kap. 3.2.1). Obwohl die Struktur dieser Kristallform bislang nicht bestimmt werden konnte, werden diese Kristallform und die unternommenen Versuche zur Strukturbestimmung in Kap. 3.2.1 kurz beschrieben.

Die später verwendeten 17-bp-DNA-Fragmente mit G, C Überhängen kokristallisierten mit $\Delta 19\omega_2$ in den monoklinen Raumgruppen C2 und P2₁. Die Strukturbestimmungen dieser Kristalle werden in Kap. 3.2.2 beschrieben.

3.2.1 Die hexagonale Kristallform

3.2.1.1 Hexagonale Kristalle von $\Delta 19\omega_2$ im Komplex mit 18dirAT und 18invTA

Kristalle mit hexagonaler Morphologie von $\Delta 19\omega_2$ im Komplex mit 17-bp-DNA mit T, A Überhängen (Tab. 6) und im folgenden je nach Orientierung der Heptaden 18dirAT (direkte Wiederholungen) bzw. 18invTA (invertierte Wiederholungen) genannt, konnten unter Kristallisationsbedingungen mit 0,1 M Natriumacetat und ~2,4 M Ammonium-Dihydrogenphosphat erhalten werden (Abb. 10). Die hohe Phosphatkonzentration verwundert zunächst, da Phosphat mit dem Phosphatrückgrat der DNA um die Bindungstaschen des Proteins konkurriert und somit in vielen Fällen die Affinität der Bindung von Proteinen an DNA herabsetzt. Die Anwesenheit sowohl von Protein als auch von DNA im Kristall wurde bestätigt (Kap. 3.1.5.2). Von diesen Kristallen konnten am Strahlrohr ID14-2 (ESRF, Grenoble) Datensätze bis zu einer Auflösung von 2,8 Å gesammelt (Tab. 7) und die Kristallsymmetrie den enantiomorphen Raumgruppen P6₁ oder P6₅ zugeordnet werden. Die für die Zugehörigkeit zu den Raumgruppen P6₁ oder P6₅ erforderlichen Auslöschungs-Bedingungen für die gesammelten hk0-Reflexe waren in allen Datensätzen eindeutig erfüllt.



Abbildung 10 Kristalle von $\Delta 19\omega_2$ im Komplex mit 17-bp-DNA mit A, T Überhängen (18invTA). Kristallisationsbedingung: 0,1 M Natriumacetat und 2,4 M Ammonium-Dihydrogenphosphat. Der hexagonale Habitus der Kristalle ist gut erkennbar. Längs der sechszähligen Achse messen die Kristalle maximal 300 μM .

3.2.1.2 Überstruktur in der hexagonalen Kristallform

Wie in Tab. 7 aufgeführt, wurden bei der Indizierung der Röntgendaten der hexagonalen Kristallform die Zellparameter zunächst zu $a = b = 75 \text{ \AA}$ und $c = 350 \text{ \AA}$ bestimmt. Diese Indizierung ließ viele Reflexe insbesondere bei niedriger Auflösung unerfasst. In Abb. 11 ist eine Diffraktionsaufnahme exemplarisch aufgeführt. Deutlich sind zwischen zwei Reflexreihen für die „Hauptgitterebenen“ zusätzlich zwei Reflexreihen mit insgesamt schwächerer Reflexintensität für „Zwischengitterschichten“ zu erkennen. Dies wurde zunächst auf eine mögliche epitaxiale Verzwilligung der Kristalle zurückgeführt, dabei liegen verschiedene Domänen des Kristalls gegeneinander verschoben vor. Diese Art der Verzwilligung sollte, sofern die Reflexpositionen nicht überlagern, keinen Einfluss auf die Datenqualität ausüben. Die berechneten Mittelwerte für symmetrie-äquivalente Reflexe (R_{sym}) zeigten unter Berücksichtigung der starken Anisotropie (Abb. 11) und recht hohen Mosaizität $> 0,7^\circ$ realistische Werte zwischen 9 und 13 % (Tabelle 7). Trotz der Messung sehr vieler Kristalle aus vielen leicht variierten Kristallisationsbedingungen konnte kein Exemplar gefunden werden, welches keine Reflexe für das „Zwischengitter“ aufwies. Auch die Variation der DNA-Sequenz und die Einführung von Brom-Uracil und Iod-Uracil im Austausch gegen Thymin-Nucleotide (Kap. 3.2.1.3) zeigte keine Verbesserung der Kristallqualität, so dass das „Zwischengitter“ bei dieser Kristallform immer beobachtet wurde.

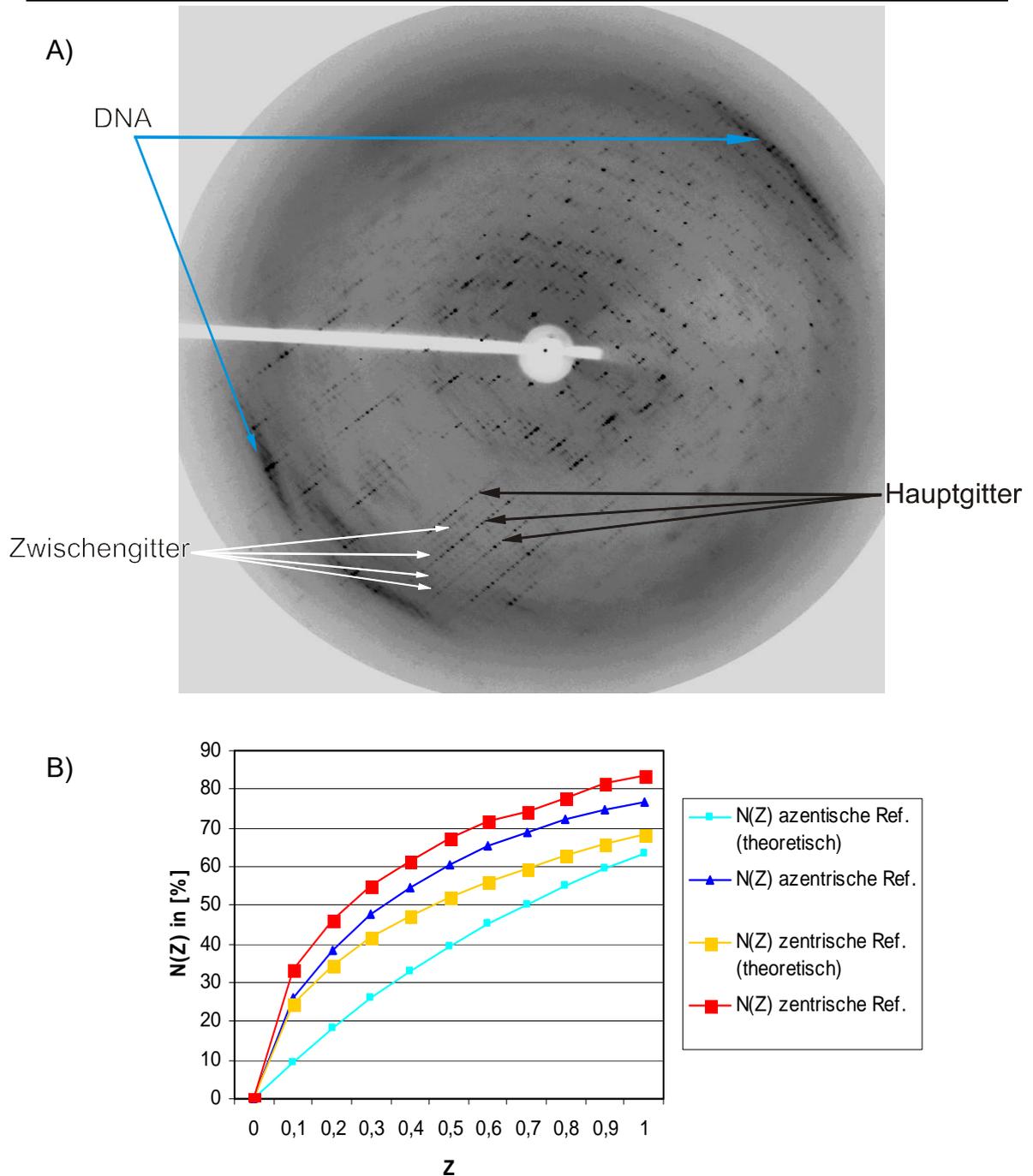


Abbildung 11

(A) Diffraktionsbild von hexagonalen Kristallen mit „Überstruktur“ von $[\Delta 19\omega_2]_2$ -18invTA. Reflexe am Detektorrand entsprechen einer Auflösung von 2,7 Å. Deutlich sichtbar ist die starke Anisotropie des Diffraktionsmusters. Drei Reflexreihen in Richtung der langen c-Achse für das Hauptgitter sind mit schwarzen Pfeilen markiert. Zwischen zwei Hauptgitter-Reflexreihen wurden zusätzlich immer zwei Reflexreihen mit schwächerer Intensität für Zwischengitterschichten beobachtet (weisse Pfeile). Mit blauen Pfeilen wird diffuse Diffraction entlang der kristallographischen c-Achse bei einer Auflösung von 3,4 Å gekennzeichnet, die wahrscheinlich durch parallel entlang der z-Achse des realen Raumes ausgerichtete DNA-Fragmente im Kristall hervorgerufen wird. Der Netzebenenabstand von 3,4 Å spiegelt dabei die Höhe einer Basenpaarstufe in idealer B-DNA wider.

(B) Kumulative Intensitätsverteilung aller unabhängigen Reflexe (Gesamtanzahl Z normiert auf 1) des Datensatzes von Kristallen von $[\Delta 19\omega_2]_2$ -18invTA aus Tabelle 7.

Tabelle 7 Statistiken für kristallographische Daten der hexagonalen Kristallform

Komplex	$[\Delta 19\omega_2]_{2-18\text{invTA}}$	$[\Delta 19\omega_2]_{2-18\text{invTA}}$ alternative Zellkonstanten	$[\Delta 19\omega_2]_{2-18\text{invTA-3*lod-Uracil}}$
Strahlrohr	ID14.2		DESY, BW6
Wellenlänge [Å]	0,933		1,72
Raumgruppe	$P6_1 / P6_5$		$P6_1 / P6_5$
Zellkonstanten a, b, c (Å)	74,48; 74,48; 350,01	128,94; 128,94; 348,9	75,01; 75,01; 349,7
α, β, γ [°]	90, 90, 120		90, 90, 120
Auslösungsbereich (Å)	30,0-2,8	30,0-3,3	30,0-2,8
gemessene Reflexe	105.460	224.926	133.272
unabhängige Reflexe	26.634	53.348	22.784
Vollständigkeit (%) ^a	99,6(98,8)	99,8 (99,9)	99,2 (98,9)
Redundanz	4,0	4,2	5,9
$\langle I/\sigma(I) \rangle$ ^a	10,6 (3,0)	6,6 (2,4)	11,4 (2,9)
R_{sym} (%) ^{a,b}	8,0 (39)	13,3 (34)	9,1 (37)
Mosaizität (°)	0,7	0,75	0,73

^a Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale.

^b $R_{\text{sym}} = (\sum |I_{\text{hkl}} - \langle I \rangle|) / (\sum I_{\text{hkl}})$, wobei I_{hkl} die beobachtete Intensität und $\langle I \rangle$ die durchschnittliche Intensität von Mehrfachmessungen symmetrieverwandter Reflexe ist.

Mit dem Programm TRUNCATE (CCP4, 1994) wurde eine kumulative Intensitätsverteilung der Reflexe berechnet (Abb. 11B), um eventuell vorhandene hemihedrale oder merohedrale Verzwilligung festzustellen. Beide Kristalldefekte äussern sich in einem charakteristischen sigmoidalen Verlauf im Vergleich zu den theoretisch berechneten Intensitätsverteilungen für zentrische und azentrische Reflexe (Abb. 11B). Zwar zeigte die kumulative Intensitätsverteilung keinen sigmoidalen Verlauf, jedoch wurde eine starke Abweichung zu den theoretischen Verteilungen beobachtet, was auf die Anwesenheit eines Kristalldefekts hindeutet.

Um alle Reflexe einer Diffraktionsaufnahme, also auch die Reflexe des „Untergitters“ zu indizieren und bei der Prozessierung zu berücksichtigen, musste die Indizierung mit Hilfe des Programms DENZO mit manuell eingegebenen, wesentlich größeren Zellparameter a, b = 129 Å und weiterhin c = 350 Å durchgeführt werden. Auf diese Weise indizierte Datensätze zeigten ein wesentlich schlechteres Signal-über-Rausch Verhältnis, da Reflexe für das „Untergitter“ nur bis zu einer Auflösung von ~4 Å beobachtet werden konnten. Insgesamt lag die maximale Auflösung bei 3,3 Å (Tab. 7).

Der Vergleich der für die Indizierung verwendeten Zellparameter für a, b = 75 Å und alternativ a, b = 129 Å zeigt, dass die lange Achse für a, b = 129 Å der

Diagonalen der Grundfläche der hexagonalen Einheitszelle mit Kantenlängen $a, b = 75 \text{ \AA}$ entspricht. Die große Zelle besitzt ein dreifach größeres Volumen als die kleine Zelle und folglich die dreifache Molekülzahl in der asymmetrischen Einheit. Die beobachtete Überstruktur ließ daher auf modulierte Kristalle von $[\Delta 19\omega_2]_2\text{-18dirAT}$ und $[\Delta 19\omega_2]_2\text{-18invTA}$ schließen. In einem idealen, periodisch aufgebauten Kristall wird der Inhalt der asymmetrischen Einheit perfekt durch die Symmetrieeoperatoren der Raumgruppe reproduziert. Reale Kristalle besitzen oft Unordnungen im Kristallgitter und zeigen Abweichungen von idealen Kristallen, die sich in dem Auftreten von Satellitenreflexen äussern. Die Satellitenreflexe sind genauso „scharf“ wie die Hauptreflexe und resultieren aus einer strukturellen Modulation, die in aperiodisch aufgebauten Kristallen enthalten ist. Die Bezeichnung „aperiodisch“ schliesst Kristalle ein, die entweder einer Modulation bestimmter Atompositionen unterliegen oder aber eine Modulation der Besetzung von Molekülen in der Zelle aufweisen. Modulierte Kristallstrukturen konnten bereits für Kleinmoleküle bestimmt werden. Die Strukturen zeigen dabei eine harmonische Variation der Positionen einzelner Atome, so dass die kurzreichende Translationssymmetrie zerstört wird.

Für die Strukturen von $[\Delta 19\omega_2]_2\text{-18invTA}$ und $[\Delta 19\omega_2]_2\text{-18dirTA}$ würde dies bedeuten, dass die kristallographische Symmetrie der „kleinen“ Zelle nicht für alle $[\Delta 19\omega_2]_2\text{-DNA}$ -Komplexe in der Struktur gilt. Dies könnte auf kleine Rotationen oder ein Verkippen der Moleküle gegeneinander zurückgeführt werden. Erst mit der großen Zelle werden alle Orientierungen der einzelnen Moleküle berücksichtigt.

Sogenannte modulierte Kristalle von Kleinmolekülen konnten bereits erfolgreich zur Überstrukturbestimmung herangezogen werden (Daniels *et al.*, 2002; Duncan *et al.*, 2002). Bis heute konnte keine Überstruktur eines Makromoleküls bestimmt werden, lediglich Methoden zur präzisen Aufnahme modulierter Reflexe mit Hilfe von Präzessionsaufnahmen wurden entwickelt (Lovelace *et al.*, 2004).

3.2.1.3 Schweratomderivate von $[\Delta 19\omega_2]_2\text{-18dirAT}$ und $[\Delta 19\omega_2]_2\text{-18invTA}$

Trotz des Vorliegens einer „Überstruktur“ in der hexagonalen Kristallform wurde mangels alternativer Kristallformen versucht, das Phasenproblem mit Hilfe der Methode des multiplen isomorphen Ersatzes mit anomaler Dispersion (MIRAS) zu lösen. Schliesslich bestand die Möglichkeit, dass die derivatisierten Kristalle keine „Überstruktur“ ausbilden und so die Strukturbestimmung mit den Zellkonstanten der „kleinen“ Zelle gelingen könnte.

Da die Kristallisationsbedingung ~ 2 M Phosphatpuffer enthielt, wurden Versuche zur Derivatisierung der Kristalle durch Tränken in schweratomhaltigen Pufferlösungen (z. B. mit Quecksilber-, Platin- oder Goldverbindungen) schnell eingestellt. Stattdessen wurden zwei bzw. drei Thymin-Nucleotide im Thymin-reicheren 18mer Oligonucleotid von 18invTA durch Brom-Uracil- oder Iod-Uracil-Nucleotide ersetzt (Beispiel in Tab. 6). Es konnte von zwei 18invTA-Derivaten, die mit jeweils drei Iod-Uracilen an verschiedenen Positionen modifiziert waren, Datensätze gesammelt werden, welche ähnlich gute Diffraktion und Isomorphie mit den nativen Kristallen von $[\Delta 19\omega_2]_2$ -18invTA zeigten (ein Datensatz wird beispielhaft in Tab. 7 aufgeführt). Die Datensätze wurden bei Wellenlängen von 1,7 bzw. 1,8 Å gesammelt, um gegebenenfalls die anomale Diffraktion der Iod-Atome für die Bestimmung der Schweratomlagen heranzuziehen.

Mit dem Programm SOLVE (Terwilliger und Berendzen, 1999) konnten sechs potentielle Schweratomlagen pro Derivat bestimmt werden. Bei erwarteten drei $[\Delta 19\omega_2]_2$ -18invTA Komplexen in der asymmetrischen Einheit (unter der Annahme eines Matthews-Koeffizienten von 0,57) mit je drei Iod-Uracilen wurden neun Iod-Atome in der asymmetrischen Einheit der „kleinen“ Zelle erwartet. Die nach Phasierung mit SOLVE und anschließender Elektronendichte-Modifikation mit dem Programm RESOLVE (Terwilliger, 2000) berechneten Elektronendichtekarten ließen Basenpaarstapel für DNA entlang der langen c-Achse der Einheitszelle erkennen und vier der sechs bestimmten Schweratomlagen wurden, wie erwartet, im Bereich der Basenpaarstapel beobachtet. In der übrigen Elektronendichte waren jedoch keine Verläufe für die Phosphat-Rückgrate der DNA oder für Sekundärstruktur-Elemente von $\Delta 19\omega_2$ erkennbar. Die Beobachtung von Basenstapeln entlang der c-Achse deckte sich mit der Vermutung, dass die DNA entlang der langen hexagonalen Achse pseudo-kontinuierliche Helizes ausbildet und so die diffuse Diffraktion der Kristalle im Auflösungsbereich von 3,4 Å hervorruft (Abb. 11).

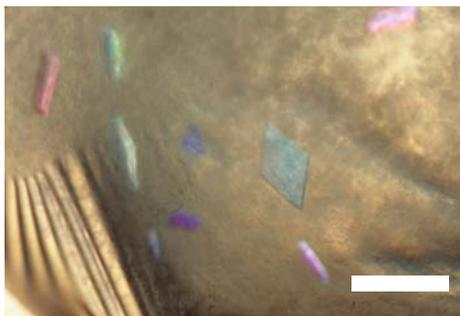
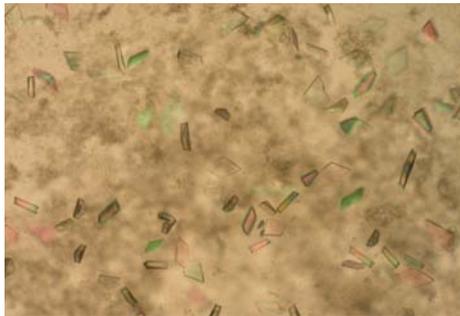
Die Verwendung weiterer Programme zur präziseren Bestimmung der Schweratomlagen wie SHARP/autoSHARP (Bricogne *et al.*, 2003) führten zu keinem verlässlichen Ergebnis. Auch der Versuch der Bestimmung der Schweratomlagen mittels direkter Methoden, implementiert in die Programme ShelXD (Schneider und Sheldrick, 2002) und SHAKEnBAKE (Weeks und Miller, 1999), lieferte kein Ergebnis.

Aufgrund der „Überstruktur“ und der dargelegten Probleme zur Phasenbestimmung war eine Strukturbestimmung dieser Kristallform nicht möglich und wurde deshalb nicht weiter verfolgt.

3.2.2 Kristallformen von $\Delta 19\omega_2$ im Komplex mit ($\rightarrow\rightarrow$) und ($\rightarrow\leftarrow$)

Die Kokristallisation von $\Delta 19\omega_2$ mit ($\rightarrow\rightarrow$)- und ($\rightarrow\leftarrow$)-DNA (siehe Tab. 6) lieferte schließlich röntgentaugliche Kristalle. Rautenförmige Kristalle von $\Delta 19\omega$ -($\rightarrow\rightarrow$) wuchsen nach etwa 3 Tagen aus dem Präzipitat (Abb. 12A), und plattenförmige Kristalle von $\Delta 19\omega$ -($\rightarrow\leftarrow$) mit $>400\ \mu\text{m}$ Kantenlänge wurden durch *microseeding* mit Hilfe eines Katzenhaares gezüchtet (Abb. 12B).

A) $\Delta 19\omega$ -($\rightarrow\rightarrow$)



B) $\Delta 19\omega$ -($\rightarrow\leftarrow$)



Abbildung 12 Kristalle von $\Delta 19\omega$ -($\rightarrow\rightarrow$) und $\Delta 19\omega$ -($\rightarrow\leftarrow$). Die ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA und ($\rightarrow\leftarrow$)-DNA sind 17-bp lang mit einem überhängenden G bzw. C an den 3'-Enden der Oligonucleotide (siehe in Tab. 6). (A) Rautenförmige Kristalle von $\Delta 19\omega$ -($\rightarrow\rightarrow$). Kristallisationsbedingung: 150 mM KH_2PO_4 (pH 7,0), 2,4 M Dinatrium-Malonat (pH 7,5) und 2% 6-Aminocaprinsäure. (B) Kristalle von $\Delta 19\omega$ -($\rightarrow\leftarrow$) wurden durch *microseeding* erhalten unter der Kristallisationsbedingung: 120 mM Na/KPO_4 (pH 7,0), 2,2 M Dinatrium-Malonat (pH 7,5) und 2-3 % 2-Methyl-2,4-pentandiol. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 200 μm .

3.2.3 Übersicht über die bestimmten Röntgenstrukturen

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei Kristallstrukturen des N-terminal verkürzten ω -Repressors ($\Delta 19\omega$) im Komplex mit ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA und ($\rightarrow\leftarrow$)-DNA mit der Methode des Molekularen Ersatzes bestimmt werden. Die DNA-Fragmente sind 17-bp DNA lang und besitzen G bzw. C Überhänge an den 3'-Enden der Oligonucleotide. Sie unterscheiden sich in der Anordnung der Erkennungs-Heptaden,

die direkt ($\rightarrow\rightarrow$), nicht-palindromisch und invertiert ($\rightarrow\leftarrow$), palindromisch wiederholt sind. Außerdem wurde die Struktur von $\Delta 19\omega_2$ im Komplex mit einer mutierten ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA bestimmt. Dazu wurde in der zweiten Heptade der ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA an der zweiten Position ein AT-Basenpaar gegen ein CG-Basenpaar ausgetauscht (${}^8\text{AGTCACA}^{14}$; Tabelle 6).

Neben den Protein-DNA-Komplexen bestehend aus zwei $\Delta 19\omega_2$ gebunden an ($\rightarrow\rightarrow$)- bzw. ($\rightarrow\leftarrow$)-DNA, die im Folgenden als $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ bzw. $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ bezeichnet werden, enthalten die asymmetrischen Einheiten beider Strukturen **freie ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA** bzw. **freie ($\rightarrow\leftarrow$)-DNA** (siehe Abb. 14). Vereinfachend werden die gesamten Strukturen im Folgenden mit $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)/(\rightarrow\rightarrow)$ bzw. $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)/(\rightarrow\leftarrow)$ bezeichnet. Kristallographische Daten und Verfeinerungs-Statistiken für die Strukturen sind in Tab. 8 angegeben.

Tabelle 8 Kristallographische Daten und Verfeinerungs-Statistiken. Übersicht über die Kristallparameter sowie die zur Strukturbestimmung und Verfeinerung verwendeten Röntgendaten.

	$[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)/(\rightarrow\rightarrow)$	$[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)/(\rightarrow\leftarrow)$	$[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)/(\rightarrow\rightarrow)$ A9-T6' ersetzt durch G9-C6'
Raumgruppe	C2	P2 ₁	C2
Zellkonstanten a,b,c (Å)	44,6; 75,0; 219,4	76,0; 42,5; 103,7	44,6; 76,1; 220,0
β (°)	108,8	107,16	109,3
Auflösungsbereich (Å)	30,0-2,45	30,0-2,6	30,0-2,9
gemessene Reflexe	83.105	46.759	38.486
unabhängige Reflexe	25.244	18.516	14.147
Vollständigkeit(%) ^a	97,4 (81,7)	92,8 (72,2)	88,7 (72,1)
Redundanz	3,3	2,5	2,7
$\langle I/\sigma(I) \rangle$ ^a	12,7 (3,0)	11,7 (3,1)	12,1 (2,9)
R_{sym} (%) ^{a,b}	6,4 (38)	11,3 (29)	10,3 (37)
Mosaizität (°)	0,7	0,8	0,8
<i>Verfeinerungsstatistik</i>			
Anzahl Reste (Protein und DNA) / Atome	268 / 3.189	290 / 2.609	266 / 3.151
No. H ₂ O	76	62	39
R_{work} (%)	22,7	22,5	24,3
R_{free} (%)	26,0	25,9	28,4
rms Abweichungen ^c			
Bindungslängen (Å)	0,011	0,009	0,014
Bindungswinkel (°)	1,4	1,1	1,5

^a Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale.

^b $R_{\text{sym}} = (\sum |I_{\text{hkl}} - \langle I \rangle|) / (\sum I_{\text{hkl}})$, wobei I_{hkl} die beobachtet Intensität und $\langle I \rangle$ die durchschnittliche Intensität von Mehrfachmessungen symmetrieverwandeter Reflexe ist.

^c Berechnet mit PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993).

3.2.4 Strukturlösung mit molekularem Ersatz

Die Methode des Molekularen Ersatzes beruht auf der Existenz eines strukturverwandten Proteinmodells bzw. eines Protein/DNA-Modells, welches mit Hilfe verschiedener Such-Algorithmen rechnerisch in der Einheitszelle des untersuchten Kristalls platziert wird und als Startpunkt für die Berechnung der Phaseninformation dient (siehe Kap. 2.7.1.1).

Da die Strukturen des freien $\Delta 20\omega_2$ und der Repressor-DNA-Komplexe von RHH-Repressoren bereits bekannt sind, wurde zunächst versucht, die Struktur des $\Delta 19\omega_2$ -($\rightarrow\rightarrow$)-Komplexes mit Hilfe der Methode des Molekularen Ersatzes zu bestimmen.

3.2.4.1 ω -DNA-Suchmodelle

Um ein geeignetes Modell zur Lösung der Struktur von $\Delta 19\omega_2$ im Komplex mit ($\rightarrow\rightarrow$) zu erstellen, wurden mehrere Strategien verfolgt. Zunächst diente die vollständige Struktur des MetJ-Operator-Komplexes als grobes Suchmodell. Zur Verbesserung des Modells wurden die an DNA gebundenen Dimere von MetJ mit $\Delta 20\omega_2$ (PDB Eintrag 1IRQ) überlagert und ersetzt. Da im Falle des MetJ-Operator-Komplexes die Zentren der Operator-Halbseiten 8-bp auseinander liegen und der Operator stark gebogen vorliegt (Tab. 12), erschien die Verwendung der kompletten Modelle, die aus zwei $\Delta 19\omega_2$ und 17-bp langem Operator bestehen, als wenig sinnvoll. Daher wurde das Modell auf nur ein $\Delta 20\omega_2$ gebunden an eine MetJ-Operator-Halbseite beschränkt. Im Gegensatz zu den Repressoren Arc und CopG, die an palindromische Operatoren binden, zeigen die die vom ω -Repressor regulierten Promotorregionen des Plasmids pSM19035 mindestens sieben aufeinander folgende Heptaden (siehe Abb. 6), wobei jede Heptade eine Bindungsstelle für ein ω -Dimer darstellt (de la Hoz, 2001). Dies legte die Vermutung nahe, dass die DNA entweder eine superhelikale Struktur ausbildet und sich so um einen Kern benachbarter ω -Dimere windet (in Analogie zu den Histon-DNA-Komplexen und wie für den CopG-Operator-Komplex postuliert (Costa *et al.*, 2001)), oder aber linear verläuft und die ω -Dimere eine Protein-Matrix um die DNA bilden (ein analoges Modell wurde für den MetJ-Operator postuliert (Somers und Phillips, 1992)). Im letzteren Fall würde die DNA eher linear vorliegen. Deshalb wurde eine Heptade in der B-Form mit dem Programm 3DNA (Lu und Olson, 2003) generiert und die 8-bp DNA im $\Delta 20\omega_2$ -MetJ-Operator-Modell (siehe oben) mit der Heptade überlagert und ersetzt. Mit diesem Modell sollte die starke DNA-Biegung in der Struktur der MetJ-Operator-Komplexes vermieden werden.

3.2.4.2 Molekularer Ersatz

Für die Strukturbestimmung mit der Methode des Molekularen Ersatzes wurden die Programme PHASER (Storoni *et al.*, 2004) und MOLREP (Vagin und Teplyakov, 1997) verwendet. Die in Kapitel 3.2.4.1 beschriebenen Modelle wurden eingesetzt und die Suchparameter in einem weiten Bereich variiert.

Die Strukturlösung gelang schließlich mit dem Programm PHASER, indem in einem Auflösungsbereich von 20 bis 3,5 Å nach zwei Modell-Molekülen gesucht wurde, bei denen ein $\Delta 20\omega_2$ an eine Heptade in der idealen B-Form modelliert ist. Unter Verwendung dieses Modells und ähnlicher Suchparameter konnte mit dem Programm MOLREP keine Lösung gefunden werden. Das neuere Programm PHASER konnte jedoch einen $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ -Komplex in der asymmetrischen Einheit lokalisieren. Als Kriterium für die korrekte Lösung dienten in diesem Fall die Testparameter *Log-likelihood-Gain* und der sogenannte *Z-score* (Storoni *et al.*, 2004).

