

Einleitung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die strukturelle Charakterisierung der genetischen Regulationseinheit der Tetracyclin-Resistenzklasse D mit kristallographischen Methoden.

1.1 Antibiotika

Antibiotika sind niedermolekulare Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen, die in geringer Konzentration das Wachstum von anderen Mikroorganismen hemmen oder vernichten¹⁴¹. Sie werden sowohl von Pilzen (z. B. den *Actinomyceten*) als auch von Bakterien (z. B. den *Streptomycceten*) gebildet. Bisher sind über 8000 Antibiotika charakterisiert worden, von denen etwa 100 chemotherapeutisch angewendet werden¹³⁸. Antibiotika sind in ihrer Struktur mannigfaltig; sie werden entsprechend ihrer Wirkungsweise, ihrer Angriffsorte oder ihrer chemischen Struktur klassifiziert. Allgemein gruppiert man Antibiotika in Bakteriostatika und Bakterizide, die jeweils das Wachstum der Mikroben hemmen oder diese abtöten. In Tabelle 1 sind die Wirkungsmechanismen einiger natürlicher und halbsynthetischer Antibiotika (Chemotherapeutika) verzeichnet.

1.2 Das Antibiotikum Tetracyclin

Tetracyclin (Tc, siehe Abb. 1) ist ein natürlich vorkommendes Antibiotikum^{98, 31}, das erstmalig 1948 aus dem gram-positiven Bakterium *Streptomyces aureofaciens* als Aureomycin (7-Chlortetracyclin, 7ClTc) isoliert wurde. Tc hat ein breites Wirkungsspektrum und zeichnet sich bei höheren Lebewesen durch gute Verträglichkeit aus¹⁴¹. Es konkurriert mit der Aminoacyl-tRNA um die Bindungsstelle in der 30S Untereinheit des prokariotischen Ribosoms^{51, 166, 43, 31} und verhindert so die Peptidelongation während der Proteinbiosynthese. Als Bindungsstelle wurde das ribosomale Protein S7 identifiziert⁵³, an das Tc mit einer Affinitätskonstante von 10^6 M^{-1} komplexiert⁴². Tc wirkt bakteriostatisch¹¹⁶, das heißt nach Dissoziation des Tc vom Ribosom ist eine Fortsetzung der Proteinbiosynthese möglich.

Die umfangreiche Anwendung von Tc im Kampf gegen verschiedenste Infektionen beim Menschen sowie die Verwendung in der Tierhaltung führten zur Verbreitung der bereits vorhandenen natürlichen Resistenzen gegen Tc und zur Entwicklung neuer Abwehrformen^{175, 99}, die die Effektivität des Antibiotikums¹⁴⁸ reduzieren oder seine Wirkung vollständig verhindern. Resistenzen gegen Tc werden in gram-positiven und gram-negativen Bakterien beobachtet²⁵. Sie werden entweder in den Chromosomen der Orga-

Tabelle 1: Chemotherapeutika und Antibiotika

Name	Wirkungsmechanismus
Hemmung der Translation	
Chloramphenicol, Linomycin	Blockierung der P-Stelle im 70 S-Ribosom
Erythromycin	Bindung an die große Ribosom-Untereinheit
Tetracyclin	Blockierung der Aminoacyl-tRNA-Bindung
Kanamycin, Streptomycin	Erhöhung der Ablesefehlerquote von der mRNA
Gentamycin, Neomycin	Bindung an die kleine Ribosom-Untereinheit
Puromycin	Proteinkettenabbruch
Antimetabolite	
Sulfonamide (synth.)	Hemmung der Folat-Synthese
Membran- und Zellwand-aktive Antibiotika	
Cephalosporin, Penicillin	Hemmung der Mureinsynthese
Bacitracin, Gramicidin	Änderung der Membranpermeabilität
Polymyxin B	Anlagerung an Phospholipide
Nystatin	Schädigung der Plasmamembran vom Pilzen
Vancomycin	Schädigung der Zellwand
Hemmung der DNA-Replikation	
Nalidixinsäure (synth.), Novobiocin	Inhibierung der DNA-Topoisomerase II
Trimethoprim (synth.)	Störung der Nukleotidsynthese
Mitomycin	Schädigung der DNA
Hemmung der Transkription	
Rifampicin	Bindung an die RNA-Polymerase
Actinomycin	Bindung an DNA