Die erhaltene Lösung wurde mit dem Programm REFMAC5 einem *restrained* Refinement unterzogen (siehe Kapitel 2.7.1.2). Die berechneten $2F_o-F_c$ und F_o-F_c Elektronendichtekarten zeigten an beiden Enden der DNA zusätzliche Dichte für weitere Basenpaare. Es wurde jedoch keine Elektronendichte für weitere $\Delta 19\omega$ -Dimere gefunden. Die Basenpaare und ihre Sequenz sowie einige zusätzliche Aminosäuren für die $\Delta 19\omega$ -Ketten wurden manuell mit dem Programm O in die Elektronendichte eingepasst und das erweiterte Modell weiter verfeinert. Der Inhalt der asymmetrischen Einheit der Kristallstruktur $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)/(\rightarrow\rightarrow)$ besteht im endgültigen Modell aus einem Protein-DNA-Komplex $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ und einer freien $(\rightarrow\rightarrow)$ -DNA (Abb. 14A).

3.2.4.3 Molekularer Ersatz zur Strukturbestimmung von $\Delta 19\omega-(\rightarrow\leftarrow)$

Von $\Delta 19\omega-(\rightarrow\leftarrow)$ konnten Kristalle in der ebenfalls monoklinen Raumgruppe $P2_1$ erhalten werden. Auch die fast identische Größe der asymmetrischen Einheit (siehe Elementarzelle-Konstanten in Tab. 8) ließ auf eine ähnliche Molekülpackung wie in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)/(\rightarrow\rightarrow)$ schließen. Als Modell für den molekularen Ersatz mit dem Programm MOLREP wurde das verfeinerte Modell von $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ verwendet und die Rotations- und Translationssuche im Auflösungsbereich von 20 bis 4 Å durchgeführt. Es wurde eine eindeutige Lösung mit einem Komplex in der asymmetrischen Einheit gefunden, wobei die Testparameter Korrelationskoeffizient

und R-Faktor als Kriterium für die Feststellung der korrekten Lösung dienten (Vagin und Teplyakov, 1997). Nach erfolgreicher Translationssuche wurde als nächster Schritt eine Starre-Körper-Verfeinerung durchgeführt und nach *restrained* Verfeinerung mit dem Programm REFMAC5 erste Elektronendichtekarten berechnet (siehe nächstes Kapitel). Die im Vergleich zu ($\rightarrow\rightarrow$) verschiedenen Basenpaare der ($\rightarrow\leftarrow$)-DNA wurden manuell mit Hilfe des Programms O ausgetauscht. Die $2F_o-F_c$ -Elektronendichtekarten zeigten nur lückenhafte Elektronendichte für die freie ($\rightarrow\leftarrow$)-DNA, und nur vier der 17-bp konnten modelliert werden.

3.2.4.4 Kristallographische Verfeinerung

Die Verfeinerung der zunächst groben Strukturmodelle wurde mit dem Programm REFMAC5 der Versionen 4.2.2 und 5.0 durchgeführt (Murshudov *et al.*, 1997). Bei der Verfeinerung wird das Modell durch Optimierung der Atompositionen und der isotropen Temperaturfaktoren, die proportional zum Quadrat der mittleren Auslenkung des jeweiligen Atoms sind, an die gemessenen Daten angepasst. Als Gütekriterien dienten der kristallographische R-Faktor und der freie R-Faktor (Brunger, 1992) sowie die Molekülgeometrie des verfeinerten Modells. Der freie R-Faktor wurde aus etwa 1.000 vor der Verfeinerung ausgeschlossenen Reflexen berechnet und beschreibt objektiv (ohne Einfluss durch das verwendete Modell) die Qualität der Verfeinerung. In der Protein-Kristallographie wird aufgrund des ungünstigen Verhältnisses von experimentellen Daten zu Parametern von 1,5 zu 2,0 die Geometrie des Modells in sinnvollem Rahmen eingegrenzt. Diese Restriktionen, deren Parameter statistisch aus hochaufgelösten Strukturen von Kleinmolekülen gewonnen wurden (Engh und Huber, 1991; Parkinson *et al.*, 1996a), begrenzen die Bindungslängen und -winkel sowie die Planarität der Peptidbindungen und der aromatischen Gruppen, Tetraeder- und Torsionswinkel sowie nicht-bindende van-der-Waals-Kontakte. Hinsichtlich der Temperaturfaktoren wurden ebenfalls Einschränkungen vorgenommen. Hierbei werden die Differenzen der Temperaturfaktoren benachbarter, kovalent aneinander gebundener Atome limitiert. Bei Konvergenz des freien R-Faktors wurde die Verfeinerung abgeschlossen und das Modell als optimale Lösung festgehalten.

3.3 Strukturanalysen

3.3.1 Strukturbeschreibung

Die Kristallstrukturen von $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)/(\rightarrow\rightarrow)$ und $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)/(\rightarrow\leftarrow)$ enthalten DNA-Fragmente, die frei und im Komplex mit $[\Delta 19\omega_2]_2$ vorliegen. Die gleichzeitige Existenz eines Protein-DNA-Komplexes und freier dsDNA in einer Kristallstruktur ist nach unserem Kenntnisstand bisher nicht beschrieben worden.

Die Anwesenheit von freier DNA im Kristall konnte auch spektroskopisch nachgewiesen werden. Das Absorptionsprofil von in Reservoirlösung gewaschenen Kristallen sowie von Mutterlauge und von der zur Kristallisation eingesetzten Probe von $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ zeigte, dass die Kristalle gegenüber der Mutterlauge im Verhältnis zu vorhandenem $\Delta 19\omega$ -Protein (absorbiert praktisch nur bei <240 nm, da es keine Tryptophane enthält) doppelt soviel DNA enthielt (Abb. 13).

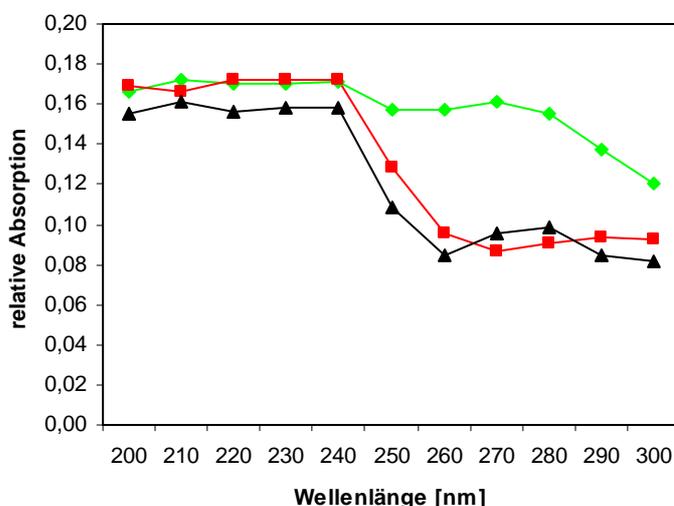


Abbildung 13 Absorptionsprofile von in Reservoirlösung gewaschenen Kristallen, Mutterlauge und $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ -Probe. Vor der Aufnahme des Absorptionsprofils wurden die Konzentrationen der Proben so eingestellt, dass bei einer Wellenlänge von 220 nm vergleichbare Absorption gemessen wurde. Aufgelöste Kristalle (grüne Kurve) absorbieren bei Wellenlängen zwischen 250 und 300 nm deutlich stärker als die Mutterlauge (rote Kurve) und zur Kristallisation eingesetzte $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ -Probe (schwarze Kurve) und enthalten daher verhältnismäßig mehr DNA.

3.3.1.1 Die Kristallstruktur von $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)/(\rightarrow\rightarrow)$

In Abb. 14 ist die Zusammensetzung der asymmetrischen Einheit von $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)/(\rightarrow\rightarrow)$ schematisch dargestellt und Abb. 15A, B zeigt die Struktur des Komplexes von $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ in zwei Ansichten. Die pseudo-zweizähligen Achsen (pseudo- C_{2M} -Rotationsachsen) der $\Delta 19\omega$ -Dimere koinzidieren ungefähr mit den lokalen Helixachsen der Heptaden und passieren die Heptaden $0,3 \text{ \AA}$ stromabwärts der zentralen GC-Basenpaare.

Die Enden von freier und $\Delta 19\omega$ -gebundener DNA interagieren in einer Kopf-Kopf-Anordnung und formen so pseudo-kontinuierliche Helizes. Solche „unendlichen“ Helizes werden häufig in Kristallen von Protein-DNA-Komplexen beobachtet. Die Verläufe der DNA-Strukturen in beiden Kristallformen entsprechen jedoch nicht wirklich einer „unendlichen“ DNA, da die terminalen Basenpaare zweier interagierender Helizes versetzt sind.

Das ungepaarte 16'-G liegt bei der Versetzung in der kleinen Furche der benachbarten DNA und formt dort zwei Wasserstoffbrücken mit 0-G, so dass zwei übereinander liegende Basentriplets entstehen (siehe Abb. 14). Im Bereich der beiden Basentriplets gelang die Sequenzzuordnung leicht, da hier die Elektronendichte sehr gut definiert ist. Ausgehend von diesem Bereich konnte die Sequenz der freien $(\rightarrow\rightarrow)$ -DNA zugeordnet werden. Dies erwies sich als sehr nützlich, da in diesem Bereich die Elektronendichte für das DNA-Rückgrat lückenhaft ist und der zweite DNA-DNA-Kontakt nicht unmittelbar identifiziert werden konnte. Im endgültigen Modell liegen die ungepaarten Cytosine C17 fehlgeordnet vor und die terminalen GC-Basenpaare stapeln im van-der-Waals Abstand übereinander. Die Integrität der Oligonucleotide wurde von Dr. Sascha Sauer (MPI für Molekulare Genetik, Berlin) mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie von aufgelösten Kristallen nachgewiesen (Kap. 2.5.2). Die Konformationen sowohl der freien als auch der Repressor-gebundenen $(\rightarrow\rightarrow)$ -DNA ähneln idealer, gerader DNA in der B-Form (Kap. 3.6.2.1).

Jeder Repressor bindet mit dem antiparallelen β -Faltblatt in die große Furche der DNA. Die Seitenketten Thr29 und Arg31 auf der Oberfläche des Faltblatts gehen direkte Wasserstoffbrücken mit Kanten der Basenpaare ein, und tragen so zur Sequenzspezifität des Komplexes bei. Zahlreiche Kontakte zwischen den Phosphodiesterückgrat und Aminosäuren, die hauptsächlich aus dem Schlaufenbereich zwischen Helix $\alpha 1$ und $\alpha 2$ stammen, vervollständigen die Protein-DNA-Interaktionen. Auch die beiden benachbarten $\Delta 19\omega$ -Dimere interagieren über ihre Helizes $\alpha 1(\prime)$ miteinander (Abb. 15).

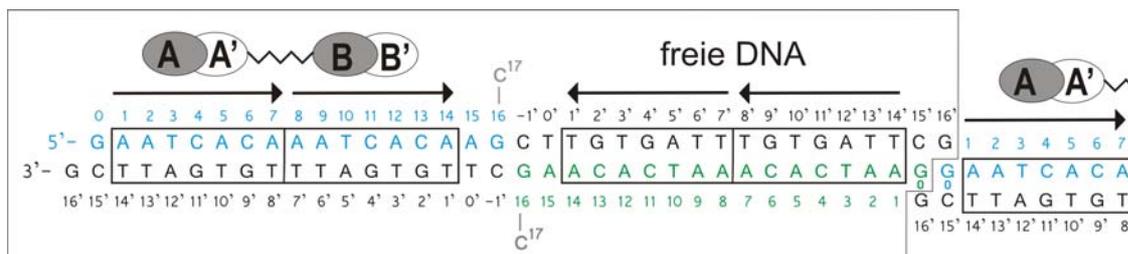
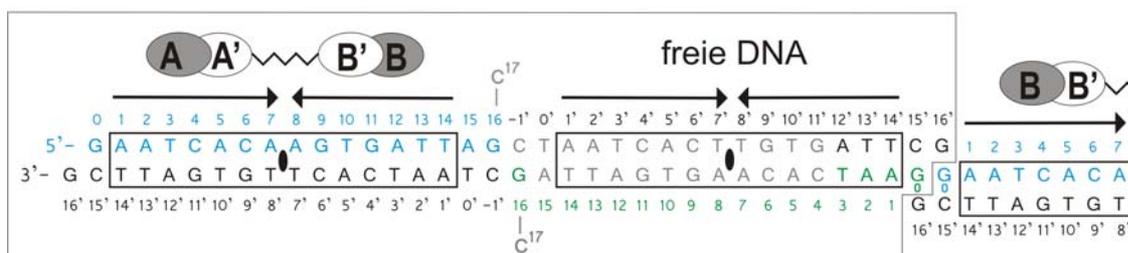
A) $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)/(\rightarrow\rightarrow)$ B) $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)/(\rightarrow\leftarrow)$ 

Abbildung 14 Die zur Kokristallisation verwendeten Oligonucleotide und die Zusammensetzung der durch die großen Kästen markierten asymmetrischen Einheiten. Die asymmetrische Einheit in (A) enthält einen $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ Komplex und freie $(\rightarrow\rightarrow)$ -DNA. Die asymmetrische Einheit in (B) entsprechend $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ und freie $(\rightarrow\leftarrow)$ -DNA.

$\Delta 19\omega$ -Untereinheiten, die die gleichen Kontakte zur Heptade eingehen, sind als graue $\Delta 19\omega A/B$ bzw. weiße $\Delta 19\omega A'/B'$ Ovale dargestellt. Zickzack-Linien kennzeichnen Untereinheiten, welche über Helizes $\alpha 1$ miteinander interagieren. Die pseudo-zweizähligen Achsen (pseudo- C_{2D} -Rotationsachsen), die die $\Delta 19\omega_2$ und die jeweils gebundene Heptade in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ ineinander überführen, werden durch schwarze Ellipsen repräsentiert. Freie und Repressor-gebundene DNA-Fragmente sind zueinander Kopf-Kopf orientiert, dabei sind die Heptaden mit der Sequenz 5'-AATCAC^A/T-3' durch Pfeile gekennzeichnet und einzelne Nucleotide nummeriert (mit Apostroph in den „unteren“ Strängen). Die „oberen“ Stränge der freien DNA in grün. Die grauen Nucleotide C17 in beiden asymmetrischen Einheiten sowie in (B) die Basenpaare 4 bis 15 der freien $(\rightarrow\leftarrow)$ -DNA in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)/(\rightarrow\leftarrow)$ konnten infolge schwacher Elektronendichte nicht modelliert werden. Die Integrität der beiden Oligonucleotide wurde jedoch durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie von aufgelösten Kristallen bestätigt.

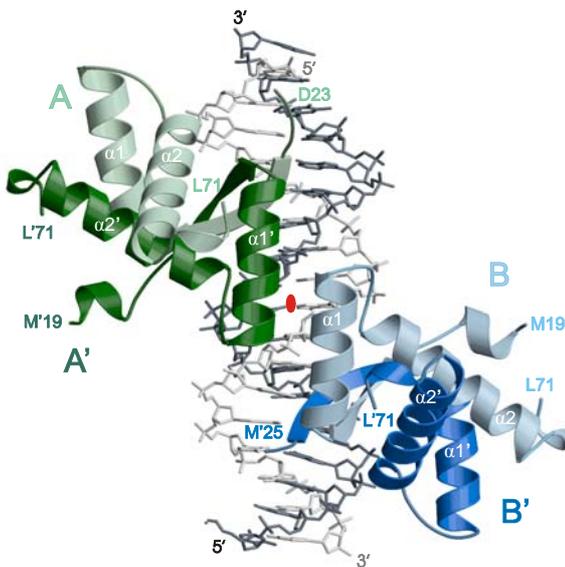
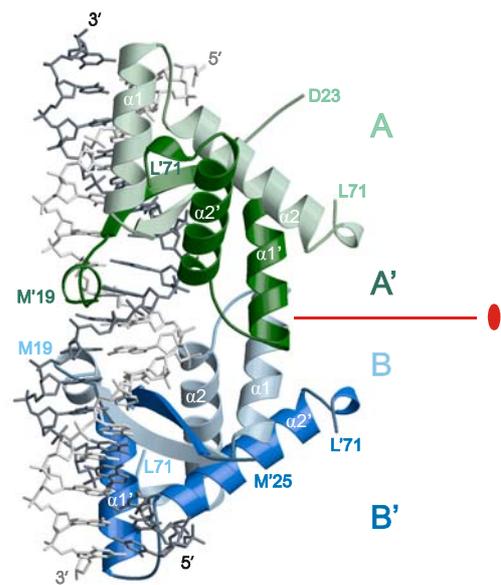
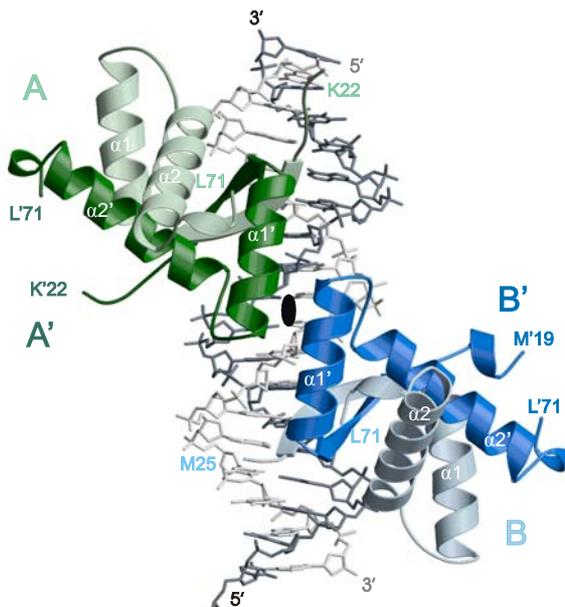
A) $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ B) $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ C) $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ 

Abbildung 15 Die Struktur der Komplexe $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ und $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$.

(A) Die Oligonucleotide der dsDNA sind für den Stromabwärts-Strang in hellgrau und für den Komplementärstrang in dunkelgrau dargestellt. Die $\Delta 19\omega$ -Monomere sind in hellgrün/dunkelgrün für die Ketten A und A' des ersten Dimers und hellblau/dunkelblau für die Ketten B und B' des zweiten Dimers dargestellt. N- und C-Termini sind in der Farbe der zugehörigen Kette gekennzeichnet. Die Helizes sind mit $\alpha 1$ und $\alpha 2$ bezeichnet.

Die Dimer-Dimer Grenzfläche befindet sich zwischen den Helizes $\alpha 1'$ der Ketten A' und B. Die pseudo- C_{2D} -Rotationsachse (rote Ellipse) gilt nur für die Helizes $\alpha 1'$. Das A/A' Dimer kann besser durch eine 7/10 Drehung um die Helixachse und Translation um 7-bp in das B/B' Dimer überführt werden als durch die pseudo- C_{2D} -Rotationsachse (Kap. 3.4.2).

(B) Der Komplex $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ aus (A), um 90° um die vertikale DNA-Helixachse rotiert, zeigt die beiden β -Faltblätter der Dimere in der großen Furche der DNA.

(C) Die Struktur des $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ in derselben Orientierung wie $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ in (A). Die schwarze Ellipse kennzeichnet die pseudo- C_{2D} -Rotationsachse, die die $\Delta 19\omega$ -Dimere samt gebundener Heptaden ineinander überführt.

3.3.1.2 Strukturbeschreibung des Komplexes $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$

Die Polypeptidketten der $\Delta 19\omega$ -Dimere werden, wie in den Abbildungen 14 und 15 veranschaulicht, mit A und A' bzw. im zweiten Dimer mit B und B' bezeichnet. Die Dimer-Dimer Grenzfläche wird durch die parallel zueinander liegenden Helizes $\alpha 1(\prime)$ der Ketten A' und B der beiden Dimere aufgebaut (Abb. 14, 15). Ein $\Delta 19\omega_2$ bindet jeweils an eine Heptade.

Die zwei aufeinander folgenden Heptaden der $(\rightarrow\rightarrow)$ -DNA werden an beiden Seiten durch zusätzliche Basenpaare sowie die GC-Überhänge flankiert. Die Nummerierung der Basensequenz wurde entsprechend der üblichen Nomenklatur gewählt, so dass die Nummern vom 5'-Ende zum 3'-Ende aufsteigen. Wie in Abb. 14 illustriert, erhielt die erste Base der beiden aufeinander folgenden Heptaden die Nummer „1“. In Richtung des 5'-Endes sind die zusätzlich vorhandenen Basen mit 0, und -1 und in Richtung des 3'-Endes nach der letzten Base der zweiten Heptade mit 15, 16 und 17 beziffert.

3.3.2 Die Kristallstruktur von $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)/(\rightarrow\leftarrow)$

In der Kristallstruktur von $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)/(\rightarrow\leftarrow)$ konnte die freie $(\rightarrow\leftarrow)$ -DNA aufgrund lückenhafter Elektronendichte zum größten Teil nicht modelliert werden. In Abb. 14B sind alle modellierten Nucleotide angegeben. Die Zusammensetzungen der asymmetrischen Einheiten zeigen für beide Strukturen die gleichen DNA-DNA-Kontakte.

Auch die Struktur des Protein-DNA-Komplexes $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ ist der Struktur von $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ sehr ähnlich, und erst eine detaillierte Analyse der Repressor-DNA Kontakte führte Unterschiede zu Tage (vgl. Abb. 15A,C). Diese Unterschiede resultieren aus der palindromischen Anordnung der Heptaden und der dadurch vorhandenen pseudo- C_{2D} -Rotationsachse in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$, welche die beiden Dimer $\Delta 19\omega A/A'$ und $\Delta 19\omega B/B'$ und die jeweils gebundene Heptade ineinander überführt. Diese pseudo- C_{2D} -Rotationsachse fehlt in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ (Abb. 14, 15). Die Unterschiede zwischen den Komplexen werden ausführlich in Kap. 3.9 diskutiert.

3.3.3 Kristallpackung

3.3.3.1 Kristallpackung von $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)/(\rightarrow\rightarrow)$

Die pseudo-kontinuierlichen DNA-Stränge werden von DNA-Fragmenten gebildet, die in abwechselnder Reihenfolge zwei $\Delta 19\omega_2$ binden bzw. frei vorliegen. Daher sind die Kristalle, wie in der Abb. 14A schematisch und in Abb. 16A,B als Ausschnitte der Elementarzelle illustriert, schichtartig aufgebaut. Die Protein-DNA-Komplexe bilden entlang der a,b-Ebene der Elementarzelle Schichten und interagieren in dieser Ebene ausschließlich über Protein-Protein-Wechselwirkungen. Die Packung der Protein-DNA-Komplexe in dieser Ebene ist sehr dicht und der Solvensgehalt liegt bei 39% (berechnet mit dem halben Volumen der asymmetrischen Einheit und dem Molekulargewicht für $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$). In c-Richtung kommt es zur Ausbildung der bereits erwähnten pseudo-kontinuierlichen, fast linearen DNA-Stränge. Die freie DNA fungiert dabei wie eine Art Abstandshalter und verbindet zwei Protein-DNA-Schichten. Die freie DNA-Schicht besitzt ungewöhnlich große Zwischenräume und zeigt einen extrem hohen Solvensgehalt von 80% (Abb. 16A,B). Die asymmetrische Einheit entspricht einem Viertel der in rot eingezeichnete Elementarzelle und enthält einen Protein-DNA-Komplex der Stöchiometrie $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ sowie eine freie $(\rightarrow\rightarrow)$ -DNA. Der Gitterwinkel β von 109° wird durch die Orientierung der $(\rightarrow\rightarrow)$ -DNA in der Protein-DNA-Schicht vorgegeben. Weiterhin wird deutlich, dass die freie DNA nur an ihren Enden Kristallkontakte ausbildet, die dazwischen liegenden Basenpaare sind jedoch frei von Kristallkontakten und sollten deshalb ihre native Konformation einnehmen können (die Geometrie ist zusätzlich von der Zusammensetzung der Kristallisationslösung und weitreichenden Verzerrungen durch Kristallkontakte abhängig). Der Abstand zwischen zwei benachbarten freien $(\rightarrow\rightarrow)$ -Fragmenten beträgt mindestens 5 \AA , so dass Wassermoleküle die Phosphodiesterketten der DNA-Stränge über H-Brücken verbrücken könnten. Jedoch konnte in diesem Bereich weder für Wassermoleküle noch für eventuell koordinierte Kationen Elektronendichte beobachtet werden.

Im endgültigen Strukturmodell von $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)/(\rightarrow\rightarrow)$ zeigen die Basenpaare der freien DNA sehr hohe Temperaturfaktoren, die ausgehend von den DNA-DNA Kristallkontakten zur Mitte der freien $(\rightarrow\rightarrow)$ -DNA von 60 \AA^2 auf bis zu 100 \AA^2 zunehmen.

3.3.3.2 Die Kristallpackung von $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)/(\rightarrow\rightarrow)$

Kristalle in der monoklinen Raumgruppe $P2_1$ von $\Delta 19\omega$ -Repressor im Komplex mit $(\rightarrow\leftarrow)$ -DNA konnten unter ähnlichen Kristallisationsbedingungen wie $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)/(\rightarrow\rightarrow)$ (Raumgruppe C2) gezüchtet werden. Beide Kristallformen besitzen bis auf die doppelt so lange c-Achse der Kristallform C2 ähnliche Gitterkonstanten (siehe Tab. 8). Die Protein-Protein-Kristallkontakte in der Protein-DNA Ebene unterscheiden sich jedoch in beiden Kristallformen. Die pseudo-kontinuierlichen DNA-Stränge der Kristallform $P2_1$ verlaufen parallel zur a,c-Ebene, sind in der b,c-Ebene jedoch um 40° gegeneinander verkippt (vgl. Abb. 16C,D). Aufgrund dieser Geometrie sind die freien $(\rightarrow\leftarrow)$ -DNA-Fragmente weiter voneinander entfernt als die parallelen DNA-Stränge von $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)/(\rightarrow\rightarrow)$ in der Raumgruppe C2. Abb. 16D zeigt außerdem die spärliche Elektronendichte in der Schicht der freien $(\rightarrow\leftarrow)$ -DNA, die größtenteils nicht modelliert werden konnte. Die wenigen modellierten Basenpaare (Abb. 14B) zeigten nach der Verfeinerung sehr hohe B-Faktoren bis 100 \AA^2 . Die „Restelektronendichte“ in Abb. 16D zeigt eindeutig den Verlauf der nicht modellierten freien $(\rightarrow\leftarrow)$ -DNA, so dass auch in der Struktur von $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)/(\rightarrow\leftarrow)$ pseudo-kontinuierliche DNA-Stränge ausgebildet werden.

Die Frage warum für $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)/(\rightarrow\rightarrow)$ alle Nucleotide der freien DNA modelliert werden konnten und für $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)/(\rightarrow\leftarrow)$ die freie DNA fast vollständig fehlgeordnet vorliegt, kann möglicherweise auf die großen Abstände der freien $(\rightarrow\leftarrow)$ -DNA-Stränge zurückgeführt werden. Der relative kurze Abstand von 5 \AA in der Kristallform C2 lässt möglicherweise Wasser- oder Kationen-vermittelte Interaktionen zu (Kap. 3.3.1.2), während dies in der Kristallform $P2_1$ infolge des Mindestabstands zwischen zwei freien $(\rightarrow\leftarrow)$ -DNA-Strängen von $\sim 10 \text{ \AA}$ nicht möglich ist. Wahrscheinlich kann die Helixachse der freien $(\rightarrow\leftarrow)$ -DNA leicht in alle Richtungen gebogen werden. In diesem Zusammenhang spielen die unterschiedlichen Auflösungen der Strukturen von $2,45 \text{ \AA}$ für $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)/(\rightarrow\rightarrow)$ und $2,6 \text{ \AA}$ für $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)/(\rightarrow\leftarrow)$ sicher eine untergeordnete Rolle.

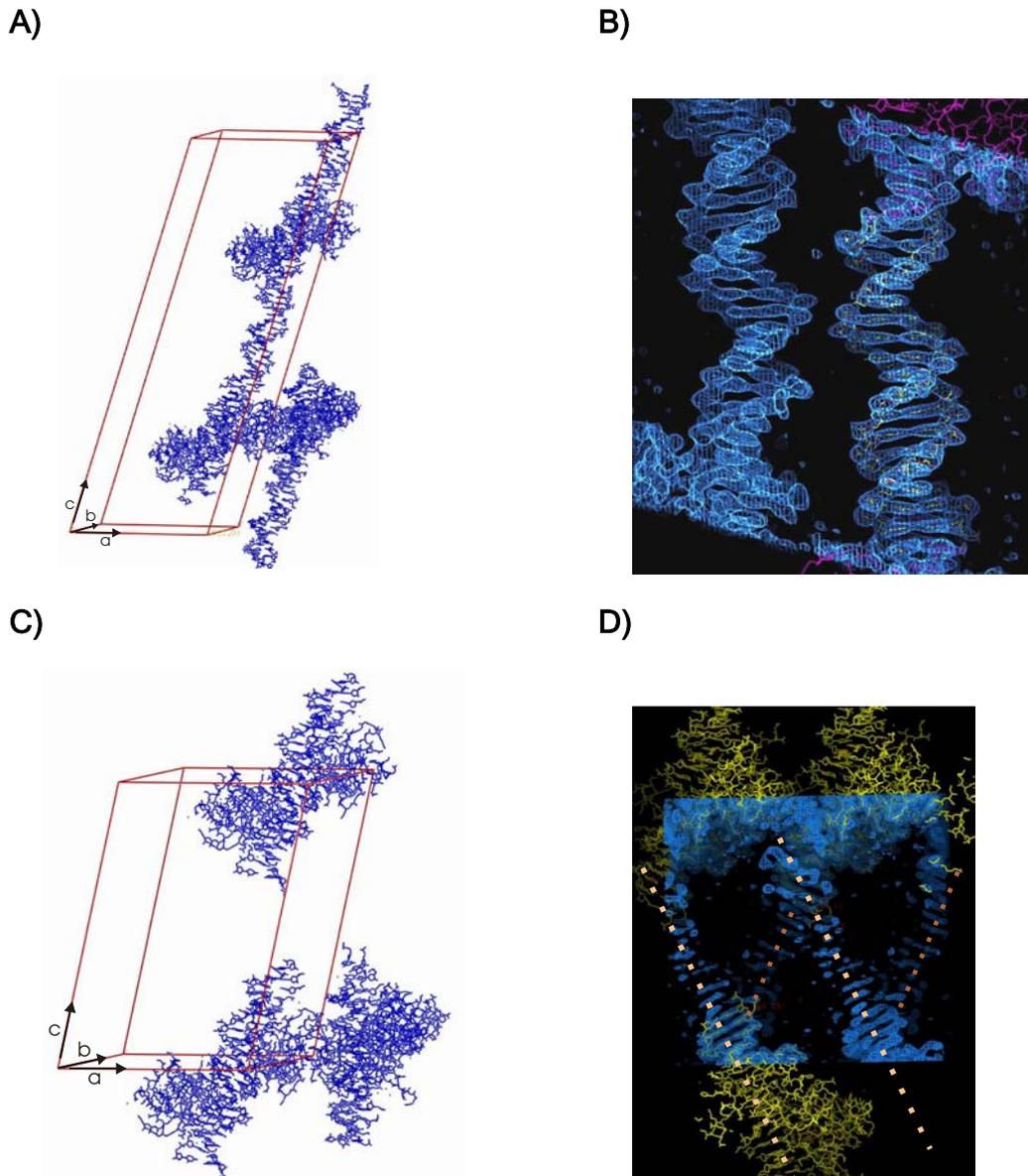


Abbildung 16 Kristallpackungen der Strukturen von $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)/(\rightarrow\rightarrow)$ und $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)/(\rightarrow\leftarrow)$. Die kristallographischen (Schrauben)-Achsen verlaufen parallel zur b-Richtung.