nismen oder auf mobilen genetischen Elementen wie Transposons oder Plasmiden kodiert 32, 8, 140. Die bekannten Resistenzen werden nach Levy auf der Grundlage ihrer Mechanismen in drei Gruppen eingeteilt⁹⁹, wobei jede eigenständige genetische Einheit, die eine Resistenz gegenüber Tc bewirkt, als Resistenzklasse bezeichnet wird und einen Buchsta-

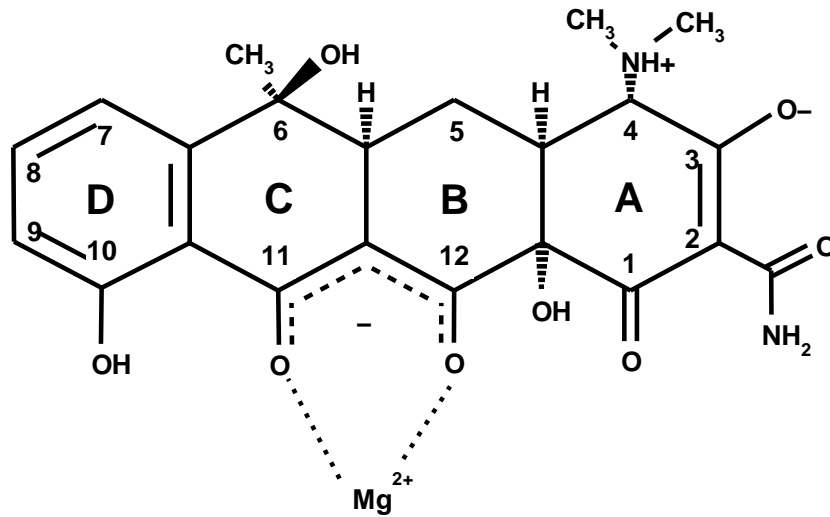


Abbildung 1: Struktur des Magnesium/Tetrazyklin-Komplexes

Das Tetrazyklin besitzt als Grundgerüst ein Naphthacen-Molekül, dessen vier Ringe mit den Buchstaben A bis D bezeichnet werden. Tc liegt im Cytoplasma der bakteriellen Zelle im Komplex mit einem Magnesiumion vor, das durch die Ketogruppe an Position 11 und die Enolgruppe an Position 12 (in Form eines Keto-Enolats) koordiniert wird. Die Dimethylaminogruppe an Position 4 ist protoniert und die Enolgruppe an Position 3 ist deprotoniert, so daß bei der Komplex neutralen pH einfach positiv geladen vorliegt.

ben des Alphabets erhält. Zum Beispiel besitzt *Streptomyces rimosus*, der Produzent von Oxytetrazyklin, drei Resistenzdeterminanten (-klassen), die den Schutz des Ribosoms und den aktiven Efflux des Antibiotikums bewirken. Die Resistenzmechanismen beruhen entweder auf einer Modifikation des Ribosoms²⁶ (Tet M, O, P, Q, S, U, OtrA), auf dem oxidativen Abbau des Antibiotikums¹⁵⁴ oder auf dem aktiven Efflux aus der Zelle mittels eines Membranproteins¹⁰⁶ (Tet A-E, G, H, L, P[tetA(P)] und OtrB; Abb. 2).