(A) Der Komplex $\Delta 19\omega-(\rightarrow\rightarrow)$ kristallisierte in der Raumgruppe C_2 , die Elementarzelle ist rot eingezeichnet, die asymmetrische Einheit besteht aus einem Viertel der Elementarzelle ($a/2 \times b/2 \times c$) und enthält einen Protein-DNA-Komplex der Stöchiometrie $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ sowie ein freie $(\rightarrow\rightarrow)$ -DNA (Inhalt von drei asymmetrischen Einheiten mit blauen Stabmodellen dargestellt).

(B) Die Kohlenstoff-Atome der freien $(\rightarrow\rightarrow)$ -DNA sind gelb eingefärbt. „Oben“ und „unten“ schließen sich über DNA-DNA-Kontakte die violett eingefärbten Komplexe $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ an. Im linken Teil wird die bei $1,3 \sigma$ konturierte $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ Elektronendichte ohne Modell für die freie DNA gezeigt. Die beiden Stränge nähern sich in der „Mitte“ der Abbildung auf $\sim 5 \text{ \AA}$.

(C) Die Kristallpackung der Struktur $\Delta 19\omega-(\rightarrow\leftarrow)$ in der Raumgruppe $P2_1$. Die rot gezeichnete Elementarzelle beinhaltet zwei asymmetrische Einheiten, die jeweils einen Protein-DNA-Komplex der Stöchiometrie $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ sowie eine freie $(\rightarrow\leftarrow)$ -DNA enthalten, von der nur die Enden modelliert werden konnten (Inhalt von drei asymmetrischen Einheiten in blau dargestellt).

(D) Die bei $1,0 \sigma$ konturierte $2F_o-F_c$ Elektronendichte zeigt spärliche Dichte für die freie DNA, die Verläufe der 40° gegeneinander geneigten pseudo-kontinuierlichen $(\rightarrow\rightarrow)$ -DNA-Stränge sind jedoch erkennbar (gestrichelte Linien).

3.3.4 Die freie DNA ermöglicht den Aufbau des Kristallgitters

Der Grund für das Vorkommen freier DNA in den Kristallstrukturen liegt an der Ausbildung unendlicher DNA-Stränge und damit verbunden an der geometrisch vorgegebenen, unterschiedlichen Orientierung der DNA-Fragmente in den beiden Schichten. Da unter den verwendeten Kristallisationsbedingungen mit 2 M Malonat als Fällungsmittel häufig sehr dünne Plättchen beobachtet wurden, ist wahrscheinlich, dass die dicht gepackte Protein-DNA-Schicht bevorzugt wächst. Durch die Bindung an die $\Delta 19\omega$ -Dimere sind die DNA-Fragmente und ihre Orientierungen zueinander innerhalb dieser Schicht fixiert. Des Weiteren ist der DNA-DNA-Kontakt mit den beiden Basentriplets sehr rigide und sorgt für eine fixierte Orientierung der freien DNA relativ zur Orientierung der DNA in der Protein/DNA-Schicht. Würden nun $\Delta 19\omega$ -Dimere an die Heptaden der freien DNA binden, könnten nicht die gleichen Protein-Protein-Kontakte wie in der darunter liegenden Protein-DNA-Schicht ausgebildet werden. Da die Positionen der $\Delta 19\omega$ -Dimere auf der DNA durch die Positionen der Heptaden vorgegeben sind, überschneidet sich der Raum, der für die Repressoren benötigt würde, mit dem Raum, der bereits durch benachbarte freie DNA ausgefüllt wird. Um alle freien DNA-Enden der Protein/DNA Schicht zu besetzen, müssten erst die Repressoren abdiffundieren. Hingegen lässt der zweite durch Basenstapelung vermittelte DNA-DNA-Kontakt mehr Spielraum für die Orientierung der DNA-Stränge zueinander (vgl. Kap 3.7.2).

Dieser ungewöhnliche Kristallaufbau hat in beiden Strukturen einen sehr hohen Solvensgehalt von ~69 % zur Folge.

3.4 Die Proteinketten in $\Delta 19\omega$ -DNA-Komplexen

Die $2F_o - F_c$ Elektronendichte des endgültigen Modells von $[\Delta 19\omega_2]_2(-\rightarrow\rightarrow)$ zeigt die Proteinketten der beiden Dimeren A/A' und B/B' in unterschiedlichem Ausmaß. Die N-Termini der Ketten A' und B sind an Protein-Protein-Kristallkontakten beteiligt und infolgedessen fixiert, so dass alle Reste (19-71) beider Ketten modelliert werden konnten. Die N-Termini der Ketten A und B' hingegen sind dem Solvens ausgesetzt und nur die Reste (23-71) bzw. (25-71) konnten in die Elektronendichte modelliert werden. Abb. 15 kann die Bezeichnung der Ketten A, A' und B, B' entnommen werden. Die N-terminalen Reste 21-24 der Ketten A' und B sind α -helikal strukturiert (siehe Abb. 15).

Aufgrund der anderen Protein-Protein-Kontakte in der Kristallstruktur von $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)/(\rightarrow\leftarrow)$ gegenüber $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)/(\rightarrow\rightarrow)$ konnte kein N-Terminus der Proteinketten vollständig modelliert werden. Für das Dimer A/A' wurden die Aminosäuren 22-71 modelliert, während die Reste 25-71 für die Kette B und die Reste 20-71 für B' modelliert wurden (siehe Abb. 15C).

Dies könnte aufgrund der erwähnten Kristallkontakte ein Artefakt der Kristallisation sein oder aber ein Hinweis darauf sein, dass der N-Terminus auch *in vivo* α -helikal strukturiert ist. Außerdem zeigen die N-Termini der Proteinketten in der Struktur von $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ von der DNA weg (Kap. 3.4.1), so dass Wechselwirkungen der intakten N-Termini mit der DNA nicht wahrscheinlich sind. Eine Sekundärstruktur-Vorhersage für den ω -Repressor mit dem Programm PROF (Rost *et al.*, 2004) schlägt für die Aminosäuren 21-23 ebenfalls eine α -Helix vor, jedoch mit eingeschränkter Verlässlichkeit. Die vollständige Sekundärstruktur-Vorhersage in Abb. 17 sagt zudem für die Reste 12-18 mit großer Wahrscheinlichkeit eine Schlaufenregion voraus. Für die 12 N-terminalen Reste ist die Sekundärstrukturvorhersage wenig verlässlich. Des Weiteren zeigt die Vorhersage des Programms PROF für die Zugänglichkeit der Aminosäuren zu Solvensregionen, dass die 30 N-terminalen Reste wahrscheinlich dem Solvens ausgesetzt sind und Val30 ist der Erste Rest, der wahrscheinlich nicht Solvens-zugänglich ist. Diese Vorhersage stimmt mit der Struktur des freien $\Delta 20\omega_2$ überein, in der Val30 tatsächlich die erste verdeckte Seitenkette besitzt.

Fasst man die Ergebnisse der Kristallstrukturen und der Sekundärstruktur-Vorhersage in Abb. 17 zusammen, liegt der gesamte N-Terminus bis zur 19. Aminosäure wahrscheinlich ungefaltet vor und tritt weder zur RHH-Domäne noch zur gebundenen DNA in Wechselwirkung.

Nebenbei bemerkt wird für die in den Kristallstrukturen des freien $\Delta 20\omega_2$ und den $\Delta 19\omega$ -DNA-Komplexen beobachtete Helix $\alpha 1$ (Reste 34 bis 47) mit dem Programm PROF fälschlicherweise ein kurzer β -Strang vorhergesagt.

Wird das A/A' Dimer des Komplexes $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ durch die pseudo- C_{2D} -Rotationsachse (rote Ellipse in Abb. 15A) in das B/B'-Dimer überführt, zeigen die überlagerten $C\alpha$ -Atome eine rms Abweichung von $0,6 \text{ \AA}$ (Abb. 18). Insbesondere in der Region des β -Faltblatts und in der Schlaufenregion (46-51) zwischen den Helizes $\alpha 1$ und $\alpha 2$ werden erhebliche Abweichungen von $\sim 1 \text{ \AA}$ beobachtet (Abb. 18). Erfolgt die Überlagerung von A/A' auf B/B' hingegen durch Translation um 7-bp und anschließende $7/10$ Rotation, die auch die Heptaden ineinander überführen, so fällt die rms Abweichung mit $0,3 \text{ \AA}$ deutlich geringer aus (Abb. 18).

Werden nun die beiden Dimere des $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ -Komplexes durch die pseudo- C_{2D} -Rotationsachse ineinander überführt, wird ebenfalls eine rms Abweichung für die überlagerten $C\alpha$ -Atome von $0,3 \text{ \AA}$ gemessen, d. h., dass in beiden Komplexen die beiden Dimere sehr gut überlagern, wenn die Orientierung der gebundenen Heptade übereinstimmt. Wie durch eine Analyse der Repressor-DNA-Kontakte in Kap. 3.5 bestätigt wird, erfolgt die Bindung von $\Delta 19\omega_2$ an DNA asymmetrisch, und dies ist die Erklärung für die unterschiedliche rms Abweichung in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$.

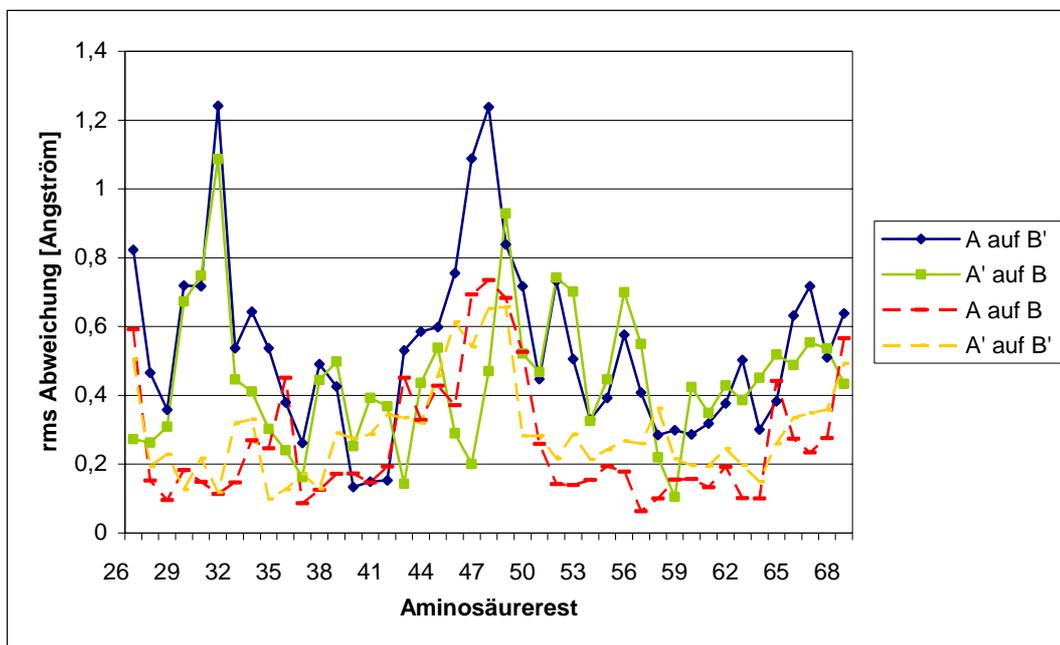


Abbildung 18 Überlagerung der $\Delta 19\omega$ -Dimere A/A' und B/B' in der Struktur $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$. Die rms Abweichung für die Überlagerung der $C\alpha$ -Atome der Reste 26-68 der jeweiligen Ketten ist aufgetragen. In grün/blau sind die Abstände der $C\alpha$ -Atome dargestellt, wenn Dimer A/A' auf B'/B überlagert wird. Die Dimere werden dabei durch die pseudo- C_{2D} -Rotationsachse im Dimer-Dimer Kontakt überlagert. In orange/rot sind die Abstände für die Überlagerung A/A' auf B/B' dargestellt, dies entspricht einer Translation um 7-bp und $7/10$ -Rotation um die Helixachse. Die Überführung durch Rotation/Translation zeigt deutlich geringere rms Abweichungen als durch die pseudo- C_{2D} -Rotationsachse.

3.4.3 Vergleich zwischen freiem und DNA-gebundenem Repressor

3.4.3.1 Strukturvergleich von freiem und DNA-gebundenem ω -Repressor

Mit dem Programm DSSP (Kabsch und Sander, 1983) wurden die Sekundärstrukturenelemente der Kristallstrukturen des freien $\Delta 20\omega_2$ und der $\Delta 19\omega$ -Dimere in den $\Delta 19\omega$ -DNA-Komplexen bestimmt. Da keine Änderungen der Topographien der N-terminal verkürzten ω -Repressoren festgestellt wurden, ist diese Analyse nicht gezeigt.

Anhand der Überlagerung der $C\alpha$ -Atome der $\Delta 19\omega$ -Ketten B/B' auf den freien Repressor $\Delta 20\omega_2$ (Abb. 19) wird deutlich, dass die Bindung an DNA mit geringen Konformationsänderungen der $\Delta 19\omega$ -Dimere verbunden ist. Wie für alle RHH-Repressoren beobachtet (siehe Einleitung), besitzt auch der ω -Repressor eine rigide Kerndomäne mit niedrigen kristallographischen B-Werten. Diese Kerndomäne besteht aus dem β -Faltblatt und den Helizes α_2 , und die Überlagerung in Abb.19 zeigt nur geringe Abweichungen für diese Region. Demgegenüber zeigen die Helizes α_1 und insbesondere die anschließenden Schlaufenregionen (48-50) hohe Temperaturfaktoren in Abwesenheit von DNA. Diese Schlaufenregionen werden infolge der DNA-Bindung fixiert, und damit verbunden werden niedrigere Temperaturfaktoren als für $\Delta 20\omega_2$ gefunden.

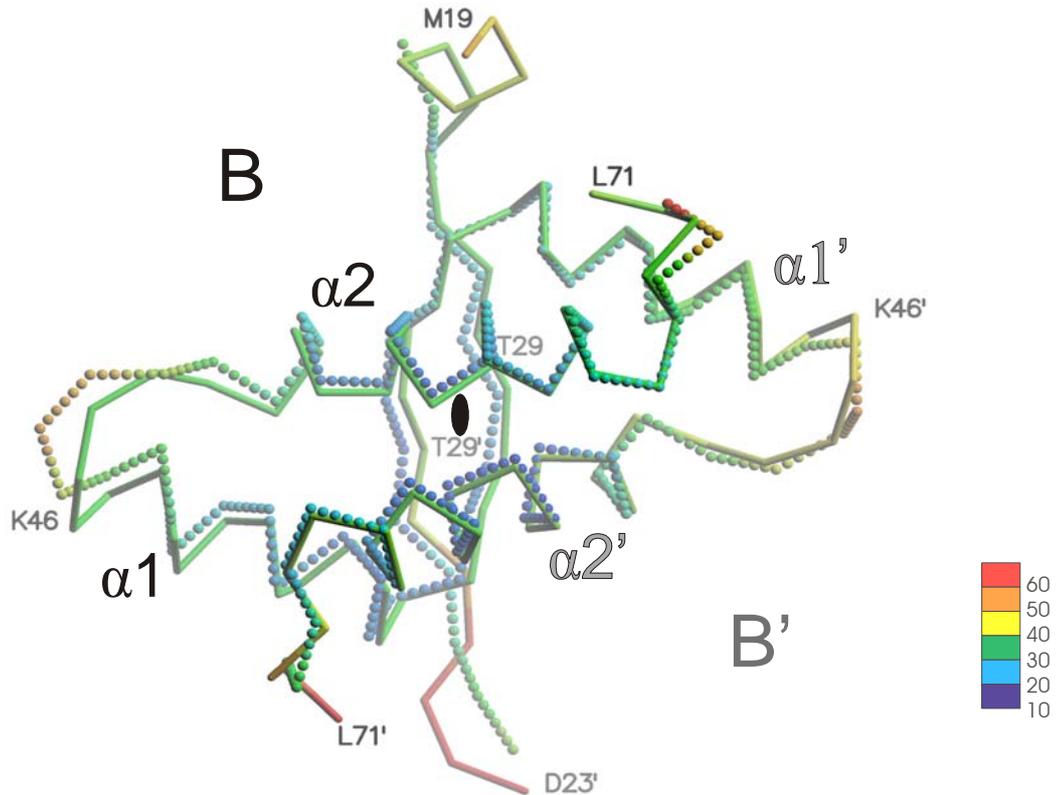


Abbildung 19 Überlagerte Verläufe der α -Rückgrate von $\Delta 20\omega_2$ (Kugeln) und $\Delta 19\omega_2$ B/B' gebunden an ($\rightarrow\rightarrow$) (durchgehende Linie). Die Verläufe sind anhand einer B-Faktor-Skala eingefärbt, welche grob das Ausmaß der Rigidität der einzelnen Proteinteile in der Kristallstruktur wiedergibt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die B-Faktoren von $\Delta 20\omega_2$ auf die durchschnittlichen B-Werte des DNA-gebundenen $\Delta 19\omega_2$ skaliert. Signifikante Abweichungen zwischen der freien und der DNA-gebunden Form des ω -Repressors liegen an den N- und C-Termini sowie im Schlaufenbereich, der die Helizes $\alpha 1$ und $\alpha 2$ verbindet.

In Abb. 20 werden die rms Abweichungen für die Überlagerung der α -Atome des freien Repressors $\Delta 20\omega_2$ auf die des $\Delta 19\omega$ -Dimers B/B' graphisch wiedergegeben. Die den Monomer-Monomer-Kontakt vermittelnden Helizes $\alpha 2$ und $\alpha 2'$ überlagern sehr gut. Auch Helix $\alpha 1$ der Kette B von $\Delta 19\omega_2$ zeigt nur geringe Verschiebungen, während $\alpha 1$ und die anschließende Schlaufenregion der Kette B' erhebliche Konformationsänderungen aufweisen. Dass die Ketten B und B' und dementsprechend auch die Ketten A und A' unterschiedlich starke Konformationsänderungen gegenüber dem freien Repressor zeigen, ist auf die asymmetrische Bindung von $\Delta 19\omega_2$ an die Heptade zurückzuführen. Das zweisträngige verdrehte β -Faltblatt, welches in die große Furche der DNA eingelagert wird, zeigt

Abweichungen von $\sim 0,8 \text{ \AA}$ für beide Ketten (Abb. 20), so dass bei der Bindung an die Heptade die für die spezifische Basenerkennung verantwortlichen Reste Thr29 und Arg31 optimal zu den jeweiligen Basen orientiert werden (Abb. 23). Werden die Ketten B und B' der beiden $\Delta 19\omega_2$ des Komplexes $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ mit $\Delta 20\omega_2$ überlagert, werden für das β -Faltblatt und die Schlaufenregion (46 - 50) rms Abweichungen von $0,8 \text{ \AA}$ bzw. $1 - 2,5 \text{ \AA}$ beobachtet.

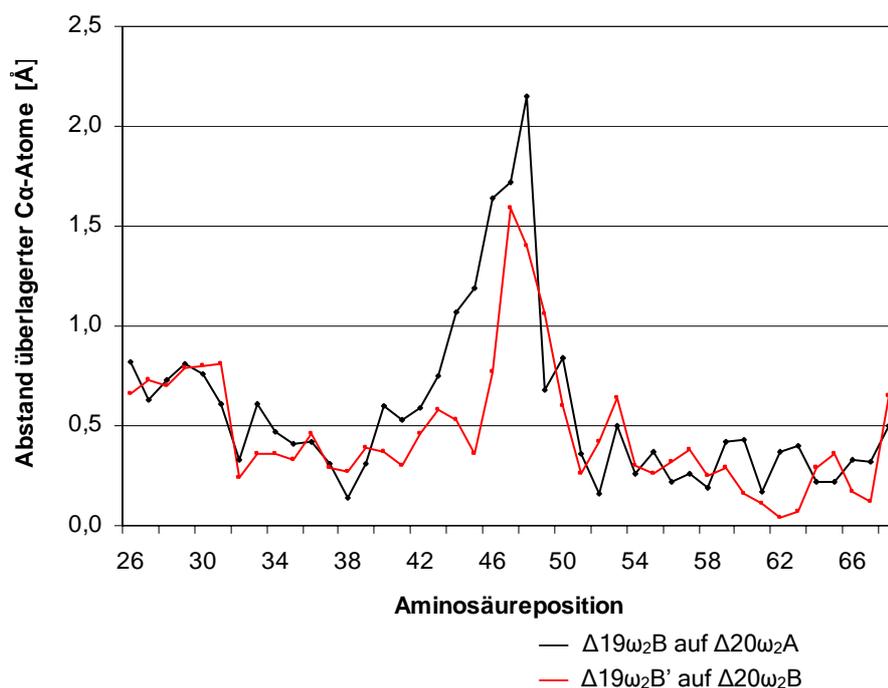


Abbildung 20 Abstandsdifferenzen überlagerter C α -Atome der Proteinketten von DNA-gebundenem $\Delta 19\omega B/B'$ und freiem $\Delta 20\omega_2$. Die beiden Ketten $\Delta 19\omega B/B'$ des Komplexes $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ sind mit den Ketten A bzw. B von freiem $\Delta 20\omega_2$ überlagert. Die rms Abweichung beträgt $0,77 \text{ \AA}$. Dabei besitzen C α -Atome des β -Faltblatts und der Schlaufenregion (48-50) erhöhte rms Abstände von $0,8 \text{ \AA}$ bzw. $1-2,5 \text{ \AA}$. Die unterschiedlichen Abstände der beiden Ketten, insbesondere in der Schlaufenregion (48-50) sind auf die asymmetrische Bindung von $\Delta 19\omega B/B'$ an die Heptade zurückzuführen. Für die Überlagerung der Ketten A und B des freien $\Delta 20\omega_2$ wird eine rms Abweichung von $0,38 \text{ \AA}$ errechnet, so dass es für die gezeigte Abbildung eine untergeordnete Rolle spielt, mit welcher Kette von $\Delta 20\omega_2$ die Überlagerung durchgeführt wird.

3.5 Repressor-Operator Kontakte

An der DNA-Bindung sind drei Bereiche des $\Delta 19\omega$ -Repressors beteiligt:

1. Die β -Stränge (Lys28, Thr29, Arg31), wobei Thr29 und Arg31 als einzige Reste Kanten von Basenpaaren in der großen Furche erkennen. Lys28 hingegen bindet an das DNA-Rückgrat.
2. Reste der Helix $\alpha 1$ (His37, Lys41) binden an das DNA-Rückgrat.
3. Reste der N-terminalen Region von Helix $\alpha 2$ (Asn50, Val51, Lys52) interagieren ebenfalls mit dem DNA-Rückgrat.

Die Beschreibung der Wechselwirkungen zwischen $\Delta 19\omega$ -Dimeren und den Heptaden beschränkt sich in diesem Kapitel auf das Dimer B/B' und seine gebundene Heptade im Komplex $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$, weil für die Bestimmung der Struktur $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)/(\rightarrow\rightarrow)$ die besseren Röntgendaten vorliegen und die Geometrien der gebundenen Heptade des Dimers A/A' durch den benachbarten Kristallkontakt mit den beiden Basentriplets verzerrt werden. Die Abstände sowohl polarer als auch hydrophober Protein-DNA-Kontakte zwischen den Dimeren B/B' und den jeweils gebundenen Heptaden in den Strukturen $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)/(\rightarrow\rightarrow)$ und $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)/(\rightarrow\leftarrow)$ sind im Anhang 6.1 bzw. 6.2 verzeichnet. Abb. 22 zeigt schematisch alle polaren Protein-DNA-Interaktionen sowie durch Wassermoleküle vermittelte Protein-DNA-Kontakte.

Direkte Kontakte zu DNA-Basen

Die Seitenketten von Thr29 und Arg31 des β -Faltblatts kontaktieren Kanten von Basenpaaren in der großen Furche der DNA (siehe Abb. 21, 22). Im Einzelnen bindet die Hydroxyl-Gruppe Thr29O γ über H-Brücken an O6 und N7 von G4' bzw. Thr29'O γ zu N4 von C11. Die Stickstoffatome N ϵ und N η von Arg31 gehen H-Brücken mit O6 und N7 von G2' ein. Das zweite Arg31' der Untereinheit B' kontaktiert die DNA nicht direkt, sondern bildet mit N ϵ eine H-Brücke zu Thr29O γ , während N η 1 von Arg31' über je ein Wassermolekül an G4' und an A5' bindet und N η 2 über ein Wassermolekül mit A9 in Kontakt steht (Abb. 21, 22).

Die Van-der-Waals Oberfläche des β -Faltblatts passt nicht perfekt auf die Oberfläche der großen Furche und hinterlässt so Raum, um Wassermoleküle eintreten

zu lassen. Insgesamt konnten bei der gegebenen Auflösung von 2,45 Å sieben geordnete Wassermoleküle eingeeignet zwischen der Oberfläche des Dimers B/B' und der gebundenen Heptade verlässlich zugewiesen werden (Abb. 22).

Kontakte zum DNA-Rückgrat

In der zweiten Kontaktregion interagieren die durch eine Helixwindung getrennten Reste Lys41 und His37 mit Phosphatgruppen der DNA. Dabei interagieren das positiv geladene Lys41N ζ und His37N ϵ mit der 5'-Phosphatgruppe von T10. Entsprechend kontaktieren Lys41'N ζ und His37'N ϵ der Untereinheit B' die 5'-Phosphatgruppe von T3'.

Die dritte Kontaktregion bildet der N-Terminus der Helix α_2 , welche durch die Phosphatgruppe von A9 „verschlossen“ wird, indem H-Brücken mit den Peptid-NH-Gruppen der Reste Val51 und Lys52 ausgebildet werden. Entsprechende Reste der Untereinheit B' kontaktieren die 5'-Phosphatgruppe von G2'.

Dieser „Verschluss“ von Helix-N-Termini durch Phosphatgruppen wurde auch für die anderen RHH-Repressoren der MetJ/Arc-Überfamilie sowie für nicht verwandte DNA-bindende Proteine mit HTH-Motiv wie z. B. CAP beobachtet (Schultz *et al.*, 1991). Die bevorzugte Bindung kann auf den elektropositiven Charakter der N-Termini von α -Helizes zurückgeführt werden. Dieser elektropositive Charakter wird durch das allgemeine Dipolmoment einer α -Helix hervorgerufen (Hol *et al.*, 1978).

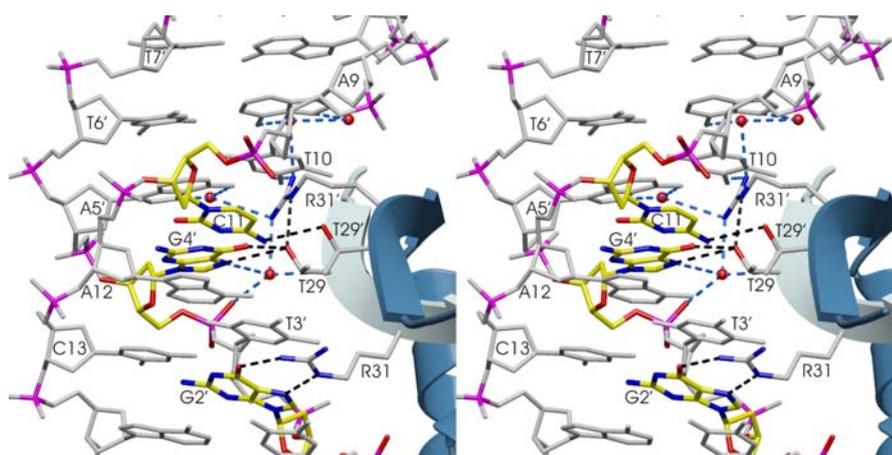


Abbildung 21 Stereoabbildung der spezifischen Interaktionen zwischen dem $\Delta 19\omega$ -Dimer B/B' und der gebundenen Heptade A8-A14 der ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA. Wassermoleküle sind als rote Kugeln und H-Brücken durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die Kohlenstoffatome der direkt kontaktierten Basen C11, G2' und G4' sind gelb dargestellt.

Zusätzlich bindet nur Lys28 der Untereinheit B mit N ζ an die 5'-Phosphatgruppe von G4', während Lys 28' der Untereinheit B' mehr als 5 Å Abstand zur nächsten Phosphatgruppe von C11 aufweist. Somit wird auch das DNA-Rückgrat der Heptade asymmetrisch von $\Delta 19\omega_2$ kontaktiert.

Zusätzliche Wasser-vermittelte Kontakte

Die genannten Protein-DNA-Interaktionen werden für jedes $\Delta 19\omega$ -Dimer der beiden Komplexe $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ und $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ beobachtet, doch sind die Wasser-vermittelten Interaktionen für jedes Repressor-Dimer und seine gebundene Heptade verschieden (Abb. 22). Die Unterschiede in der DNA-Bindung zwischen den Dimeren A/A' und B/B' können dabei teilweise auf die durch die Basentriplets induzierten Verzerrungen in der ersten Heptade zurückgeführt werden (Kap. 3.6).

Unterschiede bezüglich der Wasser-vermittelten Protein-DNA-Interaktionen zwischen den Komplexen $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ und $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ können natürlich auf strukturelle Unterschiede zurückgeführt werden (Kap. 3.9). Aber auch die unterschiedlichen Auflösungslimits der Röntgendaten von 2,45 Å für die Struktur von $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)/(\rightarrow\rightarrow)$ bzw. 2,6 Å für $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)/(\rightarrow\leftarrow)$ sowie die verschiedenen Kristallkontakte in beiden Strukturen könnten die unterschiedliche Anzahl koordinierter Wassermoleküle erklären.

Die oben genannten Wasser-vermittelten Interaktionen des Arg31' zu A9, C4' und A5' werden ergänzt durch H-Brücken von Thr29'O, das über zwei Wassermoleküle an die 5'-Phosphatgruppen von A9 und T10 bindet. Zusätzlich wird Thr29O der Untereinheit B durch ein ein Wassermolekül mit T3' verbunden, und ThrO γ ,N koordinieren das bereits genannte Wassermolekül, das mit G4' und Arg31' interagiert. Schließlich koordiniert die Peptid-NH-Gruppe von Arg31 ein Wassermolekül, welches wiederum in Kontakt zu G2' steht.

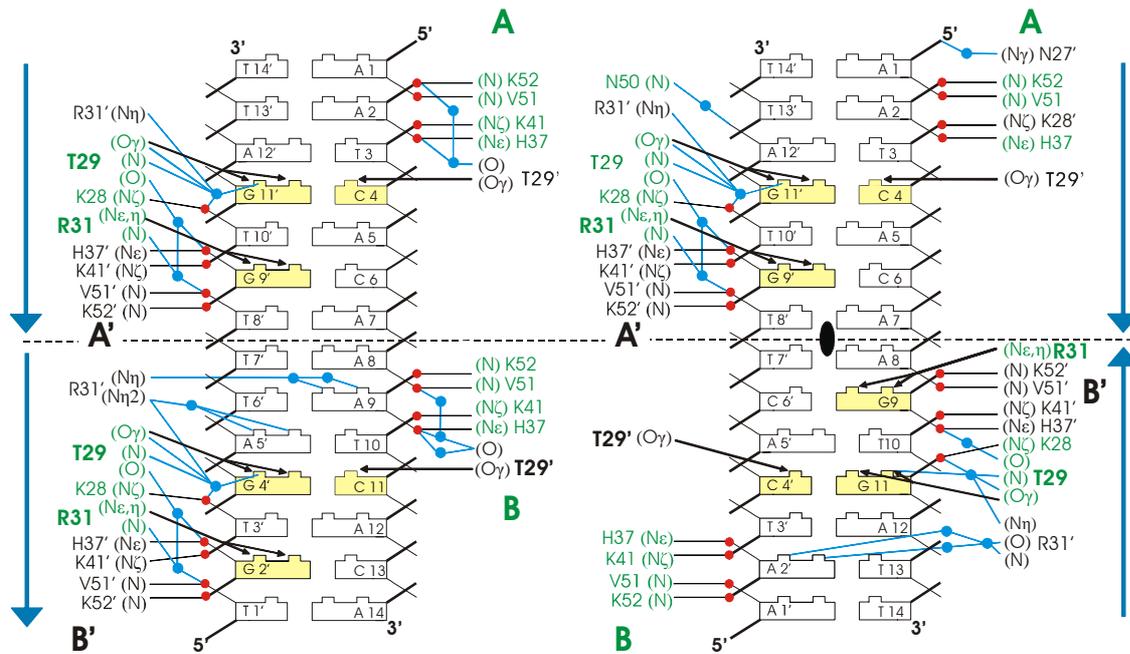


Abbildung 22 Schematische Darstellung der Repressor-DNA-Kontakte in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ (links) und in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ (rechts).

Die Heptaden und ihre Orientierung werden durch große blaue Pfeile angezeigt. Spezifisch mit $\Delta 19\omega_2$ interagierende Nucleotid-Basen sind gelb dargestellt. Steuern Proteinketten die gleichen Reste zur DNA-Erkennung bei, teilen sie dieselbe Farbe: grün für die Ketten A, B und schwarz für A', B'. Interaktionen zu (roten) Sauerstoffatomen der Phosphate werden durch schwarze Linien angezeigt, während spezifische H-Brücken zu den Nucleotid-Basen in der großen Furche durch schwarze Pfeile markiert werden. Blaue Linien illustrieren wasser vermittelte H-Brücken, wobei blaue Punkte die Wassermoleküle repräsentieren. Lys28 und Arg31 der Ketten A, B zeigen ein anderes Interaktionsmuster als die entsprechenden Reste der Ketten A', B'. Die Interaktionsmuster für jedes $\Delta 19\omega_2$ und die zugehörige Heptade sind grundsätzlich gleich, wenn die gebundenen Heptaden in die gleiche Richtung deuten.

3.5.1 Die Interaktionsmuster für die $\Delta 19\omega_2$ -gebundenen Heptaden

Alle untersuchten Kontakte zwischen den $\Delta 19\omega$ -Dimeren und den Heptaden in $(\rightarrow\rightarrow)$ und $(\rightarrow\leftarrow)$ zeigen die gleichen spezifischen Protein-DNA-Interaktionen. In Abb. 23 werden die Reste von Thr29 und Arg31 beider Untereinheiten des Dimers und die kontaktierten Nucleotid-Basen in verschiedenen Perspektiven dargestellt. Die Konformationen der vier Reste sind in allen vier strukturell bestimmten und jeweils an eine DNA-Heptade gebundenen $\Delta 19\omega$ -Dimeren gleich.

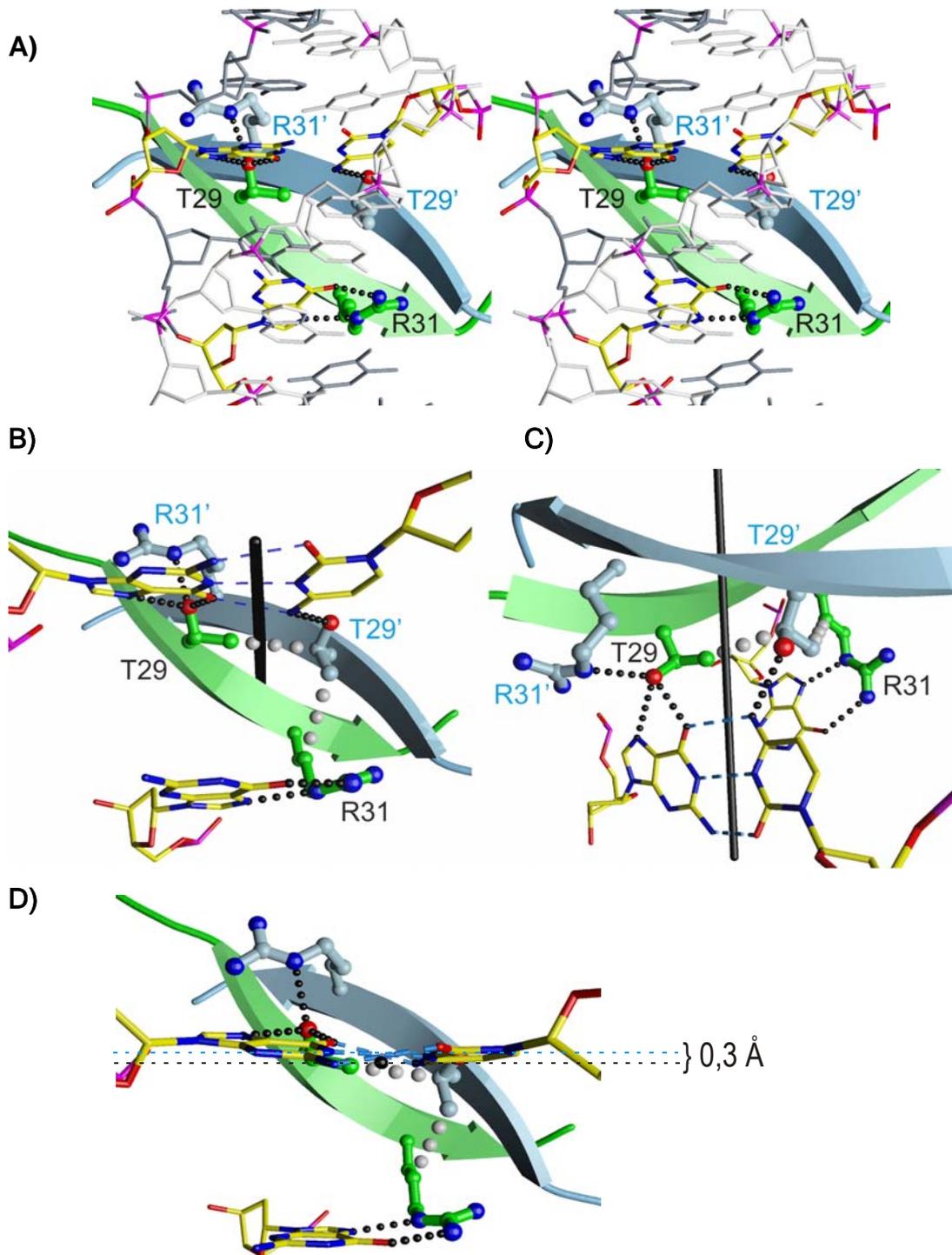


Abbildung 23 (A) Stereoabbildung der spezifischen Interaktionen der Reste Thr29(′) und Arg31(′) des Dimers B/B′ mit DNA-Basen. Die Konformationen der Reste sind in allen $\Delta 19\omega_2$ -DNA-Grenzflächen vergleichbar und sorgen für die asymmetrische Erkennung der Heptaden. Thr29O γ bildet eine H-Brücke mit Arg31′N ϵ , und die Methylgruppe von Thr29 steht in van-der-Waals Kontakt zu Thr29′C β , dessen Methylgruppe wiederum Arg31C γ und C δ kontaktiert. Dadurch wird die Guanidinium-Gruppe von Arg31 aus der Mitte des β -Faltblatts herausgedrängt und kann an G2′ binden.

(B) Perspektivische Darstellung mit Blick entlang der pseudo-C $_{2M}$ -Rotationsachse (schwarzer Stab) zur Verdeutlichung der hydrophoben Kontakte (graue Kugeln) zwischen Thr29(′) und Arg31. (C) Darstellung aus (B) mit Blick senkrecht zur pseudo-C $_{2M}$ -Rotationsachse.

(D) Blick exakt entlang der pseudo-C $_{2M}$ -Rotationsachse (schwarzer Punkt), die die DNA-Helixachse 0,3 Å stromabwärts des zentralen C11-G4′-Basenpaares schneidet.

Im Detail deuten die beiden Thr29(')O γ -Atome in Richtung des Arg31', das keine direkten Interaktionen zu den Nucleotid-Basen bildet. Stattdessen bindet Arg31'N ϵ über eine H-Brücke an Thr29O γ , so dass die Methylgruppe von Thr29 in van-der-Waals-Kontakt zu Thr29'C β steht (Abb. 23A-C). Die Methylgruppe von Thr29' wiederum drängt die Guanidinium-Gruppe von Arg31 aus dem Zentrum des β -Faltblatts heraus und ermöglicht so die Bindung von Arg31 an G2' (Abb. 23). Die beobachtete Anordnung der Reste lässt jeweils polare und unpolare Bereiche der Seitenketten miteinander interagieren und sorgt für eine dichte, das Lösungsmittel ausschliessende Packung. Die resultierende Orientierung der beiden Thr29(')O γ zur selben Seite des β -Faltblatts und ihre Bindung an das zentrale CG-Basenpaare der Heptade hat zur Folge, dass die pseudo-C 2_M -Rotationsachsen der $\Delta 19\omega$ -Dimere die DNA-Helixachse nicht auf Höhe des zentralen CG-Basenpaare der Heptade passieren, sondern 0,3 Å stromabwärts (Richtung 3'-Ende der Heptade 5'-AATCACA-3').

Wenn die $\Delta 19\omega$ -Dimere nicht zentral an die Heptaden binden, müssten verschiedene Anordnungen der Heptaden wie in ($\rightarrow\rightarrow$) und ($\rightarrow\leftarrow$) Einfluss auf die Abstände benachbarter, gebundener Dimere ausüben. Tatsächlich werden unterschiedliche Abstände zwischen den Dimeren in den Strukturen von $\Delta 19\omega$ -($\rightarrow\rightarrow$) und $\Delta 19\omega$ -($\rightarrow\leftarrow$) beobachtet. Die Konsequenzen werden in Kapitel 3.9 eingehend erörtert.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Affinität der Repressor-Operator-Komplexe aus der Verdrängung von Wassermolekülen und Ionen aus der Protein-DNA Grenzfläche sowie aus der Ausbildung einer großen Anzahl von H-Brücken und Salzbrücken-Interaktionen resultiert. Die kooperative Bindung von zwei Repressor-Dimeren verdrängt zusätzlich Lösungsmittelmoleküle in der Dimer-Dimer Grenzfläche und erhöht so die Grenzfläche des [$\Delta 19\omega_2$] $_2$ -($\rightarrow\rightarrow$) Komplexes insgesamt auf 1600 Å². Dieser Wert liegt im Rahmen der anderen RHH-Repressor-Operator-Komplexe. So zeigt der der MetJ-Operator-Komplex, der ebenfalls zwei MetJ-Dimeren enthält, eine vergleichbar große Grenzfläche von 1732 Å² (Somers und Phillips, 1992).

3.5.2 Das Oberflächenpotential von $\Delta 19\omega_2$ gebunden an ($\rightarrow\rightarrow$)

Vier von sieben der an Protein-DNA-Kontakten beteiligten Aminosäuren sind positiv geladen. Damit ist auch die Protein-DNA-Grenzfläche überwiegend positiv geladen (Abb. 24). Um die auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruhenden Repressor-DNA Kontakte zu veranschaulichen, sind in Abb. 24 die Moleküloberflächen der beiden an ($\rightarrow\rightarrow$) gebundenen $\Delta 19\omega_2$ entsprechend dem berechneten elektrostatischen Oberflächenpotential eingefärbt. Im Bereich des Dimer-Dimer-Kontaktes in der Mitte der Abbildung binden die blau eingefärbten Seitenketten von Lys41(′) die 5′-Phosphatgruppen von A9 und T10′.

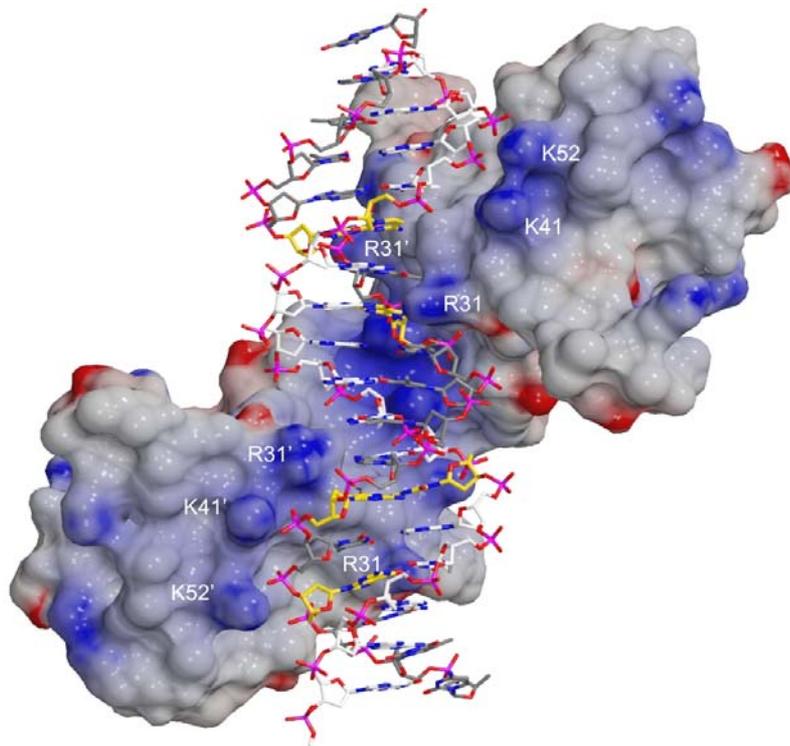


Abbildung 24 Das Oberflächenpotential der beiden an ($\rightarrow\rightarrow$) gebundenen $\Delta 19\omega_2$. Die Oberfläche wurde mit dem Programm msms (Sanner *et al.*, 1996b) generiert und entsprechend dem mit dem Programm Delphi (Gilson *et al.*, 1987) berechneten elektrostatischen Oberflächenpotential eingefärbt. Positive Oberflächenladung in blau (Maximalwert: 10 kT/e), negative Oberflächenladung in rot (Maximalwert: -10 kT/e). Die DNA ist als Stabmodell dargestellt. Kohlenstoffatome direkt kontaktierter Nucleotid-Basen in gelb. Die Positionen von Arg31 und Arg31′ der beiden Dimere sind angegeben.

3.5.3 Die mutierte Heptade ${}^8\text{AGTCACA}^{14}$ im Komplex mit $\Delta 19\omega_2$

Wie in Kapitel 3.5.1 erläutert, binden die $\Delta 19\omega$ -Dimere asymmetrisch an die Erkennungs-Heptade. Die Asymmetrie in den beobachteten direkten Kontakten zu den Nucleotid-Basen der Heptaden wird durch die unterschiedlichen Konformation der beiden Arg31 hervorgerufen (Abb. 23). Möglicherweise bildet Arg31' keine direkten Kontakte zu Nucleotid-Basen, weil sich kein potentieller Bindungspartner in „Reichweite“ von Arg31' befindet. Damit $\Delta 19\omega_2$ symmetrische Kontakte zu Basen aufbaut, müssten Arg31' der Monomere A' und B' an die Adenine der Positionen 2 bzw. 9 binden. Da nun Adenin auf Grund der Aminogruppe in Position C6 kein geeigneter Bindungspartner (H-Brücken-Akzeptor) für Arg31' ist, sollte herausgefunden werden, ob ein Austausch von Adenin 9 gegen Guanin 9 mit den H-Brücken-Akzeptor an Position C6, d. h. Austausch des Basenpaars A9-T6' gegen G9-T6' dazu führt, dass Arg31' direkte Kontakte zu G9 ausbildet. Die Sequenz der mutierten Heptade lautet damit ${}^8\text{AGTCACA}^{14}$ (gegenüber ${}^8\text{AATCACA}^{14}$ der Original-Heptade).

Der Austausch von A9-T6' wurde dem auch möglichen Austausch A2-T13' vorgezogen, da in der Struktur von $\Delta 19\omega$ -($\rightarrow\rightarrow$) die Kontakte zwischen dem $\Delta 19$ -Dimer A/A' und der ersten Heptade A1-A7 durch die benachbarten Basentriplets verzerrt werden (Kap. 3.5), so dass für Kokristallisations-Experimente die Mutation in der zweiten Heptade geeigneter erschien.

Kristalle von $\Delta 19\omega$ -($\rightarrow\rightarrow$)-(A9-T6' gegen G9-C6' ausgetauscht) wurden in der selben Raumgruppe mit isomorphen Zellparametern erhalten wie Kristalle von $\Delta 19\omega$ -($\rightarrow\rightarrow$). Es wurde ein Datensatz mit einer Auflösung von 2,9 Å gesammelt (Tab. 8) und die Struktur mit Differenzfourier-Methoden bestimmt. Dazu wurde das Strukturmodell von $\Delta 19\omega$ -($\rightarrow\rightarrow$) zunächst einer Starre-Körper-Verfeinerung unterzogen und anschließend eine *restrained* Verfeinerung durchgeführt (analog Kap. 3.2.4.4). Die mit den Parametern F_o-F_c berechnete Differenzelektronendichte zeigte eindeutig eine positive Differenzdichte für die gegenüber A9 zusätzliche Aminogruppe an C2 des eingeführten G9. Eine *omit*-Elektronendichtekarte, für deren Berechnung Arg31B' nicht einbezogen wurde, zeigte deutlich, dass Arg31' der Kette B' keine Konformationsänderung gegenüber dem entsprechenden Arg31' in der Struktur von $\Delta 19\omega$ -($\rightarrow\rightarrow$) eingeht und sich nicht in die große Furche bewegt, um H-Brücken zu dem eingeführten G9 zu bilden (Abb. 25).

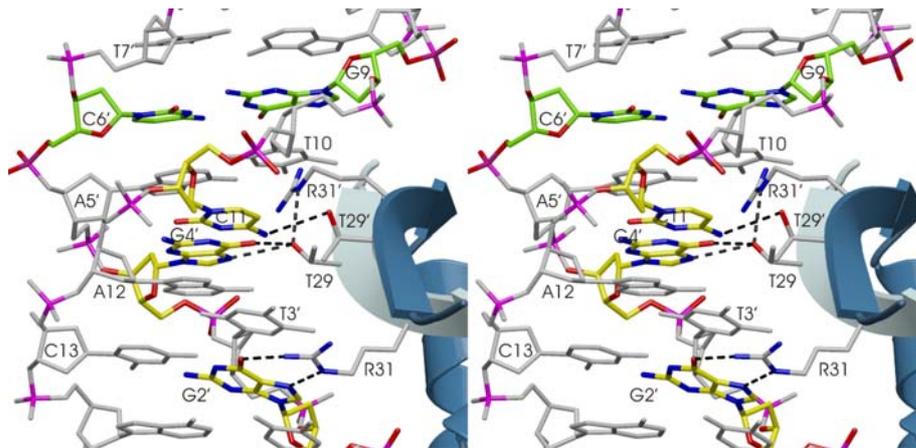


Abbildung 25 Stereodarstellung der spezifischen Interaktionen des $\Delta 19\omega$ -Dimers B/B' und der mutierten Heptade ${}^8\text{AGTCACA}^{14}$ in ($\rightarrow\rightarrow$). In grün ist das mutierte G9-C6' Basenpaar dargestellt. Arg31' unterhält jedoch weiterhin eine H-Brücke zu Thr29, analog der Bindung des $\Delta 19\omega$ -Dimers an die Original-Heptade (dargestellt in den Abbildungen 21,23).

Insgesamt überlagern die Strukturen $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ und $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ - (A9-T6' gegen G9-C6' ausgetauscht) mit einer rms Abweichung von nur 0,2 Å sehr gut, und in keinem Teil der Struktur konnten nennenswerte Konformationsänderungen beobachtet werden.

3.5.4 Vergleich mit biochemischen Daten

Auch Bindungsstudien zufolge zeigte der Austausch des AT-Basenpaars gegen ein GC-Basenpaar an der zweiten Position der Heptade (5'-AGTCACA-3' gegenüber der Originalsequenz 5'-AATCACA-3') keinen messbaren Einfluss auf die Bindungsaffinität von ω_2 , denn für beide Operatoren wurden apparente Dissoziationskonstanten von ~20 nM gemessen (de la Hoz *et al.*, 2004).

Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen in der Struktur von $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)/(\rightarrow\rightarrow)$ -[A9-T6' \rightarrow G9-C6'], die keine konformationellen Änderungen der an der DNA-Bindung beteiligten Aminosäuren zeigt (Kap. 3.5.3). Auf der anderen Seite könnte der Austausch des Basenpaars eine Konformationsänderung der Operator-DNA hervorrufen, welche möglicherweise die Bindung von $\Delta 19\omega_2$ an die mutierte Heptade erschwert. Ein Vergleich der Konformationen der freien DNA-Fragmente in den Strukturen $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ und der Struktur mit mutiertem Operator zeigte keine

nennenswerten Unterschiede, vielleicht weil die moderate Auflösung von 2,9 Å und die sehr hohen B-Faktoren der mutierten freien ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA keine zuverlässige Modellierung erlaubte. Mögliche konformationelle Änderungen und kleine Unterschiede in den Breiten der beiden Furchen konnten nicht beobachtet werden. Ein detaillierter Vergleich der Konformationen der freien DNA-Fragmente in beiden Strukturen hätte Rückschlüsse liefern können, ob die Bindungsspezifität und Affinität von ω_2 abhängig von der Konformation der freien DNA ist.

3.6 Die Operator-DNA in $[\Delta 19\omega_2]_2$ -($\rightarrow\rightarrow$)

Die Analyse der DNA-Geometrien erfolgte mit dem Programm Curves (Lavery und Sklenar, 1988), das zunächst eine optimale Helixachse berechnet, um anschließend die Orientierung der einzelnen Basenpaare relativ zur optimalen Helixachse anzugeben. Generell nehmen die drei untersuchten DNA-Stränge in den Komplexen $[\Delta 19\omega_2]_2$ -($\rightarrow\rightarrow$), $[\Delta 19\omega_2]_2$ -($\rightarrow\leftarrow$) sowie in der freien ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA eine fast lineare B-Form ein. Ausnahmen sind die Enden der DNA-Fragmente, die an der Bildung der Basentriplets beteiligt sind (Abb. 14). Diese weisen gegenüber den Parametern idealer B-DNA erhebliche Abweichungen auf. Die Basentriplets und DNA-DNA-Kontakte werden ausführlich in Kapitel 3.7 besprochen.

In diesem Kapitel wird nur der 14-bp lange Bereich der beiden Heptaden untersucht. Diese minimalen Operatorregionen zeigen in Abb. 26 eine fast gerade Helix mit einer durchschnittlichen helikalen Windung pro Basenpaar (*helical twist*) von $36,5^\circ$ und einer durchschnittlichen Höhe der Basenstufen von $3,38 \text{ \AA}$ (Tab. 9). Das bedeutet eine gute Übereinstimmung mit den Werten für ideale B-DNA, die eine helikale Windung von 36° und einer Höhe für eine Basenstufe (*rise*) von ebenfalls $3,38 \text{ \AA}$ aufweist (Saenger, 1984). Auch die Parameter *tilt* und *roll* zeigen zu idealer B-DNA ähnliche Werte (Tab. 9). Die Betrachtung durchschnittlicher Parameter für alle 14 Basenpaare lässt natürlich lokale Abweichungen der Geometrien im Vergleich zu idealer B-DNA unbeachtet. Die Geometrien einzelner Basenpaare werden im Folgenden ausgewertet.

Tabelle 9 Vergleich der Mittelwerte der Geometrieparameter *rise*, *roll* und *twist* sowie die Breiten der kleinen und großen Furche der drei 14-bp Heptaden-Regionen mit den Parametern für ideale B-DNA (Saenger, 1984).

Messgröße	B-DNA	$[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$	$[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$	freie $(\rightarrow\rightarrow)$ -DNA
<i>rise</i> h [Å]	3,38	3,37	3,38	3,27
<i>roll</i> ρ [°]	1,6	0,8	1,2	0,5
<i>helical twist</i> ω [°]	36	36,4	36,7	36,7
Kleine Furche [Å]	5,7	4,0	4,2	4,6
Grosse Furche [Å]	11,7	12,7	12,6	12,0

3.6.1 Geometrien der Basenpaare in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$

Die Struktur des Komplexes $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ zeigt, wie in Kap 3.5 beschrieben, dass beide $\Delta 19\omega$ -Dimere ein identisches Interaktionsmuster mit ihren jeweils gebundenen Heptaden aufweisen (Wasser-vermittelte Kontakte ausgenommen, Abb. 22). Daher sollten sich auch die Geometrie-Parameter für korrespondierende Basenpaare in beiden Heptaden ähneln. Die $\Delta 19\omega_2$ -gebundene $(\rightarrow\rightarrow)$ -DNA kann in fünf Bereiche aufgeteilt werden, nämlich in zwei direkt von $\Delta 19\omega$ -Dimere kontaktierte ${}^4\text{CAC}^6$ - bzw. ${}^{11}\text{CAC}^{13}$ -Regionen, den dazwischen liegenden ${}^7\text{AAAT}^{10}$ -Bereich sowie die sich außen anschließenden ebenfalls AT-reichen Regionen. Jede Heptade enthält zudem zwei CA-Schritte, die dafür bekannt sind, infolge ihrer Anfälligkeit für *roll* Bewegungen (Abb. 27) hoch flexibel zu sein (McNamara *et al.*, 1990; Beutel und Gold, 1992; Lyubchenko *et al.*, 1993; Packer *et al.*, 2000). Knicke an CA-Schritten des DNA-Rückgrats wurden sowohl in Kristallstrukturen freier DNA als auch in Protein-Operator-Komplexen beobachtet (Bhattacharyya und Bansal, 1990; Lyubchenko *et al.*, 1993; Suzuki und Yagi, 1995; Hunter und Lu, 1997; El Hassan und Calladine, 1998; Olson *et al.*, 1998).

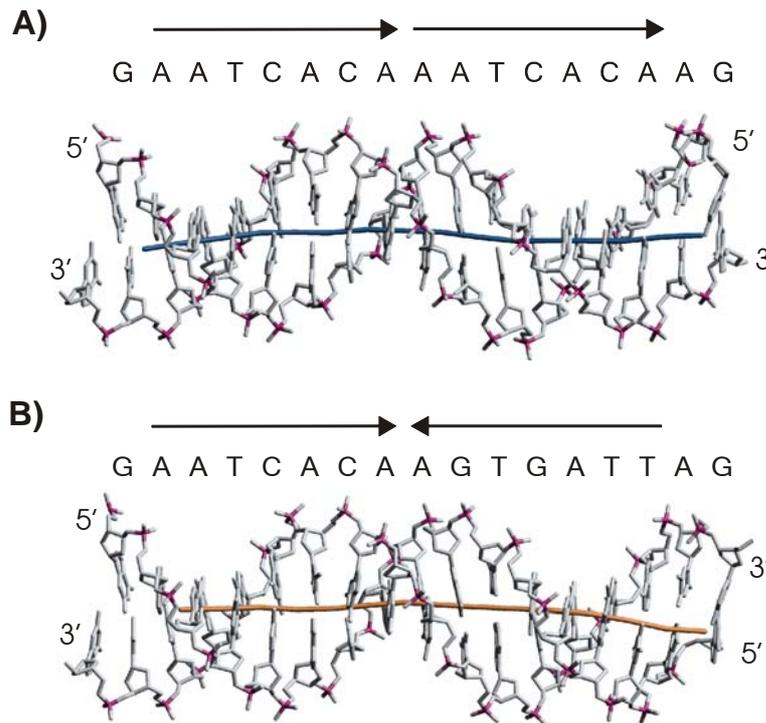


Abbildung 26 Verlauf der DNA in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\longrightarrow)$ (A) und $[\Delta 19\omega_2]_2-(\longrightarrow\longleftarrow)$ (B). Der Verlauf der lokalen Helixachse wurde mit dem Programm CURVES (Lavery und Sklenar, 1988) berechnet und in den Modellen der Doppelhelizes von (\longrightarrow) -DNA als blaue und von $(\longrightarrow\longleftarrow)$ -DNA als gelbe Linien eingezeichnet. Der Verlauf ist in beiden DNA-Fragmenten fast linear, und die durchschnittlichen Parameter für die helikale Windung sowie die Höhe der Basenpaarstufen ähneln den Parametern für ideale B-DNA.

In den Komplexen $[\Delta 19\omega_2]_2-(\longrightarrow)$ und $[\Delta 19\omega_2]_2-(\longrightarrow\longleftarrow)$ verlaufen die Doppelhelizes jedoch fast linear (vergleichbar mit idealer B-DNA) und zeigen keine Knickstellen an den CA-Schritten (Abb. 26). Dennoch zeigen die DNA-Parameter für die CAC-Regionen interessante Eigenschaften, die bei der indirekten DNA-Erkennung, d. h. der Erkennung von sequenzspezifischen Vorzugskonformationen der DNA durch das DNA-bindende Protein, eine Rolle spielen können. Das Vorliegen von freier DNA in der Struktur von $\Delta 19\omega-(\longrightarrow)$ lässt einen detaillierten Vergleich der freien und $\Delta 19\omega_2$ -gebundenen DNA zu.