1.3 Regulation des Efflux-Mechanismus in Enterobakterien

Von den drei Mechanismen wurde in gram-negativen Bakterien der Effluxmechanismus am häufigsten beobachtet, der u. a. in *Escherichia coli* gefunden wurde. Von den 7 beschriebenen Klassen (Tet A-E, G, H; Abb. 2) ist die auf dem Transposon *Tn10* kodierte am besten untersucht^{63, 112}. Diese Resistenz wird der Klasse B zugeordnet. Auf einem Genabschnitt sind 4 Proteine kodiert, die als TetA, TetC, TetD und TetR bezeichnet werden. Über die Funktion von TetC und TetD ist bisher wenig bekannt, doch wird vermutet, daß diese Proteine für den oxidativen Abbau des Tc zuständig sind¹²⁸. Die anderen Proteine, TetA und TetR, sind die beiden Komponenten für den Effluxmechanismus. Die genetische Basis dieses Mechanismus besteht aus einem 3125 bp langen DNA-Fragment⁷³. Es enthält die divergent angeordneten Gene *tetA* und *tetR* sowie drei Promotoren und

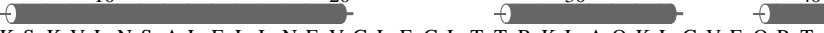
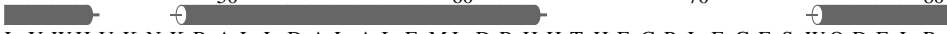

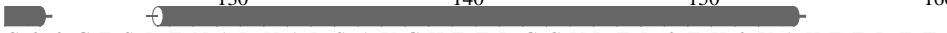

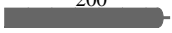
		10	20	30	40
HELICES					
TetR B	MS R L D K S K V I N S A L E L L N E V G I E G L T T R K L A Q K L G V E Q P T				
TetR D	A - - N R E S - - D A - - - - - - - - - - T - - D - - - - - I - - - -				
TetR A	- T K - Q P N T - - R A - - D - - - - - V D - - - - - E R - - - Q - - A				
TetR C	- N K - Q R E A - - R T - - - - - D - - M - - - - - R - - E R - - Q - - A				
TetR E	- A - - S L D D - - S M - - T - - D S E - L - - - - - - - - - S - K I - - - -				
TetR G	- T K - - - G T - - A A - - - - - - - - - M D S - - - - - E R - K - Q - - A				
TetR H	- A K - - - E Q - - D D - - I - - - - - - - - - - - - - V - - - I - - - - -				
		50	60	70	80
HELICES					
TetR B	L Y W H V K N K R A L L D A L A I E M L D R H H T H F C P L E G E S W Q D F L R				
TetR D	- - - - F R - - - - - - - - - V - I - A - - D Y S L - A A - - - S - - -				
TetR A	- - - - F R - - - - - - - - - E A - - A E N - - - S V - R A D D D - R S - - I				
TetR C	- - - - F - - - - - - - - - E A - - T I N - - - S T - R D D D D - R S - - K				
TetR E	- - - - R - - Q T - M N M - S E A I - A K - - - R S A - - P T - - - Q - - - Q				
TetR G	- - - - F Q - - - - - - - - - P E A - - R E R - - R S L - E - N - D - R V - - K				
TetR H	- - - - - - - - - - - - - - - E T I - Q K - - H - V L - - P N - T - - - - -				
		90	100	110	120
HELICES					
TetR B	N N A K S F R C A L L S H R D G A K V H L G T R P T E K Q Y E T L E N Q L A F L				
TetR D	- - - M - - - R - - - R Y - - - - - - - - - - D - - - D - V - T - - R - M				
TetR A	G - - R - - - Q - - - A Y - - - - R I - A - - - - G A P - M - - A D A - - R - -				
TetR C	- - - C - - - R - - - A Y - - - - R I - A - - - - A A P - M - K A D A - - R - -				
TetR E	E - - L - - - K - - - V - - - - R L - I - - - S - - P P - F - Q A - A - R C - -				
TetR G	E - - L - - - T - - - Y - - - - R I - A - - - - P N F G - A - T - I R - - -				
TetR H	- - - - - - - - - Q - - - M Y - - - - G - I - A - - - - S - S - F - - S - Q - - Q - -				
		130	140	150	160
HELICES					
TetR B	C Q Q G F S L E N A L Y A L S A V G H F T L G C V L E D Q E H Q V A K E E R E T				
TetR D	T E N - - - - R D G - - - I - - - S - - - - - A - - - Q - - - T A - L T D - P A				
TetR A	- E A - - - A G D - V N - - M T I S Y - - V - A - - - E - A G D S D A G - - G G				
TetR C	- D A - - - A G D - T - - - M - I S Y - - V - A - - - Q - A S E A D A - - G E				
TetR E	- D A - - - V - E - - F I - Q S I S - - - - A - - - E - A T N Q I E N				
TetR G	- A E - - C P K R - V W - - R A - S - Y V V - S - - - Q - A S D A D - - V P				
TetR H	- D A - - - - S Q - V - - - - S I A - - - - S - - - - T - - - - E S Q K - - - K				
		170	180	190	
HELICES	Flexible Schleife				
TetR B	P T T D S M P P L L R Q A I E L F D H Q G A E P A F L F G L E L I I C G				
TetR D	A P D E N L - - - - E - L Q I M - S D D G - Q - - - H - - - S L - R -				
TetR A	- V E Q A P L S - - - - A - - D A - - E A - P D A - - E Q - - A V - V D -				
TetR C	D Q L - - S A S T - - A R - Q S - M K I V Y E G - P D A - - E R - - A - - G -				
TetR E	N H V I D A A - - - - Q E - F N I Q A R T S - - M - - H - - - K S L - F -				
TetR G	D R P D V S E Q A P S S F - H V L F H E L E T D G M D A - - N - - - D S L - A -				
TetR H	V E - - T V A Y - - - - T - - V A I M - S D N G D A - - - - V - D V M - S -				
		200			
HELICES					
TetR B	L E K Q L K C E S G S				207
TetR D	F - V - - T A L L Q I V G G D K L I I P F C				218
TetR A	- A - R R L V V R N V E G P R K G D D				216
TetR C	- - - M R L T T N D I E V L K N V D E				219
TetR E	F S A - - D E K K H T P I E D G N K				211
TetR G	F - R L R A A V L A T D				210
TetR H	- - T V - - S A K				207