Die Parameter *buckle*, *inclination*, *propeller-twist*, *roll* und *slide* sind zum Vergleich für jedes einzelne Basenpaar der $\Delta 19\omega_2$ -gebundenen und freien (\longrightarrow) -DNA sowie der $\Delta 19\omega_2$ -gebundenen $(\longrightarrow\longleftarrow)$ -DNA in Abb. 28B-G zusammengefasst. Zusätzlich wird die Bedeutung der einzelnen Parameter in Abb. 27 veranschaulicht. In Tab. 9 werden die durchschnittlichen Parameter für *rise*, *tilt*, *roll* und *twist* zusammengefasst und mit idealer DNA in der B-Form verglichen. Die Anzahl der Basenpaare für

eine Windung beträgt 9,8, d. h. die gebundene DNA ist im Vergleich zu freier B-DNA mit 10,6-bp pro Windung leicht überwunden.

Die Konformationen der Desoxyribosen können aufgrund der moderaten Auflösung von 2,45 Å nur ungefähr angegeben werden (Tab. 10). Da es für den Übergang von der C1'-exo- zur C2'-endo-Konformation nur geringer Geometrieänderungen bedarf, kann davon ausgegangen werden, dass fast alle Desoxyribosen innerhalb der beiden Heptaden in der für B-DNA üblichen C2'-endo Konformation vorliegen.

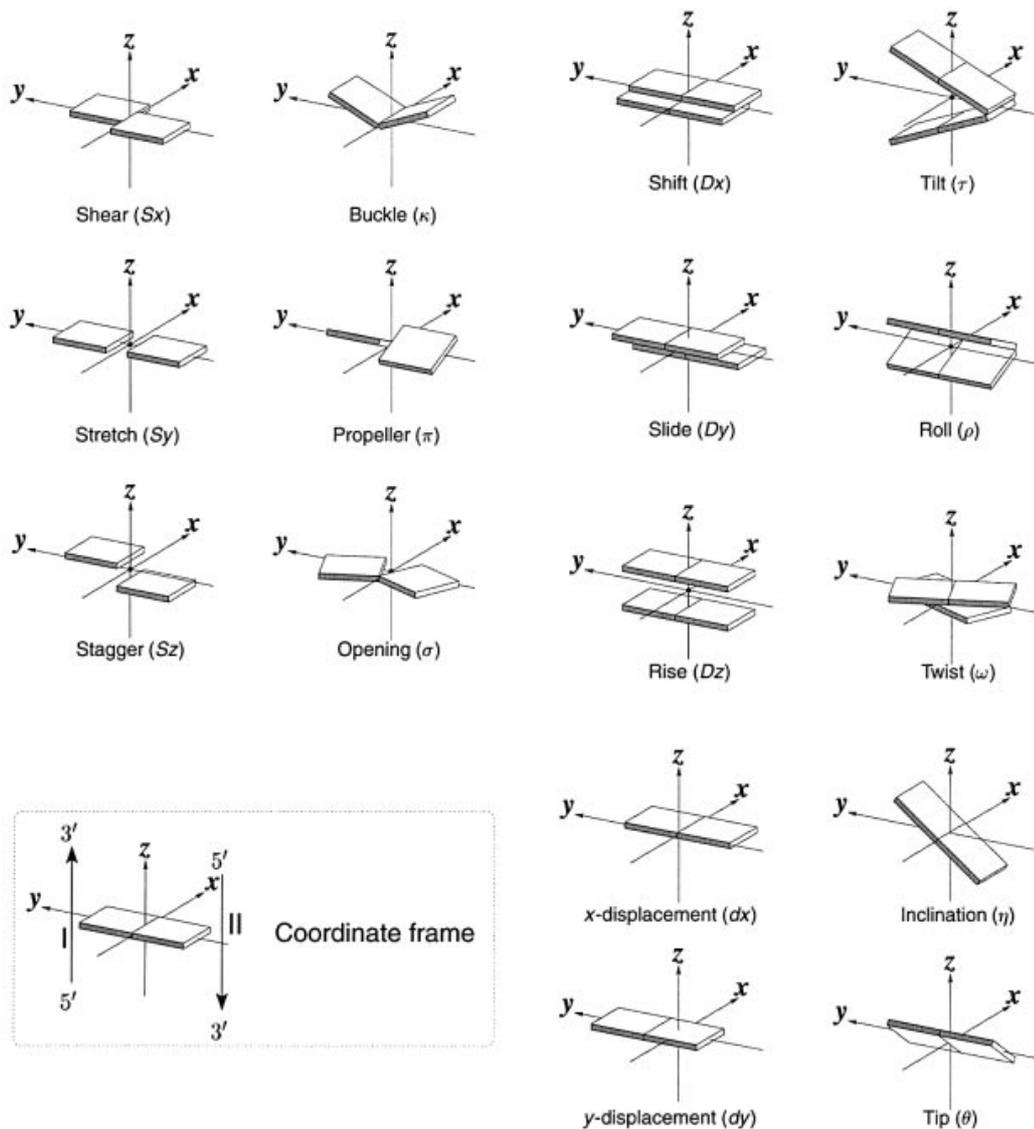


Abbildung 27 Illustrationen der Definitionen der Parameter, mit denen die Geometrien von komplementären Basenpaaren und sequenziellen Basenpaarschritten beschrieben werden. Der Basenpaar-Referenzrahmen (*coordinate frame*) im linken unteren Bildteil ist so konstruiert, dass die x-Achse von der schattierten kleinen Furche des Basenpaar weg in Richtung in Richtung der großen Furche deutet. Die y-Achse zeigt in Richtung des Sequenzstranges (I). Die Abbildungen zeigen positive Werte für die jeweiligen Parameter. Abbildung entnommen aus (Lu und Olson, 2003).

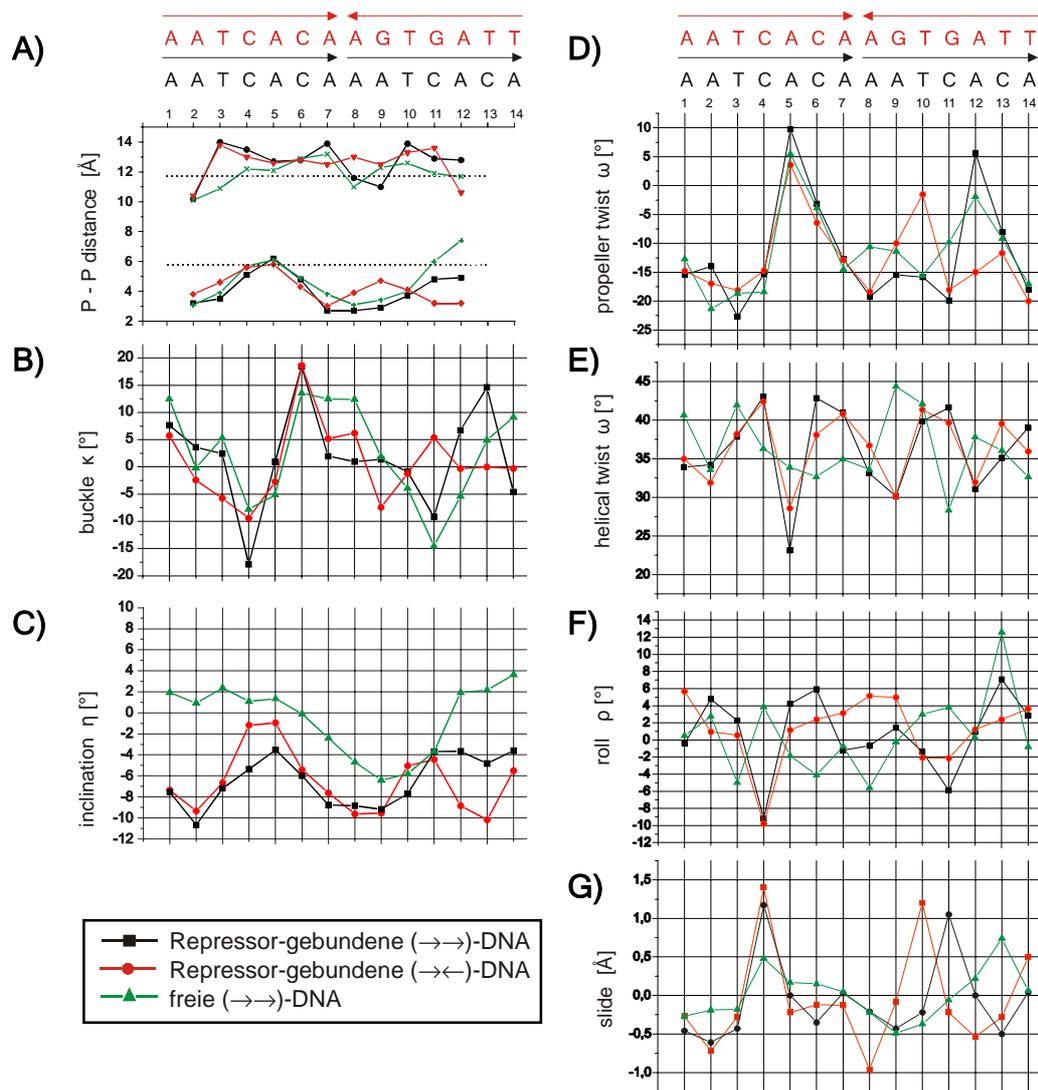


Abbildung 28

Zur Analyse der DNA-Geometrieparameter wurde das Programm Curves (Lavery und Sklenar, 1988) verwendet. Dieses berechnet vor der eigentlichen Geometrieanalyse eine optimale Helixachse und relativ zu dieser orientiert werden die Parameter für die jeweiligen Basenpaare bestimmt. Die Bedeutungen der einzelnen Parameter werden in Abb. 27 veranschaulicht.

In den Graphiken sind die jeweiligen Werte an der Ordinate und die Sequenz der Basenpaare auf der Abszisse aufgetragen. Die Parameter der freien (grün) und der Repressor-gebundenen (schwarz) ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA sowie die Repressor-gebundene ($\rightarrow\leftarrow$)-DNA (rot) werden miteinander verglichen. Die DNA-Fragmente nehmen eine fast gerade B-DNA vergleichbare Konformation ein (siehe dazu auch Abb. 26). Mittelwerte aussagekräftiger Parameter sind in Tab. 9 im Vergleich zu idealer B-DNA aufgelistet. In (A) wird die Breite der kleinen und der großen Furche entlang der zentralen 11-bp des jeweiligen Operators aufgetragen, indem die kürzeste Distanz zwischen zwei Phosphor-Atomen gemessen wird (abzüglich der Radien zweier Phosphatgruppen, insgesamt 5,8 Å). Die Breiten der kleinen und großen Furche von 5,7 Å und 11,7 Å in idealer B-DNA (Saenger, 1984) sind durch horizontale gestrichelte Linien angegeben. Beachtlich ist die Verengung der kleinen Furche in der ⁷AAAT¹⁰ Region der freien und Repressor-gebundenen ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA. (B) zeigt den *buckle* κ (°) und (C) die Neigungswinkel (*inclination*) η (°) der Basenpaare relativ zur lokalen Helixachse, beide Parameter zeigen in den CAC-Regionen charakteristische Verläufe (symmetrisch für ($\rightarrow\leftarrow$)-DNA) und sorgen für die beobachteten Verengungen/Erweiterungen der kleinen und großen Furchen. In (D) werden die Propellerwinkel (*propeller-twist*) ω [°], in (E) die helikale Windung (*helical twist*) ω [°], in (F) die *roll*-Bewegung in ρ [°] und in (G) der *slide* in [Å] angegeben.

3.6.1.1 Verengungen der kleinen Furche im ${}^7\text{AAAT}^{10}$ -Bereich der ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA

Unter Berücksichtigung der van-der-Waals-Radien der Phosphatgruppen beträgt die Breite der großen Furche in regulärer B-DNA quer über die Furche gemessen 11,7 Å, während die Breite der kleinen Furche 5,7 Å beträgt (Saenger, 1984). Die Breiten der beiden Furchen in ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA weichen erheblich von den Werten idealer B-DNA ab und zeigen im AT-reichen Mittelteil des Operators eine Verengung der kleinen Furche auf ~2,7 Å, während in den CAC-Bereichen Breiten von 5-6 Å gemessen werden. Die Verengung der kleinen Furche in den AT-reichen Regionen des Operators wird durch die Neigung der Basenpaare gegenüber der lokalen Helixachse (*inclination*) von durchschnittlich -8° hervorgerufen, während die CAC-Regionen deutlich weniger Neigung aufweisen. Wie in Abb. 28A,C dargestellt, verlaufen die Parameter Furchenbreite und *inclination* synchron.

Die Verengung der kleinen Furche auf 2,7 Å im ${}^7\text{AAAT}^{10}$ -Bereich ist mit der Bindung einer Kette von Wassermolekülen verbunden, die zickzackförmig in der kleinen Furche angeordnet sind (Abb. 29). Eine ähnliche Koordination von Wassermolekülen in der kleinen Furche der DNA wurde schon in der ersten Kristallstruktur eines dsDNA-Fragments beobachtet, und führte fälschlicherweise zu der Annahme, dass die kleine Furche der B-DNA nur ~3 Å breit sei (Wing *et al.*, 1980). Ein Irrtum der mit weiteren Strukturen von B-DNA, die keine längeren AT-reichen-Regionen enthielten, ausgeräumt werden konnte. Demgegenüber ist die große Furche in den CAC-Regionen von 11,7 Å auf >13 Å erweitert, und erlaubt so die Aufnahme der β -Faltblätter der $\Delta 19\omega$ -Dimere. Diese Aufweitung der großen Furche wird durch einen entgegengesetzten *buckle* der CG-Basenpaare in den CAC-Regionen und eine negative Neigung der Basenpaare relativ zur lokalen Helixachse von -8° in der ${}^7\text{AAAT}^{10}$ -Region hervorgerufen (siehe *inclination* in Abb. 28C). Der entgegengesetzte *buckle* der GC-Basenpaare wiederum löst im dazwischen liegenden AT-Basenpaar ebenfalls erhebliche Verzerrungen aus, die sich in einer positiven Propeller-Windung von 5° (ideale B-DNA -15°) und einer stark verringerten Helix-Windung von $\sim 30^\circ$ äußern (Abb. 28D,E).

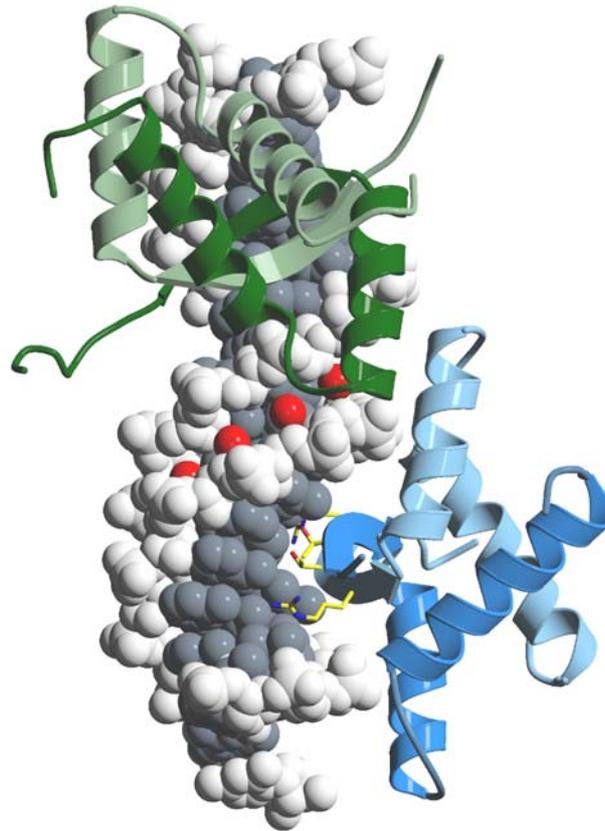


Abbildung 29 Hydratkette im ${}^7\text{AAAT}^{10}$ -Bereich der kleinen Furche der DNA. Die $\Delta 19\omega_2$ in hellgrün/grün und hellblau/blau. Seitenketten von Thr29 und Arg31 der beiden $\Delta 19\omega$ -Ketten B/B' sind als gelbe Kugelstab-Modelle eingezeichnet. In jedem Basenschritt des ${}^7\text{AAAT}^{10}$ -Bereichs wird ein Wassermolekül (rote Kugeln) koordiniert. Es wurde noch eine zweite Kette Wassermoleküle gefunden (nicht gezeigt), so dass eine zickzackförmige Anordnung resultiert.

3.6.1.2 Die Geometrieparameter der CA-Schritte

Die für ihre Flexibilität bekannten CA-Schritte (Dickerson und Chiu, 1997; Dickerson, 1998) zeigen neben dem entgegengesetzten *buckle* einen positiven *slide* von 1,0 Å und einen schwach negativen *roll* von $\sim 4^\circ$ (Abb. 28B,F,G). Im Vergleich zu anderen in Protein-DNA-Kontaktregionen lokalisierten CA-Schritten (El Hassan und Calladine, 1998) ist diese *roll*-Bewegung vernachlässigbar klein. Interessanterweise bindet der CAP-Repressor an palindromische Operatoren, deren Operator-Halbseiten die Sequenz 5'-AG **ATCACA** TTT-3' aufweisen, wobei die fett gedruckte Sequenz mit der Erkennungssequenz des ω -Repressors übereinstimmt (5'- ${}^A/T$ **ATCACA**-3'). Im CAP-Operator-Komplex wird für den ersten CA-Schritt ein positiver *roll* von $\sim 40^\circ$ beobachtet, so dass die DNA an diesem CA-Schritt stark gebogen wird (Schultz *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 2001; Benoff *et al.*, 2002).

3.6.2 Die freie ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA

3.6.2.1 Vergleich der freien und $\Delta 19\omega_2$ -gebundenen ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA

Freie DNA wurde in beiden Kristallstrukturen $\Delta 19\omega$ -($\rightarrow\rightarrow$) und $\Delta 19\omega$ -($\rightarrow\leftarrow$) beobachtet, aber nur die freie ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA konnte vollständig modelliert werden (siehe Kap. 3.2.4.3). Da die freie ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA außer den DNA-DNA-Kontakten an ihren Enden keine weiteren Kristallkontakte ausbildet, kann sie als Referenz zur $\Delta 19\omega_2$ -gebundenen ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA betrachtet werden, um konformationelle Änderungen, die durch die Repressor-Bindung induziert werden, zu erkennen. Jedoch muss einschränkend erwähnt werden, dass die freie ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA insbesondere in der Mitte relativ flexibel ist (Temperaturfaktoren bis 100 \AA^2) und die Konformationen der Desoxyribose-Einheiten nicht zuverlässig ermittelt werden konnten. Auf jeden Fall kann der Verlauf des Rückgrats und damit die Breiten der Furchen bestimmt werden, da alle Phosphatgruppen in der $2F_o - F_c$ Elektronendichte deutlich konturiert beobachtet werden konnten.

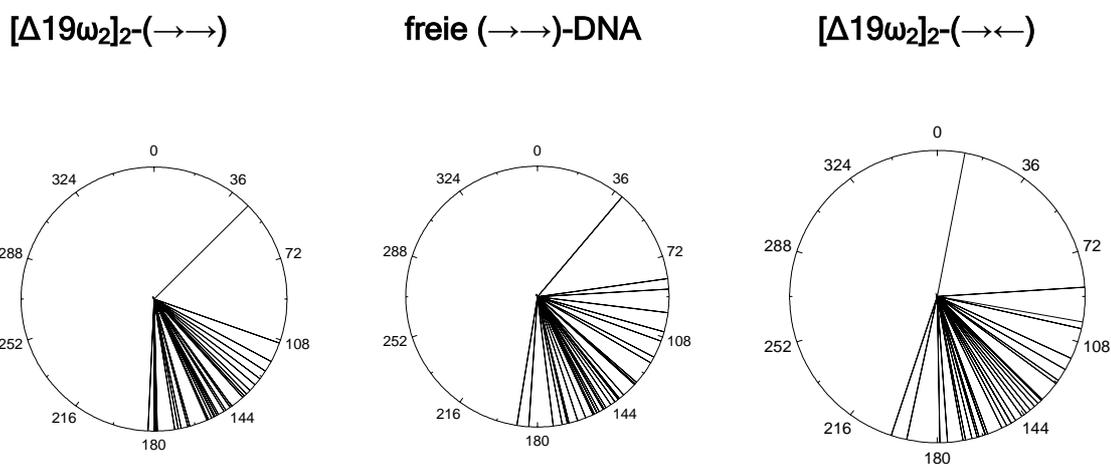


Abbildung 30A Pseudorotations-Phasenwinkel nach Altona und Sundaralingam (1972) der DNA in $[\Delta 19\omega_2]_2$ -($\rightarrow\rightarrow$), der freien ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA und in $[\Delta 19\omega_2]_2$ -($\rightarrow\leftarrow$). Der Wert in $[\circ]$ jedes einzelnen Desoxyribonucleosids wird durch eine radiale Linie repräsentiert. Für B-DNA typische C2'-endo-Konformationen (144 - 180°) werden am häufigsten beobachtet. C1'-exo-Konformationen (108 - 144°) werden seltener und nur vereinzelt werden energetisch ungünstige O1'-endo-Konformationen (54 - 96°) beobachtet.

Tabelle 10 Vergleich der Konformationen der Desoxyribosen in freier und Repressor-gebundener ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA. In blau sind vorhandene Übereinstimmungen der Konformationen markiert. Die Bezeichnungen „oberer“ Strang und Komplementärstrang entsprechen Abb. 14.

„Oberer“ Strang	$[\Delta 19\omega_2]_2(\rightarrow\rightarrow)$	freie ($\rightarrow\rightarrow$)	Komplementär- Strang	$[\Delta 19\omega_2]_2(\rightarrow\rightarrow)$	freie ($\rightarrow\rightarrow$)
G0	C4'-exo	C1'-exo	C15'	C1'-exo	C2'-endo
A1	C2'-endo	C2'-endo	T14'	C1'-exo	C1'-exo
A2	C1'-exo	C2'-endo	T13'	C1'-exo	C2'-endo
T3	C1'-exo	C1'-exo	A12'	C1'-exo	C2'-endo
C4	C2'-endo	C1'-exo	G11'	C2'-endo	C2'-endo
A5	C2'-endo	C1'-exo	T10'	C2'-endo	C1'-exo
C6	C2'-endo	C2'-endo	G9'	C2'-endo	C1'-exo
A7	C1'-exo	C2'-endo	T8'	C2'-endo	C2'-endo
A8	C2'-endo	C2'-endo	T7'	C2'-endo	C1'-exo
A9	C1'-exo	C1'-exo	T6'	C1'-exo	C2'-endo
T10	C1'-exo	C1'-exo	A5'	C2'-endo	C2'-endo
C11	C2'-endo	C2'-endo	G4'	C2'-endo	O1'-endo
A12	C2'-endo	C2'-endo	T3'	C2'-endo	C2'-endo
C13	C2'-endo	O1'-endo	G2'	C2'-endo	C2'-endo
A14	C3'-exo	O1'-endo	T1'	C1'-exo	C1'-exo
A15	C2'-endo	C3'-exo	T0'	C2'-endo	C1'-exo
G16	C4'-exo	O1'-endo	C-1'	C1'-endo	C12'-endo

Wie in Tab. 10 aufgeführt, zeigen die Konformationen der Desoxyribose-Einheiten der freien ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA eine für B-DNA typische C2'-endo oder C1'-exo Konformation (und nicht die bei A-DNA oder RNA typische C3'-endo Form), wobei etwa die Hälfte der korrespondierenden Basen in freier und $\Delta 19\omega_2$ -gebundener DNA übereinstimmen. Werden die Pseudorotations-Phasenwinkel der Nucleotide in Polar-diagrammen aufgetragen (Abb. 30A) wird deutlich, dass die C2'-endo-Konformation in allen drei DNA-Fragmente deutlich bevorzugt ist, außerdem werden auch C1'-exo-Konformationen beobachtet. Die G0-Nucleotide markieren mit Phasenwinkeln von 10-42° allesamt Ausreißer, die durch ihre Teilnahme an der Formation der Basentriplets erklärt werden können (Kap. 3.7.1).

Interessanterweise ist die Konformation der freien ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA der Repressor-gebundenen ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA grösstenteils sehr ähnlich. In der Überlagerung von freier und Repressor-gebundener DNA (Abb. 30B) zeigen beide DNA-Fragmente im mittleren Bereich einen vergleichbaren Verlauf ihrer Rückgrate. Beide besitzen eine verengte kleine Furche im ⁷AAAT¹⁰-Bereich und außerhalb der CAC-Regionen, sowie eine erweiterte große Furche in den CAC-Regionen (siehe Abb. 28A). Auch die Basenpaar-

Parameter *buckle*, *propeller-twist* und teilweise auch *inclination*, welche die veränderten Furchenbreiten hervorrufen, zeigen einen vergleichbaren Verlauf (Abb. 28B-D). So wird eine negative Neigung der Basenpaare relativ zur lokalen Helixachse (*inclination*) im ${}^7\text{AAAT}^{10}$ -Bereich beobachtet, und die beiden CG-Basenpaare in den CAC-Regionen zeigen einen entgegengesetzten *buckle* wie die Repressor-gebundene ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA. Jedoch sind die konformationellen Änderungen der freien DNA gegenüber idealer DNA in der B-Form weniger stark ausgeprägt als die der Repressor-gebundenen Form. Die Verläufe der DNA-Rückgrate freier, $\Delta 19\omega_2$ -gebundener und idealer DNA in der B-Form sind in Abb. 30 überlagert. Insgesamt zeigt der Verlauf des Rückgrats der freien ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA bessere Übereinstimmung mit der Repressor-gebundenen ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA.

Die Frage, welche konformationellen Änderungen überhaupt durch die Repressor-Bindung induziert werden, kann mit Blick auf die Verläufe der DNA-Parameter *helix-twist*, *roll* und *slide* für die Repressor-gebundene und die freie ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA beantwortet werden (Abb. 28E-G). Für diese Parameter wird für jede Repressor-gebundene Heptade der gleiche charakteristische Verlauf verzeichnet, die freie DNA zeigt jedoch unregelmäßige Verläufe mit Schwankungen um die Werte für ideale B-DNA. Deshalb ist davon auszugehen, dass diese drei DNA-Parameter wesentlich durch die Bindung des Repressors beeinflusst werden.

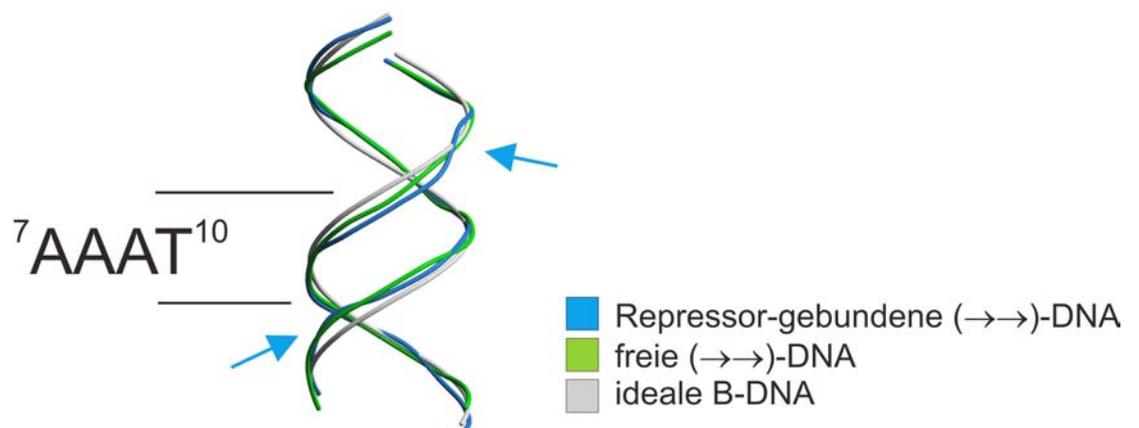


Abbildung 30B Vergleich der Verläufe der Phosphodiester-Rückgrate der 14-bp des Repressor-gebundenen Operators ($\rightarrow\rightarrow$) (blau), freier Operator ($\rightarrow\rightarrow$) (grün) überlagert mit idealer B-DNA (grau). Die Repressor-gebundene ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA zeigt durch zwei Pfeile markierte „Knicke“ in den CAC-Regionen und verengt sich in der Mitte (${}^7\text{AAAT}^{10}$ -Bereich). Die freie ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA folgt größtenteils dem Verlauf der Repressor-gebundenen ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA und zeigt ebenfalls eine Verengung in der Mitte, aber keine „Knicke“.

3.7 Die DNA-DNA-Kristallkontakte

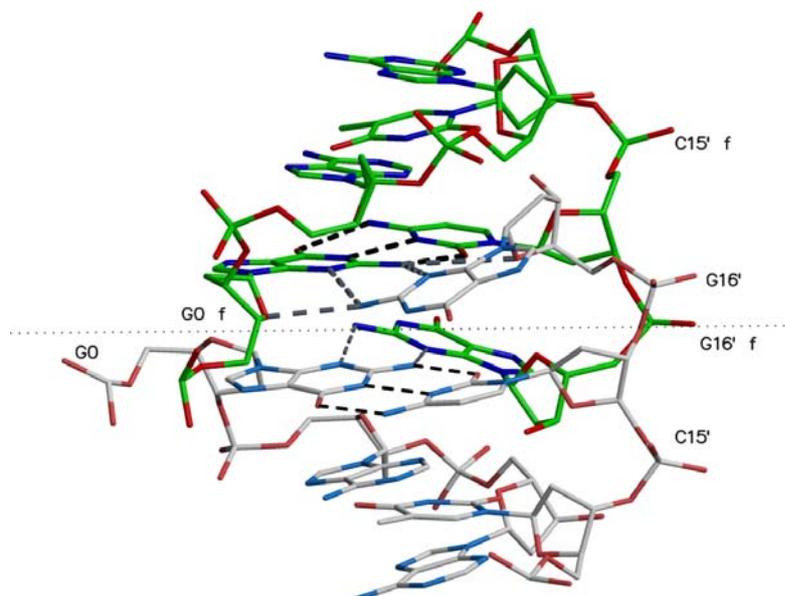
In beiden Strukturen ($\Delta 19\omega-(\rightarrow\rightarrow)$ und $\Delta 19\omega-(\rightarrow\leftarrow)$) bilden die freien und Repressor-gebundenen DNA-Fragmente pseudo-kontinuierliche DNA-Stränge, wobei zwei unterschiedliche DNA-DNA-Kontakte beobachtet werden (Abb. 14): Ein DNA-DNA-Kristallkontakt wird durch zwei aufeinander folgende Basentriplets vermittelt (Kap. 3.7.1) und der zweite Kristallkontakt durch Stapelung der endständigen Basenpaare zweier DNA-Doppelstränge (Kap. 3.7.2). Da die beiden DNA-Fragmente mit einer Kopf-Kopf-Anordnung koppeln, scheidet die Möglichkeit einer Watson-Crick-Paarung der überhängenden Cytosine mit den überhängenden Guaninen aus (die GC-Basenpaarung wäre bei einer Kopf-Schwanz-Anordnung möglich). Stattdessen liegen die beiden überhängenden C17 und C17' fehlgeordnet vor (Abb. 14).

In den folgenden Kapiteln werden die DNA-DNA-Kontakte der Struktur von $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)/(\rightarrow\rightarrow)$ beschrieben, ähnliche DNA-DNA-Kontakte mit vergleichbaren Geometrien liegen für die Struktur von $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)/(\rightarrow\leftarrow)$ vor, werden aber nicht gesondert diskutiert.

3.7.1 Die beiden G*(G·C)-Basentriplets

In der Kristallstruktur von $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)/(\rightarrow\rightarrow)$ bildet die freie und Repressor-gebundene $(\rightarrow\rightarrow)$ -DNA zwei durch nicht-kristallographische Symmetrie verwandte Basentriplets (Abb. 31A). Da die Elektronendichte in diesem Bereich gut definiert ist, konnten die Nucleotid-Sequenzen eindeutig zugeordnet werden.

A)



B)

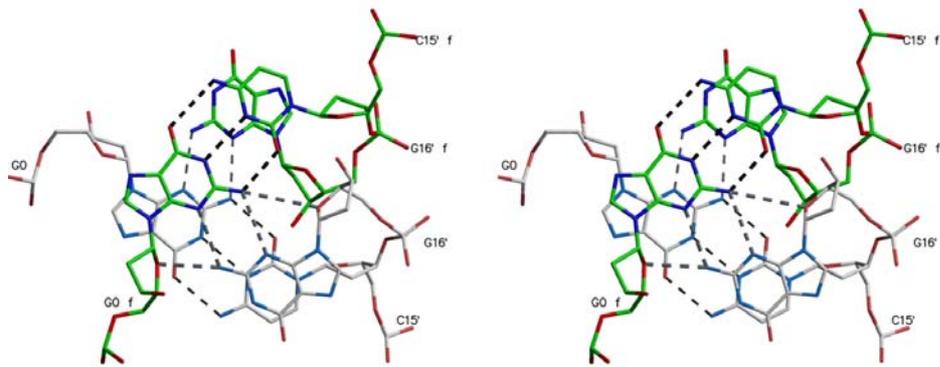
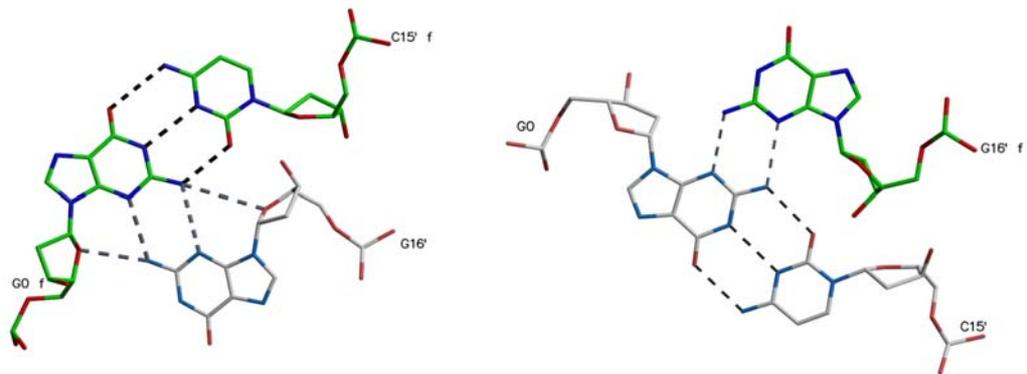
C) $G16'^*(G0_f \cdot C15'_f)$ D) $G16'_f*(G0 \cdot C15')$ 

Abbildung 31

Die $G^*(G \cdot C)$ -Basentriplets in der Struktur $\Delta 19\omega$ -($\rightarrow\rightarrow$).

Die freie und die Repressor-gebundene DNA bilden zwei übereinander liegende $G^*(G \cdot C)$ -Basentriplets. Die Basen sind entsprechend Abb. 14 nummeriert. „f“ kennzeichnet die Zugehörigkeit der Nucleotide zur freien DNA. Kohlenstoffatome der freien DNA sind grün, die der Repressor-gebundenen DNA hellgrau eingefärbt.

(A) Die DNA-Stränge kuppeln in einer Kopf-Kopf Anordnung, so dass eine pseudo-zweizählige Achse vorliegt, die als gestrichelte schwarze Linie in der Papierebene dargestellt ist. Die überhängenden $G16'$ und $G16'_f$ reichen in die kleine Furche der benachbarten DNA und bilden symmetrische H-Brücken zu $G0$ bzw. $G0_f$ der terminalen Watson-Crick-Basenpaare der Nachbarstränge.

(B) Stereo-Darstellung der beiden übereinander angeordneten Basentriplets mit Blickrichtung entlang der Helix Achse. Die beiden terminalen Watson-Crick GC-Basenpaare stapeln nicht und schließen einen Winkel von 80° ein. Basen-Stapelung wird für die überhängenden Guanine $G16'$ und $G16'_f$ in der kleinen Furche und die Cytosine der Watson-Crick GC-Basenpaare beobachtet. Schwarze gestrichelte Linien kennzeichnen H-Brücken der Watson-Crick GC-Basenpaare und graue, gestrichelte Linien H-Brücken der G^*G -Paarungen, sofern sie kürzer als $<3,7$ Å sind.

(C) H-Brücken des $G16'^*(G0_f \cdot C15'_f)$ -Triplets. Die beiden Guanine des Triplets bilden zusätzlich H-Brücken zwischen N2-H der Guanine und O4' der Desoxyribosen von $G0_f$ und $G16'$.

(D) H-Brücken des $G16'_f*(G0 \cdot C15')$ -Triplets sind als gestrichelte Linien eingezeichnet und ihre Längen in Å angegeben.

Die jeweils überhängenden terminalen G16' und G16'_f („f“ kennzeichnet die Zugehörigkeit zur freien DNA) ragen in die kleine Furche der benachbarten Doppelhelix und interagieren dort mit den endständigen Watson-Crick-Basenpaaren G0·C15' bzw. G0_f·C15'_f (Abb. 31A-C), um die Basentriplets G16'_f*(G0·C15') und 30° für G16'**(G0_f·C15'_f) zu formen (wobei „f“ Watson-Crick-Basenpaarung kennzeichnet und „*“ die G*G-Paarung in der kleinen Furche der DNA). Stabilisiert wird die G*G-Paarung durch symmetrische Wasserstoffbrücken zwischen den Guaninen der Art N2-H··N3 senkrecht zur Grenzfläche der kleinen Furche. Die dihedralen Winkel zwischen den Guaninen messen 25° in G16'_f*(G0·C15') und 30° in G16'**(G0_f·C15'_f). Das Triplet G16'**(G0_f·C15'_f) wird zusätzlich durch ebenfalls symmetrische H-Brücken zwischen N2-H der Guanine und O4' der Desoxyribosen von G16' und G0_f stabilisiert (Abb. 31C). Diese Interaktionen werden nicht von G16'_f*(G0·C15') gebildet, da die Abstände der entsprechenden Atompaare dort ~4Å messen (Abb. 31D). Zurückzuführen ist dies teilweise auf die ungewöhnliche C4'-exo-Konformation des Desoxyribose-Rings von G0, während G0_f sowie die beiden G16' und G16'_f in der C2'-endo Konformation vorliegen.

Basentriplets der Art G*(G·C) wurden bereits in der Kristallstruktur des CAP-Proteins im Komplex mit einer 30-bp langen DNA mit überhängenden Guaninen beobachtet (Schultz *et al.*, 1991).

Eine Variation dieses Interaktionstyps zeigt die Struktur des DNA-Dekamers d(5'-CGCAATTGCG-3')₂. Dort wird die Paarung des 3'-terminalen GC-Basenpaars aufgehoben und das Guanin bildet mit dem 5'-terminalen GC-Basenpaar eines benachbarten DNA-Fragments ein G*(G·C)-Basentriplett, während das Cytosin in die große Furche desselben GC-Basenpaars bindet. Insgesamt liegt also ein Basenquartett vor, das als Modell für eine Vier-Wege-Helix-Helix-Verzweigung (*four-way helix-helix junction*) dient (Spink *et al.*, 1995).

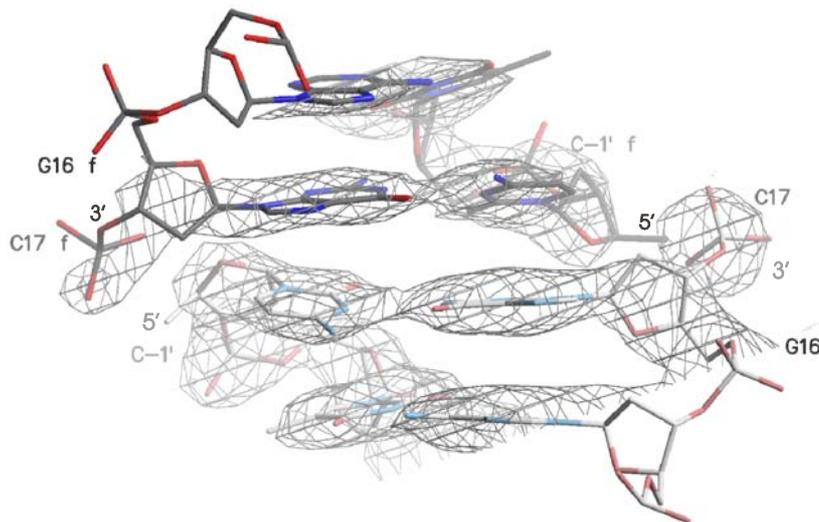
Die Kristallstruktur des DNA-Dekamers d(5'-GGCAATTGCG-3')₂ zeigt sowohl ein G*(G·C) als auch ein G-(G·C) Basentriplett (Nunn *et al.*, 1997). Die Geometrie des G*(G·C) Basentriplets ähnelt dabei der Geometrie des G16'**(G0_f·C15'_f) in Abb. 31D.

3.7.2 Basenstapel vermitteln einen zweiten DNA-DNA-Kontakt

Der zweite DNA-DNA-Kontakt wird durch Stapelung der terminalen G16·C-1' und G16_f·C-1'_f Basenpaare aufgebaut (Abb. 32A). Die Nucleosid-Einheiten der beiden überhängenden C17 und C17_f liegen fehlgeordnet vor. Lediglich für die 5'-Phosphatgruppen dieser Nucleotide wurde interpretierbare Elektronendichte erhalten. Dies ist ein Hinweis auf die Integrität der Oligonucleotide im Kristall, bzw. dass die überhängenden und größtenteils fehlgeordneten C17 während der Kristallisation nicht abgespalten wurden. Hingegen konnte für die 5'-Phosphatgruppen von C-1 bzw. C-1' keine Elektronendichte beobachtet werden. Die Besetzungen dieser Phosphat-Gruppen wurden deshalb im finalen Modell auf null gesetzt. So wurde auch mit den Nucleosid-Einheiten von C17 und C17' verfahren. Die Elektronendichte lässt außerdem keine eindeutige Zuordnung der Konformationen der Desoxyribose-Konformationen der endständigen C-1' und C-1'_f Nucleotide zu, so dass die ungewöhnlichen Konformationen O1'-exo bzw. C1'-exo (Tab. 10) möglicherweise falsch sind.

Die Kopf-Kopf-Orientierung der DNA-Stränge lässt eine pseudo-zweizählige Symmetrie für die in diesem DNA-DNA-Kontakt stapelnden Basenpaare erwarten. In der Aufsicht von Abb. 32B auf den Basenstapel wird deutlich, dass starke Abweichungen von der pseudo-zweizähligen Symmetrie vorhanden sind, und die lokalen Helixachsen der beiden Basenpaare um $\sim 1 \text{ \AA}$ versetzt sind (Abb. 32B). Nur die Basen von G16_f und C-1' überlappen, während die Basen von C-1'_f und G16 versetzt übereinander angeordnet sind. Auf Grund dieser Abweichungen zeigen auch die Termini der Phosphodiesterketten, die pseudo-kontinuierliche Stränge bilden, unterschiedliche Abstände zueinander (Abb. 32B). Die Helix-Windung für diese pseudo-Basenstufe beträgt $\sim 42^\circ$ und ist damit gegenüber regulärer B-DNA mit 36° leicht überdreht. Dies ist möglicherweise auf die elektrostatische Abstoßung der benachbarten Phosphatgruppen von C17_f und C-1' bzw. C17 und C-1'_f zurückzuführen (Abb. 32B).

A)



B)

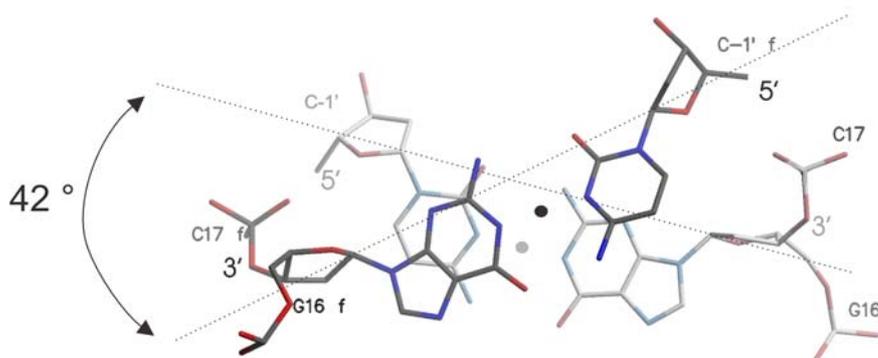


Abbildung 32 Basenpaarstapelung zwischen freier und Repressor-gebundener DNA. DNA-DNA-Kontakt zwischen freier DNA (Kohlenstoffatome sind grün) und Repressor-gebundenem Operator (hellgrau). Die ungepaarten terminalen Nucleosid-Einheiten von C17 und C17_f sind fehlgeordnet, für die Phosphatgruppen konnte jedoch Elektronendichte beobachtet werden. Die terminalen 5'-Phosphatgruppen von C-1' und C-1'_f konnten ebenfalls nicht modelliert werden.

(A) Die 2F_o-F_c Elektronendichte ist bei einem Signal-über-Rausch-Verhältnis von 1.4 σ konturiert.

(B) Die vertikale Helixachse in (A) wurde um 90° gedreht und steht jetzt senkrecht zur Papierebene. Gezeigt sind jeweils die terminalen G16-C-1' Basenpaare zweier in Kontakt stehender Operatoren, das grüne Basenpaar liegt im Vordergrund. Die lokalen Helixachsen der Basenpaare sind durch Punkte markiert und 1,3 Å voneinander entfernt.

3.8 Die Dimer-Dimer Grenzfläche des $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$

Der ω -Repressor bindet kooperativ an mindestens zwei aufeinander folgende Wiederholungen der Erkennungs-Heptade (vergleiche Kap. 3.1.4.1). Die Strukturen der Komplexe $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ und $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ zeigen, dass die kooperative Bindung wahrscheinlich auf Interaktionen zwischen Helizes $\alpha 1$ benachbarter $\Delta 19\omega_2$ beruht.

Wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben setzen in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ und $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ pseudo- C_{2M} -Rotationsachsen die $\Delta 19\omega$ -Dimere in Bezug. Damit sind auch die an der kooperativen Bindung beteiligten Helizes $\alpha 1(\prime)$ durch die pseudo- C_{2D} -Rotationsachsen ineinander überführbar (siehe Abb. 15A, C). In $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ sind die beiden Helizes $\alpha 1(\prime)$ antiparallel angeordnet und interagieren über eine hydrophobe Kontaktfläche (Abb. 33A). Der wichtigste Dimer-Dimer-Kontakt wird durch die Seitenketten der beiden His38 aufgebaut. Diese bilden gegabelte Wasserstoffbrücken zu den Peptidrückgrat-Carbonylgruppen von Ala45 und Lys46 des benachbarten Dimers und fixieren so die Positionen der Helizes (Abb. 33). Daneben stehen die Seitenketten von Ile42 und Ala45 beider Dimere in hydrophobem Kontakt und verdecken eine ansonsten Lösungsmittel-zugängliche Fläche von 550 \AA^2 . Eine vollständige Liste aller beteiligten Kontakte und Abstände wird im Anhang 6.3 aufgeführt.

Interessanterweise sind die beiden Dimer-Dimer-Kontakte in den beiden Strukturen $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ und $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ fast identisch. Dies wird in einer Überlagerung der Dimere A/A' und entsprechender Verschiebung der restlichen Struktur in Abb. 33B deutlich. Obwohl nur die Dimere A/A' überlagert wurden, stimmen die Positionen der am Dimer-Dimer-Kontakt beteiligten Helices $\alpha 1(\prime)$ der Kette B(\prime) sehr gut überein und die gegabelten H-Brücken, die von den His38(\prime) ausgehen, sind identisch. Lediglich die beiden Ile42(\prime) nehmen unterschiedliche Rotameren-Konformationen ein. Die strukturellen Übereinstimmungen in den Dimer-Dimer-Kontakten der beiden Strukturen erklären, warum die gleichen Dissoziations-Konstanten von 20 nM für die Bindung des ω -Repressors an die beiden minimalen Operatoren $(\rightarrow\rightarrow)$ und $(\rightarrow\leftarrow)$ gemessen wurden (de la Hoz *et al.*, 2004).

Wird der Abstand zwischen zwei Heptaden durch den Einschub von einem oder von bis zu sieben Basenpaaren vergrößert, wird eine fünf- bis sechsfach reduzierte Bindungsaffinität gegenüber aufeinander folgenden Heptaden gemessen. Folglich ist es für die Bindungsaffinität unerheblich, ob nur ein oder gleich mehrere Basenpaare eingefügt werden (de la Hoz *et al.*, 2004). Eine naheliegende Erklärung ist, dass die kooperative Bindung schon durch die Einführung eines einzigen zusätzlichen Basenpaares zwischen die Heptaden aufgehoben wird. Die vorliegende Struktur

unterstützt diese Erklärung. Sie zeigt, dass bei erhöhtem Abstand der Dimere die Wasserstoffbrücken aufgebrochen werden und die hydrophoben Seitenketten der Reste Ile42(') und Ala45(') zu weit voneinander entfernt sind, um Wassermoleküle vollständig aus der Grenzfläche ausschließen zu können.

Demgegenüber erscheinen die gemessenen Bindungskonstanten von 100 bis 120 nM im Vergleich zur Bindungskonstante für die Bindung eines ω -Dimers an eine einzelne Heptade (>500 nM) recht niedrig. Eine Erklärung für diesen scheinbaren Widerspruch kann nicht geliefert werden.

Natürliche Operatorregionen des ω -Repressors auf Plasmiden der *inc18* Familie besitzen mindestens 4 aufeinander folgende Heptaden (Abb. 41), und bei der Besetzung aller Heptaden sollten die Helizes $\alpha 1$ an Dimer-Dimer-Kontakten beteiligt sein (siehe Modell in Abb. 40), um so eine verstärkte kooperative Bindung an mehrere aufeinander folgende Heptaden zu ermöglichen.

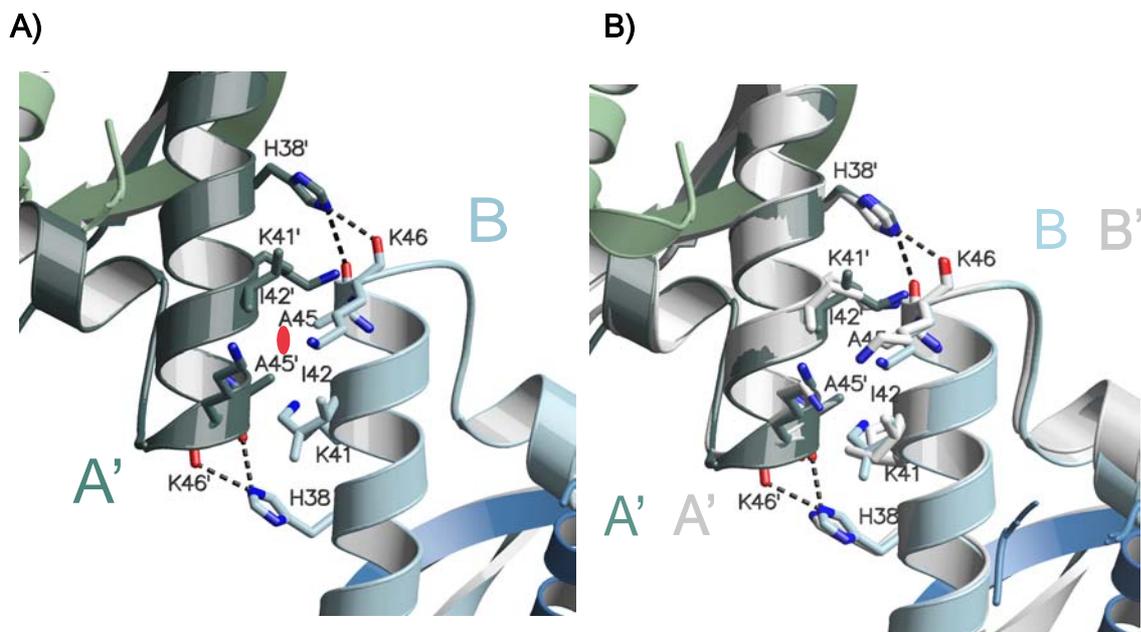


Abbildung 33 Die Dimer-Dimer Kontakte.
 (A) Interaktionen zwischen benachbarten $\Delta 19\omega$ -Dimeren in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$. Aminosäurereste der Helizes $\alpha 1$ beider am Dimer-Dimer-Kontakt beteiligten Monomere mit $<4 \text{ \AA}$ Abstand zur Nachbar-Dimer sind als Stabmodelle dargestellt. Wasserstoffbrücken werden durch gestrichelte, schwarze Linien gekennzeichnet. Die pseudo- C_{2D} -Rotationsachse Achse (rote Ellipse) liegt senkrecht zur Papierebene.
 (B) Überlagerung der Dimere A/A' der beiden Strukturen $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ (grün/blau wie in (A)) und $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ (grau), die Dimere B/B' wurden entsprechend mitbewegt. H-Brücken und Beschriftung von Polypeptidketten und Aminosäuren wie in (A). Insbesondere die Positionen und Konformationen der His38(') Reste sind identisch, während die hydrophoben Seitenketten von Ile42(') verschiedene Konformationen einnehmen.

3.9 Vergleich von $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ und $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$

In Abb. 34 sind die beiden Dimere A/A' der beiden Komplexe $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ und $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ überlagert und die restliche Struktur entsprechend mitbewegt, um Unterschiede der Positionen der benachbarten Dimere B/B' in beiden Komplexen darzustellen. Wie in Kap. 3.5.1 dargelegt, passieren die pseudo-C_{2M}-Rotationsachsen der $\Delta 19\omega$ -Dimere die gebundenen Heptaden um 0,3 Å von der Mitte des zentralen GC-Basenpaars in 3'-Richtung verschoben. Das bedeutet, dass die Dimere in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ einen Abstand von exakt 7-bp zueinander einhalten (wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben, werden sie durch $7/_{10}$ -Rotation und Translation um 7-bp ineinander überführt), in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ nähern sie sich jedoch um 0,6 Å, da die dort vorhandene pseudo-C_{2D}-Rotationsachse die Dimere samt gebundenen Heptaden ineinander überführt (Abb. 14). In der Überlagerung der Dimere A/A' in Abb. 34 werden anhand der eingezeichneten pseudo-C_{2M}-Rotationsachsen die unterschiedlichen Abstände der Dimere in beiden Strukturen veranschaulicht.

Wie in Kap. 3.8 erörtert, stimmen die Positionen der am Dimer-Dimer Kontakt beteiligten Helizes $\alpha 1$ der Dimere B/B' in beiden Strukturen sehr gut überein, während die restlichen Teile der Dimere bis zu 3 Å Abweichung in den C α -Positionen aufweisen (Abb. 34). Ein wesentlicher Unterschied in der Struktur von $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ ist der Knick der lokalen Helixachse von 12° in der Heptade A8-T14. Dieser bewirkt, dass die Positionen der weit von der Dimer-Dimer Kontaktfläche entfernten Regionen des Dimers B'/B wesentlich schlechter mit dem entsprechenden Dimer B/B' in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ übereinstimmen.

Die Überlagerung zeigt zudem, dass innerhalb der durch das β -Faltblatt und die Helizes $\alpha 2$ vermittelten starren Kernregion der $\Delta 19\omega$ -Dimere keine Konformationsänderungen auftreten. Hingegen kann die Position der Helix $\alpha 1$ relativ zur Kerndomäne variieren, wie anhand der unterschiedlichen Positionen der Dimere B/B' bei gleicher Lage der Helix $\alpha 1$ im Dimer-Dimer-Kontakt deutlich wird. Diese variable Positionierung der Helix $\alpha 1$ relativ zur starren Kerndomäne erlaubt die asymmetrische Bindung unterschiedlich orientierter Heptaden in $(\rightarrow\rightarrow)$ - und $(\rightarrow\leftarrow)$ -DNA, ohne dass ein Verlust an Bindungsaffinität in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ und $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ bewirkt wird.

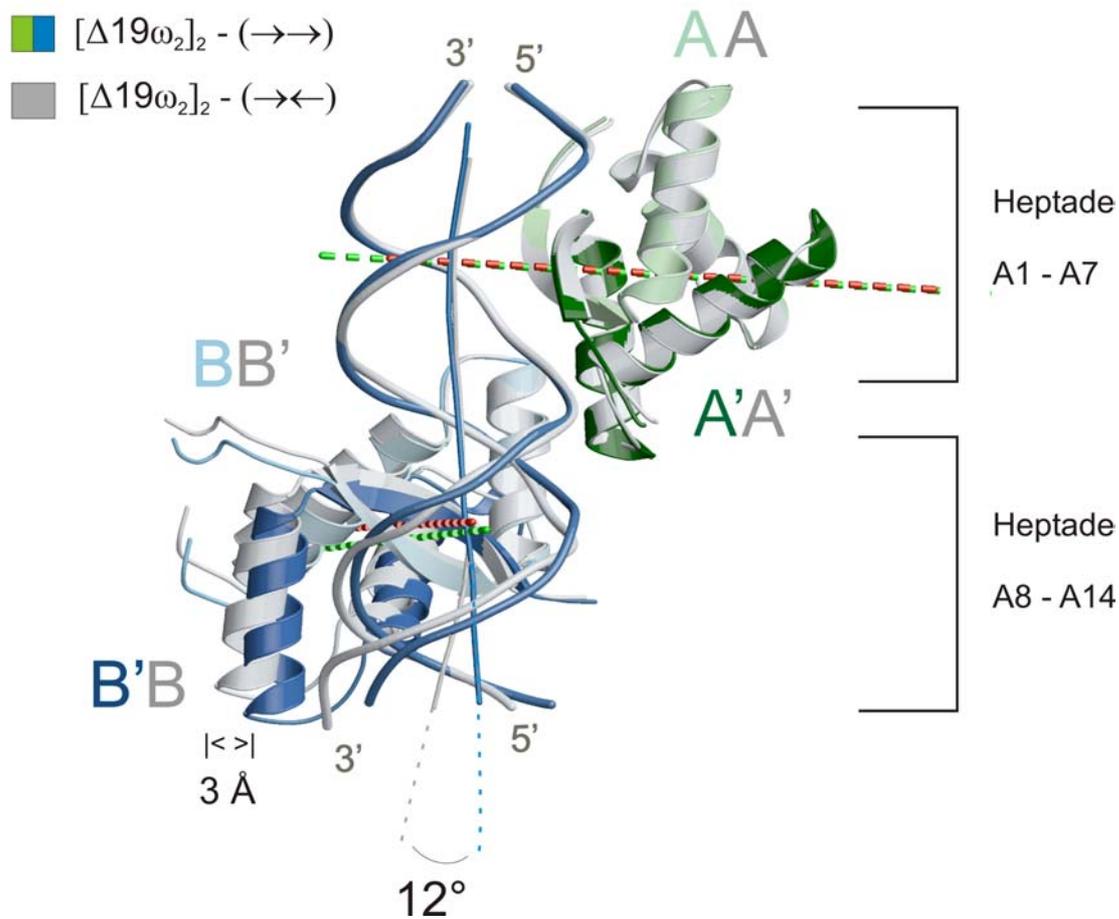


Abbildung 34 Die $\Delta 19\omega$ -Dimere A/A' der Strukturen $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ (Dimere in grün und blau dargestellt) und $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ (Dimere in grau) wurden überlagert, um Änderungen der Positionen von Dimer B/B' darzustellen, die durch palindromische Symmetrie der $(\rightarrow\leftarrow)$ -DNA hervorgerufen werden. Die pseudo- C_{2M} -Rotationsachsen werden durch gestrichelte Linien (Achsen der Dimere in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ in rot) dargestellt, und schneiden fast die lokalen DNA-Helixachsen. Helizes $\alpha 1'$, die an Dimer-Dimer Interaktionen beteiligt sind, überlagern sehr gut und erlauben kooperative DNA-Bindung in beiden Komplexen. Die DNA in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ ist im Zentrum der Heptade A8-T14 lokal um 12° gebogen, und beide $\Delta 19\omega$ -Dimere sind $0,6 \text{ \AA}$ näher zueinander als in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$, wie mit Hilfe der Distanzen zwischen den entsprechenden pseudo- C_{2M} -Achsen berechnet wurde. Alle vier $\Delta 19\omega$ -Dimere überlagern gut mit ihren $C\alpha$ -Atomen (rms Abweichung von $0,3 \text{ \AA}$), wenn die jeweils gebundenen Heptaden in die gleiche Richtung weisen. Zeigen diese jedoch in entgegengesetzte Richtungen, wird eine rms Abweichung von $0,6 \text{ \AA}$ gemessen. Diese Asymmetrie ist auf die pseudo- C_{2D} -Rotationsachse zurückzuführen, die die Heptaden in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ ineinander überführt. Diese Achse fehlt in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$, und die Dimere samt gebundener Heptade können dort durch Rotation/Translation ineinander überführt werden (siehe auch Abb. 15 und Kap. 3.4.2).

3.10 Konsistenz mit biochemischen Befunden

3.10.1 Mutationen des ω -Repressors

3.10.1.1 Mutationen der Reste Thr29 und Arg31

Anhand der Kristallstrukturen von $\Delta 19\omega_2$ im Komplex mit ($\rightarrow\rightarrow$) und ($\rightarrow\leftarrow$)-DNA konnte gezeigt werden, dass die Reste Thr29 und Arg31 direkt Basen in der großen Furche der DNA erkennen (Kap 3.5).

Die Validität der Kristallstruktur und der Reste, welche direkte Kontakte zu Nukleinbasen ausbilden, als Modell für ω_2 -gebundene natürliche Operatoren wurde durch Mutagenese sowohl des Proteins (F. Pratto, pers. Mitteilung) als auch der Sequenz der Heptaden bestätigt (de la Hoz *et al.*, 2004).

So konnte für die WT Mutante ω Thr29Ala *in vivo* keine Repression des $P\omega$ Promotors festgestellt werden (Tab. 11). *In vitro* wurde anhand von DNaseI-Verdau-Experimenten eine 50-fach niedrigere Affinität von ω_2 Thr29Ala an P_{copS} Operator-DNA gemessen (Abb. 35B), und EMSA Studien (*electrophoretic mobility shift assay*) (Abb. 35A) zeigten, dass ω_2 Thr29Ala nur bei sehr hohen Konzentrationen $>2 \mu\text{M}$ in der Lage ist, unspezifisch an P_{copS} Operator-DNA zu binden. Diese Befunde lassen Thr29 eine essentielle Bedeutung sowohl für die Affinität als auch für die Sequenzspezifität der Bindung von ω_2 an die Heptaden zukommen.

Um die Bedeutung von Arg31 für die DNA-Bindung zu bestimmen, wurde von Djordje Franzuski die Mutante ω Arg31Ala hergestellt und Lubomir Dostal (MDC, Berlin-Buch) für Raman-spektroskopische Studien zur Verfügung gestellt. Die aufgenommenen Raman-Spektren zeigten, dass die in Anwesenheit von Operator-DNA und ω_2 charakteristischen Banden für spezifische DNA-Erkennung nicht in Anwesenheit von ω_2 Arg31Ala reproduziert werden konnten (Lubomir Dostal, Dissertation 2005). Ob eine unspezifische Bindung mit stark erniedrigter Bindungsaffinität auftritt, wie für die Mutante ω_2 Thr29Ala beobachtet, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Auf eine weitere Charakterisierung dieser Mutante wurde verzichtet.

Tabelle 11 Nutzung des *P_ω:lacZ*-Operons in Anwesenheit von ω -Varianten in *B. subtilis* Zellen.

Die Aktivität wurde durch den *P_ω* Promotor spezifiziert, der an das Promotorlose Gen *lacZ* angefügt wurde und durch ein doppeltes *crossing-over* ektopisch in das *B. subtilis* Genom in An- oder Abwesenheit der angegebenen Genprodukte eingeführt wurde. Aliquots von *B. Subtilis* Zellen wurden bis zu einer OD von 0,5 - 1,0 kultiviert, pelletiert und resuspendiert in Puffer Z (enthält u. a. 0,4 g/mL Lysozym, siehe (de la Hoz *et al.*, 2000)). Nach 5 min Inkubation bei 37° C wurden ClCH₃ und SDS (Endkonzentration 0,002% (w/v)) hinzugefügt, gemischt und die Lysate durch Zentrifugation von Schwebeteilchen befreit (5 min, 13.000×g). Die β -Galaktosidaseaktivität in den Zelllysaten wurde wie in (de la Hoz *et al.*, 2000) beschrieben quantifiziert und ist in Miller-Einheiten angegeben. Die Messungen wurden von F. Pratto durchgeführt.

Gene provided <i>in trans</i>	β -Galaktosidase activity, <i>P_ω:lacZ</i>
None	310
<i>pHP14</i> (control)	298
<i>WT</i> ω	7
$\Delta 19\omega$	13
<i>ωThr29Ala</i>	314
<i>ωHis38Val</i>	52

3.10.1.2 Die Mutante ω His38Ala im Dimer-Dimer Kontakt

Der Dimer-Dimer Kontakt in den Komplexen $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ und $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ wird wesentlich durch die gegabelten H-Brücken zwischen His38(′) und den Carbonyl-Gruppen von Ala45(′) und Lys46(′) stabilisiert (Abb. 33). Um die Bedeutung von His38 für die kooperative Bindung von ω_2 an natürliche Operatoren *in vivo* zu beurteilen, wurde von F. Pratto die Mutante *ωHis38Val* hergestellt. Das eingeführte Val38 sollte H-Brücken zum Nachbar-Dimer verhindern, gleichzeitig sollte die hydrophobe Natur des Dimer-Dimer-Kontaktes erhalten bleiben und die Kooperativität der Bindung möglichst nicht durch Verkleinerung der Dimer-Dimer Grenzfläche geschwächt werden. Die Variante ω_2 His38Val vermochte die Nutzung des *P_ω* Promotors mit siebenfach schwächerer Effizienz gegenüber WT ω_2 zu unterdrücken (Tab. 11), d. h., die sequenzspezifische Bindung an den *P_ω* Promotor bleibt bei eingeschränkter Kooperativität der Bindung bestehen.

3.10.2 Biochemische Studien zur Bindung von ω_2 an die Heptaden

Die Erkennungssequenz 5'-^A/_T ATCAC ^A/_T-3' der Heptaden des ω -Repressors in den Plasmiden der *inc18* Familie ist hoch konserviert, wie durch das Fehlen von Mutationen in den natürlich vorkommenden Operatoren deutlich wird (Abb. 41). Die Analyse der DNA-Parameter und der Vergleich der freien und Repressor-gebundenen ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA in der Struktur von $[\Delta 19\omega_2]_2(\rightarrow\rightarrow)/(\rightarrow\rightarrow)$ in Kap. 3.6 zeigte, dass die Konformationen der Heptaden wesentlich durch die DNA-Sequenz bestimmt und nicht durch die Bindung von $\Delta 19\omega_2$ induziert werden. Die im folgenden beschriebenen biochemischen Studien bestätigen, dass einige Mutationen von Basenpaaren, die nicht direkt von $\Delta 19\omega_2$ kontaktiert werden, trotzdem eine starke Erniedrigung der Bindungsaffinität nach sich ziehen.

3.10.2.1 Affinität von ω_2 an mutierte Heptaden

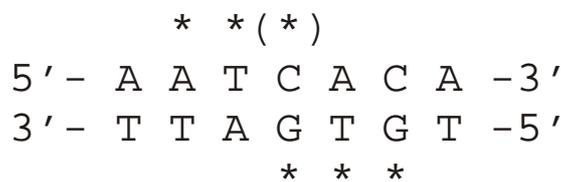
Von de la Hoz *et al.* (2004) wurde jede Base der Heptade am 5'-terminalen Ende von zwei direkt wiederholten Heptaden systematisch mutiert. Die erhaltenen Konstrukte wurden anschließend mittels DNaseI-Verdau-Experimenten auf ihre Bindungsaffinität zu ω_2 getestet. Die Ergebnisse sind insgesamt konsistent mit in den Kristallstrukturen beobachteten Wechselwirkungen, da Mutationen der an Protein-DNA-Kontakten beteiligten mittleren fünf Nucleotide der Heptade (5'-A ATCAC A-3') auch eine mindestens vierfache Schwächung der Bindungsaffinität hervorriefen. Den größten Verlust an Bindungsaffinität zeigten Mutationen in der ⁴CAC⁶-Region, die eine etwa achtfache Erniedrigung der Affinität bewirkten.

Es gibt zwei allgemeine Prinzipien der sequenzspezifischen Erkennung in Protein-DNA-Komplexen, und Otwinowski *et al.* (1988) führten nützliche Begriffe ein, um diese zu beschreiben: „Direktes Auslesen“ erfolgt durch komplementäre H-Brücken zwischen den Aminosäure-Seitenketten und Basen in den Furchen der DNA (Seeman *et al.*, 1976). Das „Indirekte Auslesen“ umfasst die Erkennung der sequenzspezifischen, konformationellen Variation oder Flexibilität der DNA selbst. Jedes ω_2 erkennt eine Heptade durch direkte Interaktionen der Seitenketten von Thr29 und Arg 31 mit den CG-Basenpaare der ⁴CAC⁶-Region. Mutationen anderer Basenpaare würden diese Interaktionen nicht sterisch behindern, dennoch führen Mutationen an der 2., 3. und 5. Position der Heptade zu erheblich herabgesetzten Affinitäten, welche nur durch ein „Indirektes Auslesen“ erklärt werden können.

Wie in der Analyse der DNA-Parameter in Kap. 3.6 beschrieben, zeigt die freie ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA in den CAC-Regionen einige charakteristische Abweichungen von den Geometrien idealer B-DNA, und die gleichen Abweichungen wurden auch für die Repressor-gebundene ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA beobachtet. Der ω -Repressor ist demnach in der Lage, die Konformation der DNA auszulesen und besitzt die größte Bindungsaffinität zu DNA-Regionen, deren Konformation unter möglichst geringem Energieaufwand für eine perfekte Repressor-DNA-Bindung angepasst werden kann. Die Struktur der freien ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA zeigt, dass die Konformation der Erkennungs-Heptade zur Bindung des $\Delta 19\omega_2$ kaum angepasst werden muss (Kap. 3.6.2). Lediglich die Parameter *slide*, *helical twist* und *roll* einiger Basenpaare müssen leicht geändert werden (Abb. 28B,F,G).

3.10.2.2 Interaktionen mit dem Phosphatrückgrat der Heptaden

Von de la Hoz *et al.* (2000) durchgeführte Hydroxylradikal-Spaltungs-Experimente nach Bindung von ω_2 zeigten, dass sich die bestgeschützten Phosphodiesterbindungen in den Regionen 5'-AT-3' oder 5'-ATC-3' des „oberen“ Stranges (Abb. 14) sowie in der GTG-Region des Komplementärstranges befinden (Schema 1). In den Kristallstrukturen stehen bis auf C-4 alle Phosphatgruppen der genannten Nucleotide in Kontakt mit Aminosäuren von $\Delta 19\omega_2$ (Abb. 22), so dass eine sehr gute Übereinstimmung der biochemischen Daten mit beobachteten Interaktionen in den Strukturmodellen besteht.



Schema 1 Muster der durch ω_2 -Bindung bestgeschützten Phosphodiesterbindungen der Heptaden nach Hydroxylradikal-Spaltung. Mit einem „*“ markierte Nucleotide werden geschützt und stehen daher wahrscheinlich mit ω_2 in Kontakt (siehe Text).

3.11 Die Funktion des N-Terminus

3.11.1.1 Biochemische Studien zur Bindung von $\Delta 19\omega_2$ an DNA

Mittels EMSA-Studien wurde eine Dissoziations-Konstante von ~ 30 nM für die Bindung von $\Delta 19\omega_2$ an drei aufeinander folgende Heptaden in ($\rightarrow\rightarrow\leftarrow$) Anordnung gemessen (Abb. 35C,D). Im Vergleich zu WT ω_2 , das mit einer k_D von ~ 15 nM an denselben Operator bindet, kommt dies einer Verdopplung der k_D gleich. Im Falle einer Beteiligung des N-Terminus an der direkten DNA-Bindung wäre ein erheblich größerer Unterschied in der Bindungsaffinität zu erwarten gewesen. Demnach ist der N-Terminus wahrscheinlich nicht an der direkten DNA-Bindung beteiligt. Die Verdopplung der Bindungskonstanten könnte z. B. im Verlust weitreichender elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen den drei positiv geladenen Resten der 19 N-terminalen Aminosäuren (Abb. 2) und dem negativ geladenen Phosphodiester-rückgrat der DNA begründet sein.

Das Gel der DNaseI-Verdau-Reaktionen in Abb. 35D zeigt außerdem, dass die Bindung von $\Delta 19\omega_2$ am Ende der dritten Heptade eine Phosphodiesterbindung für die Spaltung sensibilisiert. In Anwesenheit von WT ω_2 sowie ω_2 Thr29Ala werden keine sensibilisierten Spaltstellen beobachtet (Abb. 35C,E). Aufgrund der Größe des DNaseI-Enzyms sind die Schnittstellen bevorzugt außerhalb der Heptaden-Regionen anzutreffen. Um die sensibilisierte Phosphodiesterbindung zu schneiden, müsste vorher ein $\Delta 19\omega_2$ abdiffundieren, um die Spaltstelle freizugeben. Eine Erklärung für dieses Verhalten im Zusammenhang mit dem verkürzten $\Delta 19\omega$ -Protein gibt es bislang nicht.

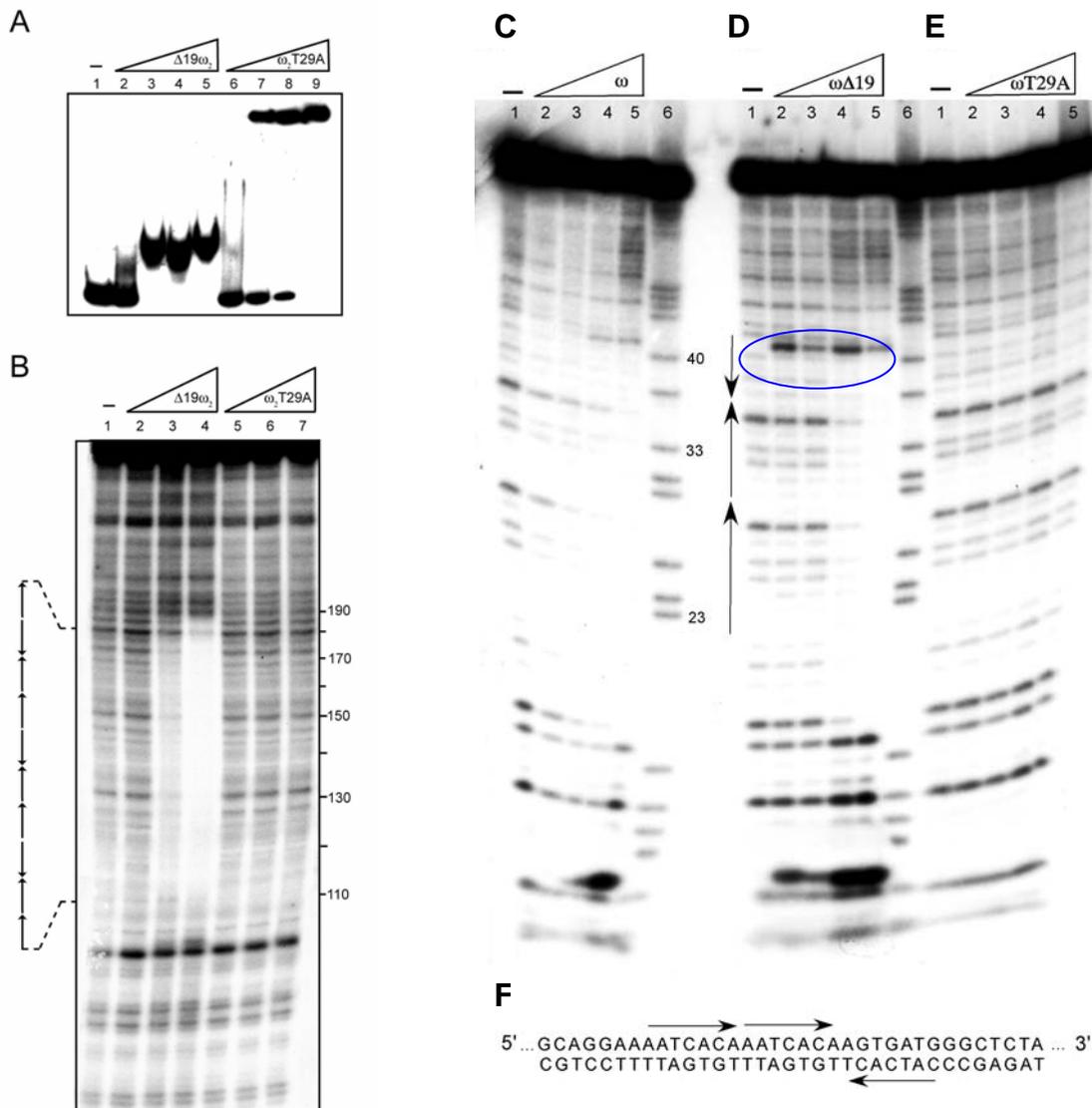


Abbildung 35 (A) Von F. Pratto (pers. Mitteilung) angefertigte elektrophoretische Untersuchung der Mobilitäts-Verschiebung (EMSA). 300-bp lange [$\alpha^{32}\text{P}$]-*HindIII-KpnI PcopS* DNA (am 3'-Ende des "unteren" Stranges markiert) (0.2 nM) und 1 μg poly[d(I-C)], als unspezifisch bindende, konkurrierende DNA, wurden mit steigenden Konzentrationen von $\Delta 19\omega_2$ oder $\omega_2\text{T29A}$ für 15 min bei 37°C inkubiert. Die gebildeten ω_2 -DNA Komplexe wurden durch EMSA analysiert. Die $\Delta 19\omega_2$ -Konzentrationen betragen 10, 20, 40, und 60 nM (Spuren 2 bis 5), und $\omega_2\text{T29A}$ Konzentrationen 1, 2, 4.5 und 9 μM (Spuren 6 bis 9 kennzeichnen unspezifische Bindung von $\omega_2\text{T29A}$ an DNA). Das Symbol "-" zeigt die Abwesenheit von Protein an. (B) DNaseI-*foot printing* von $\Delta 19\omega_2$ -DNA bzw. $\omega_2\text{T29A}$ -DNA Komplexen. Das 300-bp lange [$\alpha^{32}\text{P}$]-*HindIII-KpnI* DNA-Fragment mit (→←→←→←→←→←→) wurde mit ansteigenden Proteinkonzentrationen für 15 min bei 37°C inkubiert, um anschließend limitiert von DNaseI verdaut zu werden. Die $\Delta 19\omega_2$ -Konzentrationen betragen 7, 15 und 30 nM (Spuren 2 bis 4) und die $\omega_2\text{T29A}$ -Konzentrationen 1, 2 und 4 μM (Spuren 5 bis 7). Die Anzahl, Positionen und Orientierungen der Heptaden werden durch Pfeile markiert. Die Nummern an der rechten Seite des Feldes beziehen sich auf die Positionen der Nucleotide in der Sequenz der verwendeten DNA. (C-E) EMSA wie unter (B) beschrieben, die Konzentrationen von ω_2 (C) und $\Delta 19\omega_2$ (D) in den Spuren 2 bis 5 betragen 10, 20, 40, and 60 nM. In (E) betragen die Konzentrationen von $\omega_2\text{Thr29Ala}$ in den Spuren 2 bis 5 1; 2; 4,5 und 9 μM . A + G Maxam-Gilbert-Sequenzierungen sind jeweils in den 6. Spuren aufgetragen und dienen als Längenstandard. In (F) ist die Sequenz der drei Heptaden aus (C-E) angegeben. Das blaue Oval in (D) kennzeichnet die für die Spaltung sensibilisierten Bereiche innerhalb der Heptaden-Sequenzen.

3.11.2 Der N-Terminus interagiert mit dem δ -Protein

Wie einleitend in Kap. 1.6.1 beschrieben, sorgen kurz vor der Zellteilung ParA/ParB-Systeme für die aktive Verteilung (Partitionierung) der Plasmide auf die Tochterzellen (Ebersbach und Gerdes, 2004; Gerdes *et al.*, 2004). Während ParB die Bindung zwischen der ParA-ATPase und dem Plasmid vermittelt, sorgt ParA durch Polymerisation unter Ausbildung von Filamenten für die entgegengesetzt gerichtete Bewegung der Plasmide zu den Zellpolen. Die Kristallstruktur des Proteins δ im Komplex mit γ S-ATP wurde kürzlich mittels Molekularen Ersatzes unter Verwendung der Struktur des sequenzhomologen Soj-Proteins (siehe unten) als Suchmodell bei einer Auflösung von 1.95 Å bestimmt (Aslan Cicek, Dissertation in Vorbereitung).

Die Bestimmung der ATP-Hydrolyseaktivität des δ -Proteins in Anwesenheit von WT ω -Protein erwies zweifelsfrei, dass die ATP-Hydrolyseaktivität des δ -Proteins durch WT ω_2 stimuliert wird, während $\Delta 19\omega_2$ keine Änderung der Hydrolyseaktivität hervorrief. Deshalb interagiert sehr wahrscheinlich der N-Terminus des ω -Repressors mit dem Protein δ (Aslan Cicek, Dissertation in Vorbereitung). Die Verstärkung der ATP-Hydrolyse durch ein regulatorisches Partnerprotein (ParB) ist allen Mitgliedern der ParA Familie gemein (Davis *et al.*, 1996; Fung *et al.*, 2001).

Ein weiteres Indiz, dass ω der gesuchte ParB-Partner ist, liefert die Beobachtung, dass das δ -Protein nur in Anwesenheit der Komponenten WT ω -Repressor, lineare DNA und ATP Nucleoprotein-Filamente bildet, die elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht werden konnten. Wahrscheinlich wird die DNA von ω -Repressor und δ -Protein umgeben (Aslan Cicek, Dissertation in Vorbereitung).

Kürzlich wurde das ParA/ParB-System für die Verteilung der Chromosomen von *Thermus Thermophilus* mit den Proteinen Soj (ParA) und SpoOJ (ParB) untersucht. Anhand der Struktur des Soj-Proteins wurde ein möglicher Interaktionsmechanismus mit dem N-terminalen Bereich des Helix-Turn-Helix-Proteins SpoJ postuliert (Leonard *et al.*, 2005). SpoJ besitzt mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls einen 20 Reste langen unstrukturierten N-Terminus, der möglicherweise in die Furche zwischen den Untereinheiten des Soj-Dimers bindet, wo sich auch die beiden ATP-Bindungstaschen befinden.

Obwohl SpoOJ kein RHH-Motiv zur DNA-Erkennung besitzt, gibt es eindeutige Parallelen zum ω -Repressor, denn beide Proteine besitzen einen etwa 20 Aminosäuren langen N-terminalen Bereich, der von der DNA-bindenden Domäne

gefolgt wird, und dieser N-terminale Bereich bindet in beiden Fällen an die struktur- und sequenzzhomologen Proteine ω bzw. δ .

Möglicherweise analog funktioniert des Actin-ähnliche Protein ParM, das an der aktiven Partitionierung des Plasmids R1 beteiligt ist (Moller-Jensen *et al.*, 2002; van den Ent *et al.*, 2002). ParM bildet Filamente, die später unter Hydrolyse des gebundenen ATPs abgebaut werden. Ein möglicher Antriebsmechanismus für die Verteilung der Plasmide kurz vor der Zellteilung ist in Abb. 36 dargestellt. Der Auslöser für die Bindung der Proteine ω und δ an DNA und damit für die erfolgreiche Verteilung der Plasmide ist bisher nicht geklärt.

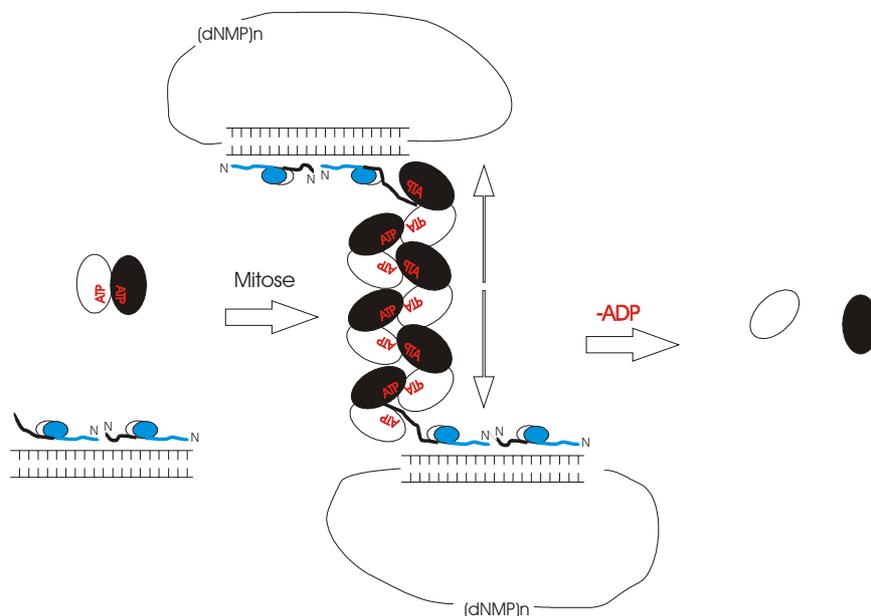


Abbildung 36 Möglicher Mechanismus für die aktive Verteilung (Partitionierung) der Plasmide der *inc18* Familie während der Zellteilung (Mitose). δ -Protein liegt in Lösung in ATP-gebundener Form als Dimer vor (Aslan Cicek, Dissertation in Vorbereitung). Kommt es zur Zellteilung, binden die δ -Dimere an die N-Termini der kooperativ an Operator-Regionen gebundenen ω -Dimere, so dass eine Konformationsänderung der δ -Dimere hervorgerufen wird und die Polymerisation der δ -Dimere auslöst wird. Die mit der Polymerisation verbundene Filament-Bildung ist der Antrieb für die Bewegung der Plasmide (als (dNMP)_n bezeichnet) zu den Zellpolen. Die Hydrolyse von ATP sorgt schliesslich für den Abbau der Filamente.

Die Funktion des N-Terminus als Bindeglied zwischen Plasmid-DNA und δ -Protein deutet darauf hin, dass der N-Terminus tatsächlich nicht an der direkten DNA-Bindung beteiligt ist, und dass die in dieser Arbeit beschriebenen Strukturen den

in vivo Komplexen des WT ω -Repressors im Komplex mit natürlichen Operatoren entsprechen.

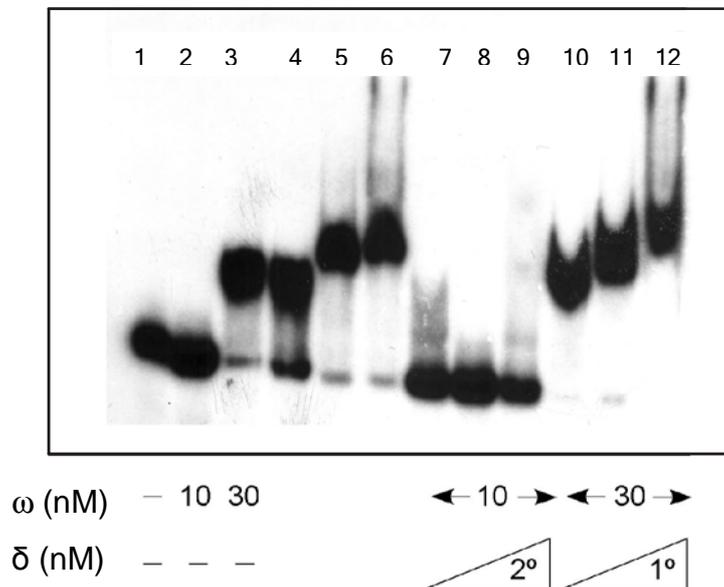


Abbildung 37 Von F. Pratto (pers. Mitteilung) angefertigter EMSA mit [α^{32} P]-markierten 76-bp langen DNA-Fragmenten in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen der WT Proteine ω und δ . Die Konzentrationsangaben für ω sind in nM, die Dreiecke kennzeichnen ansteigende Konzentrationen für δ -Protein von 0,35 (links) über 0,9 auf 1,4 μ M (rechts). Eine Konzentration von 30 nM ω ist nötig, um eine Bindung an die DNA-Fragmente hervorzurufen. Ansteigende Konzentrationen des δ -Proteins verschieben die Protein-DNA-Banden nach „oben“ zu höheren Molekulargewichten. Die Konzentrationen für die Proteine in den Banden 4 bis 6 sind nicht bekannt.

3.11.3 Vergleich mit Repressoren der MetJ/Arc-Überfamilie

Derzeit besteht die MetJ/Arc-Familie der RHH-Repressoren aus acht strukturell bekannten Proteinen:

MetJ (Rafferty *et al.*, 1989; Somers und Phillips, 1992),

Arc (Breg *et al.*, 1990; Raumann *et al.*, 1994; Schildbach *et al.*, 1995; Waldburger *et al.*, 1995),

CopG (Gomis-Ruth *et al.*, 1998),

Mnt (Burgering *et al.*, 1994),

ω (Murayama *et al.*, 2001),

ParD (Golovanov *et al.*, 2003) und

NikR (Schreiter *et al.*, 2003).

Für eine Reihe weiterer Proteine wie TraY (Bowie und Sauer, 1990; Lum *et al.*, 2002), 7kMk (Pavlov *et al.*, 2002) und mehrerer durch die pMV158 Plasmidfamilie kodierter, CopG ähnlicher Proteine konnte basierend auf Sekundärstruktur-Vorhersagen ebenfalls ein RHH-Motiv vorhergesagt werden (del Solar *et al.*, 2002). In Abb. 38 ist eine Anpassung der Aminosäuresequenzen einer Reihe der oben genannten RHH-Repressoren dargestellt. Die Anpassung zeigt deutlich, dass das zentrale RHH-Element eine ähnliche Anzahl von Aminosäuren für die Sekundärstrukturelemente und die dazwischen liegenden Schlaufenregionen umfasst. Der Hauptunterschied liegt in zusätzlich angefügten N- oder C-terminalen Domänen. Während das RHH-Motiv für die DNA-Bindung und Transkriptionskontrolle zuständig ist, scheinen die N- oder C-terminalen Domänen (mit Ausnahme des Cop-Repressors) zusätzliche Funktionen auszuüben. Beispielsweise ist die in Lösung flexibel vorliegende C-terminale Domäne des Antitoxins ParD für die Bindung an das Toxin ParE verantwortlich (Roberts *et al.*, 1993). Im Fall von MetJ übernimmt die C-terminale Region die Bindung des Co-Repressors S-Adenosyl-Methionin (Rafferty *et al.*, 1989). Der N-Terminus des Arc-Repressors wiederum formt eine 3_{10} -Helix, die mit der großen Furche der DNA interagiert (Raumann *et al.*, 1994). In vielen anderen Fällen muss die Rolle der zusätzlichen Domänen noch bestimmt werden.

Die bisher bestimmten Strukturen der RHH-Proteine im Komplex mit ihren Operatoren zeigten, dass jeweils drei Aminosäuren des β -Faltblatts direkte Kontakte zu Nucleobasen ausbilden. Im Falle des ω -Repressor sind es mit Thr29 und Arg31 nur zwei Reste. Für einige Proteine der MetJ/Arc-Überfamilie konnte gezeigt werden, dass Aminosäurereste an korrespondierenden Positionen für die Bindungsspezifität verantwortlich sind (Raumann *et al.*, 1995; Silbaq *et al.*, 2002). Obwohl die Sequenzanpassung der Repressoren der MetJ/Arc-Überfamilie mit Ausnahme von Gly48 in der die beiden Helizes verbindenden Schlaufenregion offensichtlich keine konservierten Regionen aufdeckt, zeigen strukturelle Vergleiche, dass immer mindestens ein basischer, positiv geladener Rest (Arg oder Lys) an direkten Kontakten zu Nucleobasen beteiligt ist, der sich an einer der oben genannten Positionen befindet. Die drei Positionen sind symmetrisch relativ zur Symmetrieachse des Dimers, die sich im Falle des ω -Repressors zwischen den beiden Thr29 Resten der beiden Untereinheiten befindet.

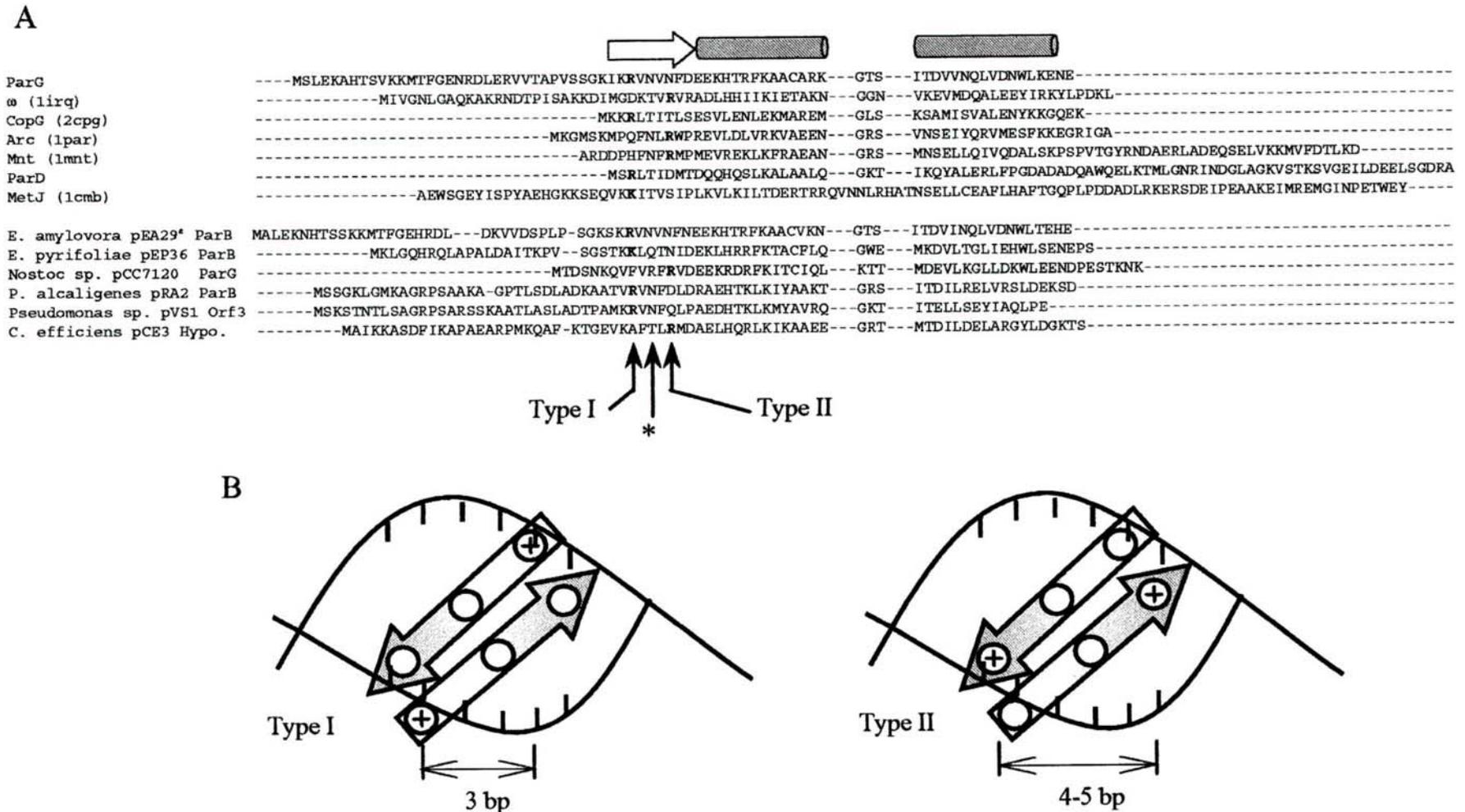


Abbildung 38 (A) Anpassung der Aminosäuresequenzen von RHH-Repressoren der MetJ/Arc-Überfamilie entnommen aus (Golovanov *et al.*, 2003). In Klammern sind die jeweiligen PDB Einträge aufgeführt. Sekundärstrukturelemente sind als Pfeile für β -Stränge und als Zylinder für α -Helizes von ParG angegeben. ParG und ω zeigen lange N-terminale Regionen. (B) Von Golovanov *et al.* (2003) vorgeschlagene Klassifizierung DNA-bindender Proteine mit RHH-Motiv. Die Orientierung des β -Faltblatts in der großen Furche ist für alle RHH-Proteine gleich. Außerdem ist das Vorhandensein eines positiven Restes innerhalb der Sequenz der β -Stränge (durch (+) angedeutet) ein gemeinsames Merkmal. Befinden sich die positiv geladenen Aminosäuren an den N-Termini der β -Stränge, liegen die kontaktierten Nucleobasen ~ 3 bp auseinander, befinden sie sich hingegen an den C-Termini der β -Stränge, so beträgt die Distanz ~ 5 bp.

Die verfügbaren Proteinsequenzen strukturell bestimmter RHH-Repressoren können aufgrund der Lage dieser basischen Reste an den N- oder C-Termini der β -Stränge in zwei Klassen eingeteilt werden. Im Falle von CopG, ParG, ParD und MetJ befinden sich die positiv geladenen Reste an den N-Termini der β -Stränge, während die Repressoren Arc, ω und Mnt einen basischen Rest an den C-Termini der β -Stränge aufweisen. Wie von Golovanov *et al.* (2003) beschrieben, die erste Gruppe Nucleobasen in der Lage Nucleobasen zu kontaktieren, die 3-bp auseinander liegen. Die zweite Gruppe hingegen kann Nucleobasen erkennen, die 4- bis 5-bp auseinander liegen, wie im Falle des Arc-Repressors (Raumann *et al.*, 1994). Der ω -Repressor gehört zur zweiten Gruppe die die basischen Reste an den N-Termini der β -Stränge aufweist, so dass theoretisch auch fünf Basenpaare zwischen direkt kontaktierten Nucleobasen liegen könnten. Da die Reste Thr29 und Arg31 beider Untereinheiten aber in definierten Konformationen vorliegen, bindet nur ein Arg31 direkt an ein Guanin der Erkennungs-Heptade (siehe Kap. 3.5.1).

3.11.3.1 Vergleich der RHH-Repressoren im Komplex mit DNA

Die Repressoren MetJ, CopG und Arc konnten im Komplex mit DNA kristallisiert und strukturell bestimmt werden (Tab. 12). Während Dimere von Arc und CopG asymmetrisch an die Operator-Halbseiten eines insgesamt palindromischen Operators binden, zeigt der MetJ-Repressor symmetrische DNA-Bindung zu palindromischen Erkennungssequenzen, die aus 8-bp bestehen und in natürlichen Operatoren zwei- bis fünffach wiederholt vorliegen. Der ω -Repressor vereint die asymmetrische Bindung an DNA und die vielfache Wiederholung derselben Erkennungssequenz. Jedoch kann beim ω -Repressor zusätzlich die Anordnung der Heptaden zueinander variiert werden. In Kapitel 3.9 wurde dargelegt, wie die unterschiedliche Anordnung der Heptaden den Abstand zwischen benachbarten Dimeren beeinflusst. Dieser Abstand beeinflusst den kooperativen Dimer-Dimer-Kontakt, und so könnte die Bindungsaffinität von ω_2 an natürliche Repressoren moduliert werden.

Kooperative Interaktionen zwischen $\alpha 1$ Helizes benachbarter Dimere werden auch für den MetJ-Repressor beobachtet (Abb. 39). Da die $\alpha 1$ Helix von MetJ wesentlich länger ist als in $\Delta 19\omega_2$, nimmt auch die Kontaktfläche deutlich zu: So werden bei Tetramerisierung zweier MetJ-Dimere 700 \AA^2 ansonsten Lösungsmittel-zugänglicher Oberfläche ausgeschlossen, hingegen sind es bei der Tetramerisierung von $\Delta 19\omega_2$ nur 550 \AA^2 . Welcher Bereich des RHH-Proteins an kooperativer Bindung beteiligt ist, hängt von

der Distanz der Bindungszentren der beteiligten Dimere ab. Die verschiedenen Dimer-Dimer-Kontakte können in Abb. 39 für die Repressoren $\Delta 19\omega$, MetJ, Arc und CopG jeweils im Komplex mit Operator-DNA verglichen werden. Bei der kooperativen Bindung spielt auch die Biegung der DNA eine wesentliche Rolle. Für den $\Delta 19\omega$ -Repressor konnte eine fast gerade Operator-DNA beobachtet werden, während die anderen drei Repressoren die gebundene DNA um 50-60° biegen. Für den CopG-Repressor wurde beobachtet das DNA-Bereiche außerhalb des palindromischen Operatorbereichs ebenfalls vor Hydroxylradikal-Spaltung geschützt werden, so dass CopG vermutlich (ausgehend von der hoch affinen Bindung an den palindromischen Operator) auf der DNA polymerisiert. Weiterhin liegen die Bindungszentren für zwei benachbarte CopG-Dimere 10-bp auseinander, und die DNA wird um 60° gebogen. Deshalb wird vermutet, dass sich die DNA um einen helikal angeordneten Kern von CopG-Dimeren aufwickelt.

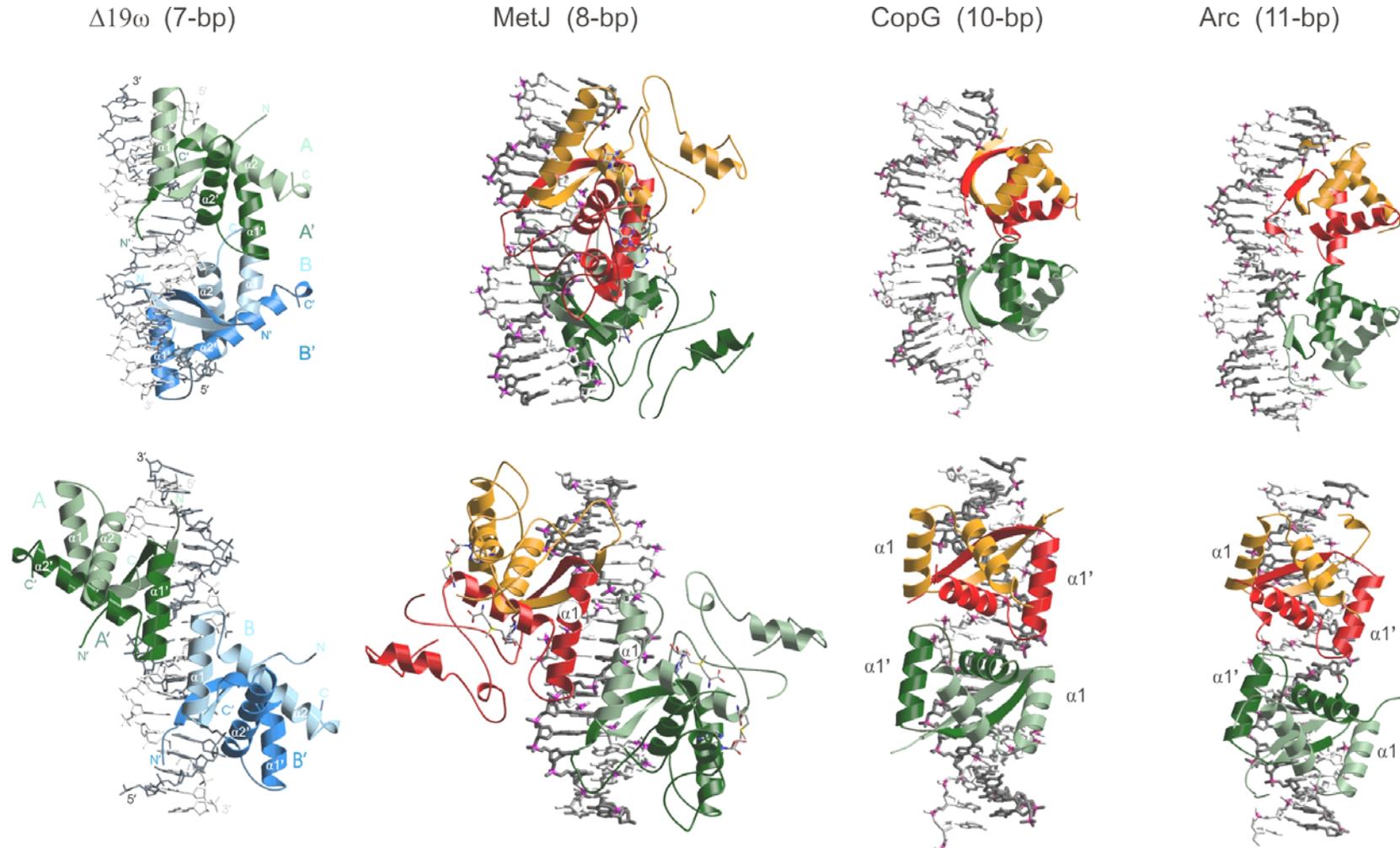
Für den Arc-Repressor wurde keine solche „Polymerisation“ auf der DNA beobachtet, während MetJ an zwei bis fünf Wiederholungen von acht Basenpaaren bindet und dabei möglicherweise eine linksgängige Protein-Matrix um die rechtsgängige Doppelhelix bildet. Da die DNA bei Bindung von zwei MetJ-Dimeren um 50° gebogen wird, liegt die Vermutung nahe, dass die DNA im Bereich der MetJ-Bindungsstellen superhelikal vorliegt.

Der ω -Repressor schließlich deformiert die DNA wesentlich weniger. Wie in Kap. 3.6.2 gezeigt werden konnte, sind die beobachteten Abweichungen von idealer B-DNA eher auf die Nucleotidsequenz zurückzuführen als auf Verzerrungen, die durch die Bindung des ω -Repressors induziert werden.

Tabelle 12

Vergleich charakteristischer Parameter der strukturell bekannten Repressoren der MetJ/Arc-Überfamilie. Alle Komplexe bestehen aus zwei RHH-Dimeren gebunden an die jeweilige Operator-DNA. Palindromische Sequenzen der Operator-DNA sind fett markiert. Die Lage der Schnittpunkte der pseudo-C₂_M-Rotationsachsen der Dimere mit den lokalen DNA-Helixachsen werden durch „_“ angegeben. „# bp“ gibt den Abstand zwischen zwei DNA-gebundenen RHH-Dimeren an. IR bedeute invertierte Wiederholung (*inverted repeat*).

(RHH ₂) ₂ -DNA PDB-Eintrag	Operator-Sequenz	# bp	# Wiederholungen	DNA-Biegung [°]	Symmetrie der RHH ₂ -DNA-Interaktionen	Dimer-Dimer-Kontakt	Klassifizierung (Siehe Abb. 38)
ω (→→) (2BNW), (→←) (2BNZ)	5'-AAT <u>CACA</u> AAT <u>CACA</u> -3' 5'- <u>AATCACA</u> AGT <u>GATT</u> -3'	7	4 - 10	3 12	Asym.	Helix α1	-
MetJ (1CMA)	5'- <u>AGAC_GTCT</u> AGAC_GTCTA-3'	8	2-5	50	Sym.	Helix α1	Typ I
CopG (1B01)	5'-ATTG_CATTGAGTG_CAC-3'	10	2 als IR	60	Asym.	Schlaufenregion zw. Helices α1 und α2 sowie Helix α2	Typ I
Arc (1PAR)	5'-AGT <u>AGAGTGCTTCT</u> _AT-3'	11	2 als IR	50	Asym.	Schlaufenregion zw. α1 und α2	Typ II

**Abbildung 39**

Vergleich der Kristallstrukturen der Repressoren $\Delta 19\omega$ (2BNW), MetJ(1CMA), Arc (1PAR) und CopG (1BO1) im Komplex mit Operator-DNA (in Klammern der zugehörige PDB Eintrag). Jeweils ein Dimer ist in orange/rot das zweite in hellgrün/dunkelgrün dargestellt, die DNA in grau mit Phosphoratomen in violett (für $[\Delta 19\omega_2]_2$ -($\rightarrow\rightarrow$) siehe Abb. 15). Die Ansicht in der oberen Reihe verdeutlicht die Krümmungen der Repressor-gebundenen DNA, die gleichen Strukturen sind in der unteren Reihe um 90° um eine vertikale Achse gedreht und zeigen die Dimer-Dimer-Kontakte. Die Zentren der Bindungsstellen für die Dimere von $\Delta 19\omega$ und MetJ sind durch 7-bp bzw. 8-bp getrennt und die Helizes $\alpha 1$ sind an Dimer-Dimer-Kontakten beteiligt. Die Dimere des Arc-Repressors interagieren über die Schlaufenregionen zwischen den Helizes $\alpha 1$ und $\alpha 2$, die des CopG-Repressors ebenfalls über diese Schlaufenregionen und zusätzlich über die Helizes $\alpha 2$.

3.11.4 Modell eines natürlichen ω -Repressor-Operator-Komplexes

Die in dieser Arbeit beobachteten Strukturen deuten darauf hin, dass $\Delta 19\omega$ bei der Bindung an natürliche Operatoren mit vier (*PcopR*) bis zu zehn (*PcopS*) aufeinander folgenden Heptaden (Abb. 41) eine linksgängige Protein-Matrix um die nahezu gerade Operator-DNA bildet. Anhand der Strukturen von $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ und $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ wurde die Oligomerisierung der $\Delta 19\omega$ -Dimere um den natürlichen Promotor *P ω* nachempfunden und in Abb. 40 dargestellt.

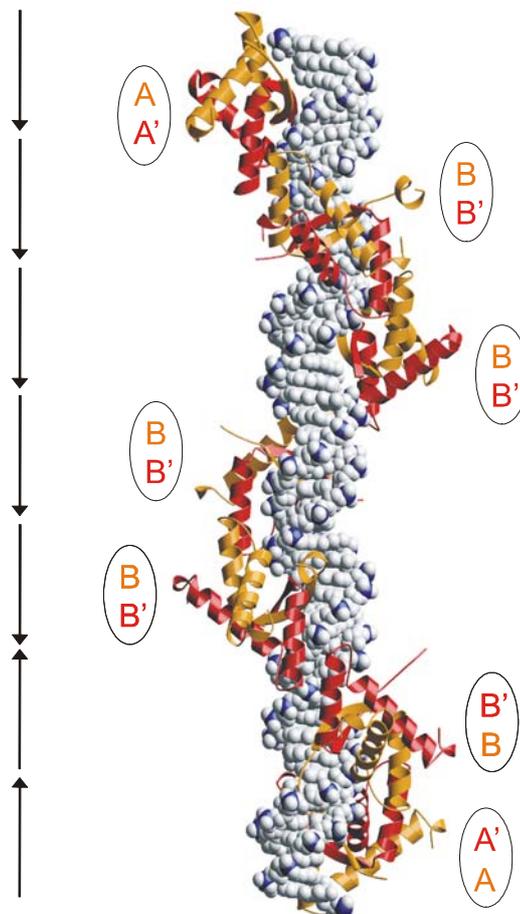


Abbildung 40 Modell von sieben aufeinander folgenden Heptaden des natürlichen Promotors *P ω* , welche von sieben $\Delta 19\omega_2$ besetzt werden. Die DNA ist als raumfüllendes Kugelmodell dargestellt, die $\Delta 19\omega$ -Dimere als Bändermodelle. Die Beschriftung der Untereinheiten ist analog zu den Strukturen in Abb. 15A,C. Die Orientierungen der Heptaden des Promotors werden durch Pfeile angegeben. Die fünf oberen, direkt wiederholten Heptaden und ihre gebundenen $\Delta 19\omega$ -Dimere wurden mit Hilfe der Struktur von $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ erstellt, welche vollständig im Bereich der oberen beiden Heptaden dargestellt ist. Das B/B'-Dimer (zweite Heptade von oben) dieses Komplexes wurde mit dem A/A'-Dimer eines weiteren $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ überlagert, aber nur das B/B'-Dimer und dessen Heptade wurde für den weiteren Aufbau des Komplexes verwendet. Für die invertiert wiederholten Heptaden wurde analog mit dem $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ verfahren. Die DNA zeigt im Bereich der invertiert wiederholten Heptaden eine Krümmung von $\sim 10^\circ$, und die $\Delta 19\omega$ -Dimere bilden eine linksgängige Protein-Matrix um die rechtsgängige DNA des *P ω* Promotors.

3.11.5 Von ω_2 reprimierte Promotoren der *inc18* Plasmidfamilie

Die *inc18* Plasmidfamilie zeichnet sich dadurch aus, dass die Plasmide in geringer Kopienzahl vorliegen, ein breites Wirtsspektrum von gram-positiven Bakterien zeigen und Mechanismen zur dauerhaften Erhaltung und Kontrolle der Kopienzahl der Plasmide aufweisen. Die Expression von Proteinen, die an diesen Mechanismen beteiligt sind, stehen unter Kontrolle des ω -Repressors. Die verschiedenen Promotorregionen auf den vier Plasmiden der *inc18* Familie pSM19035, pIP501, pAM β 1 und pSMB47, an welche der ω -Repressor bzw. der ω_2 -Repressor (siehe Kap. 1.6.3) bindet, sind in Abb. 41 dargestellt. Auffallend ist die starke Konservierung der Sequenz der Heptaden. Es werden keine Abweichungen von der Konsensus-Sequenz 5'-^A/_T ATCAC ^A/_T-3' beobachtet. Die Anzahl der Heptaden-Wiederholungen variiert in einem weiten Bereich von nur vier ($\rightarrow\rightarrow\leftarrow\rightarrow$) des Promotors *PcopR* auf dem Plasmid pAM β 1 bis zu zehn Wiederholungen für *PcopS* auf dem Plasmid pSM19035. Die Orientierungen der Heptaden innerhalb der Promotoren können in drei verschiedene Muster eingeteilt werden (de la Hoz *et al.*, 2000):

1. $(\rightarrow)_n$ mit $n = 2 - 5$
2. $(\rightarrow\rightarrow\leftarrow)_n$ mit $n = 1$ bis 3
3. $(\rightarrow\rightarrow\leftarrow\leftarrow)$ oder $(\rightarrow\rightarrow\leftarrow\rightarrow)$ am 3'-Ende des Promotors

Tabelle 13 $K_{D,app}$ in nM für die Menge an ω_2 , welche benötigt wird, um Heptaden in 2 nM DNA halb zu sättigen. Die Dissoziations-Konstanten wurden mit drei verschiedenen Methoden ermittelt: EMSA, DNaseI-Verdau-Experimente (*foot printing*) und Oberflächenplasmonresonanz (*surface plasmon resonance*, SPR). „n. d.“ bedeutet „nicht bestimmt“. Die Tabelle ist de la Hoz *et al.* (2004) entnommen.

Orientierung und # Heptaden	EMSA	DNaseI <i>footprinting</i>	SPR
(\rightarrow)	>500	>500	>500
$(\rightarrow\rightarrow)$	~90	~25	~20
$(\rightarrow\leftarrow)$	~20	~25	~20
$(\leftarrow\rightarrow)$	~120	~140	n. d.
$(\rightarrow\rightarrow\rightarrow)$	~12	~12	~10
$(\rightarrow\rightarrow\leftarrow)$	~12	~12	~10
$(\rightarrow\rightarrow\rightarrow\rightarrow)$	~8	~7	~6
$(\rightarrow\rightarrow\leftarrow\leftarrow)$	~6	~8	n. d.
$(\rightarrow\rightarrow\leftarrow\rightarrow)$	~14	~14	n. d.
$(\rightarrow\rightarrow\leftarrow)_3\rightarrow$	~4	~5	~6

Die Promotoren beginnen allesamt mit Mustern aus 1. und 2. und schließen mit einem Muster aus 3. ab. Die in dieser Arbeit erhaltene strukturelle Basis für die kooperative Bindung von $\Delta 19\omega_2$ an $(\rightarrow\rightarrow)$ und $(\rightarrow\leftarrow)$ lässt den Schluss zu, dass die Bindung von ω_2 an $(\leftarrow\rightarrow)$ deshalb schlechter ist, weil Wechselwirkungen zwischen den benachbarten Dimeren nicht optimal sind. $(\leftarrow\rightarrow)$ Anordnungen sorgen wahrscheinlich dafür, dass die kooperative Bindung an mehrere wiederholte Heptaden abgeschwächt wird. Nach diesem Modell sollten Operatoren, die keine Heptaden in $(\leftarrow\rightarrow)$ Anordnungen enthalten, die stärkste Affinität zu ω_2 zeigen; dies sind die Operatoren $P\delta$ von pSM19035 und $P\omega 2$ von pSMB47. Promotoren, die mehrere Wiederholungen der $(\rightarrow\rightarrow\leftarrow)$ Anordnung aufweisen, können über die Anzahl dieser Wiederholungen ihre Affinität zu ω_2 steuern. Aufgrund dieser Überlegungen wurde eine Abstufung für die Affinität von ω_2 zu den verschiedenen Operatoren vorgenommen (Abb. 41).

Zur Bestätigung dieser Theorie müssten jedoch weitere Bindungsstudien zur Bestimmung der Affinitäten von ω_2 für die verschiedenen Promotoren durchgeführt werden.

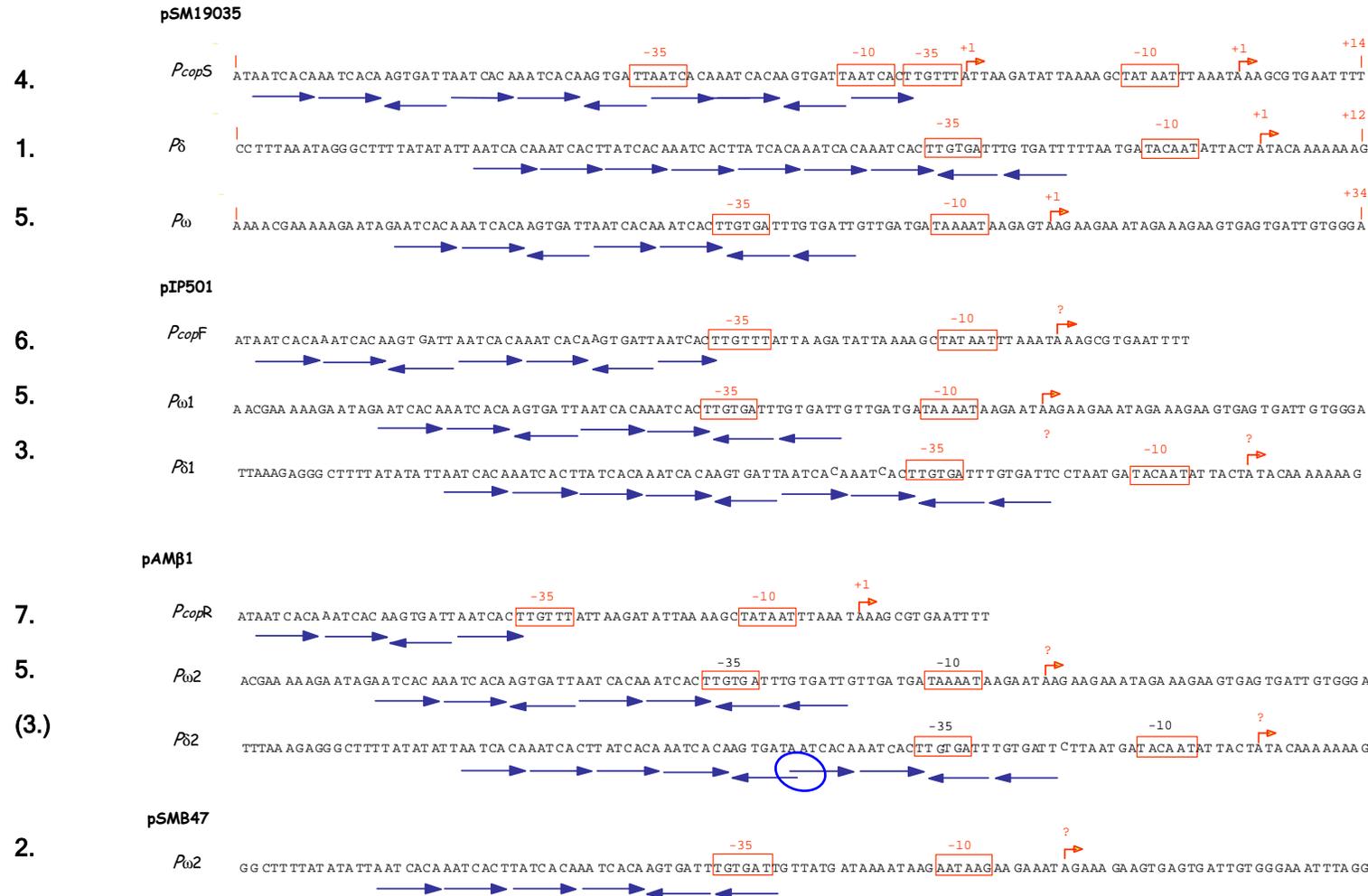


Abbildung 41 Vergleich der vom ω -Repressor regulierten Promotorregionen auf den Plasmiden pSM19035, pIP501, pAM β 1 und pSMB47 der *inc18* Plasmidfamilie. -35 und -10 Regionen der Promotoren sind rot eingerahmt. Geknickte Pfeile mit +1 darüber zeigen bekannte Startstellen der Transkription an und „?“ vermutete Startstellen. Die Heptaden (Sequenz: 5- A_T ATCAC A_T -3') und ihre Orientierungen zueinander werden durch blaue Pfeile unterhalb der Nucleotidsequenzen gekennzeichnet. Die überlappenden Heptaden des Promotors P δ 2 des Plasmids pAM β 1 (blauer Kreis) können nicht beide gleichzeitig von zwei ω_2 besetzt werden. Möglicherweise liegt hier ein Sequenzierungsfehler vor. Die linke Spalte zeigt eine Vorhersage aufgrund der bestimmten Kristallstrukturen für die Abstufung der Bindungsaffinität von ω_2 an die Promotoren in einer Rangfolge von 1. (höchste Affinität) bis 7. (geringste Affinität). Abbildung adaptiert von F. Pratto (pers. Mitteilung).