Abbildung 2: Primärstrukturen verschiedener TetR

Aminosäuresequenzen der sieben Tet Repressoren, abgeleitet aus den Nukleotidsequenzen der entsprechenden Gene. Zu TetR^B identische Aminosäuren sind als Bindestriche dargestellt. Über den Proteinsequenzen sind die Sekundärstruktur und die Aminosäurenummerierung von TetR^D gekennzeichnet.

zwei Operatoren in der zentralen Kontrollregion^{14, 64} (Abb. 3). Die Gene *tetA* und *tetR* kodieren jeweils für das Membranprotein bzw. den Repressor, der die Expression von *tetA* und *tetR* reguliert. Die drei Promotorregionen überlappen mit den Operatorregionen von TetR und sind in Abb. 3 dargestellt. TetR bindet als Homodimer an die beiden palin-

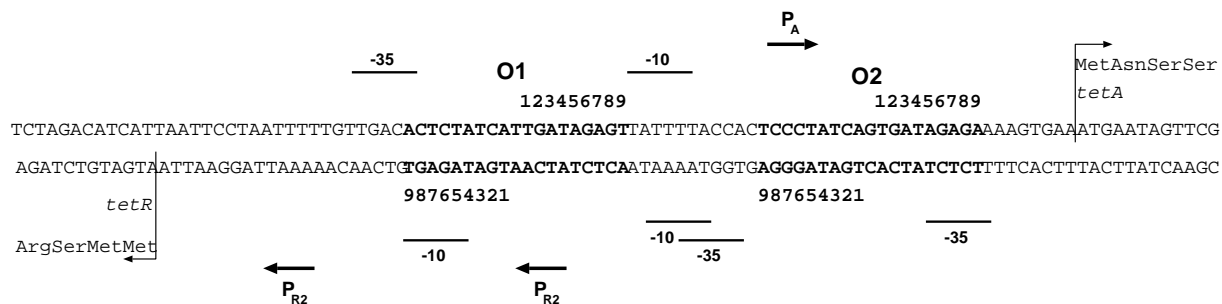


Abbildung 3: tet Regulationsregion der Klasse B

Sequenz des Transposons Tn10 in der Promotor/Operator-Region. Die für die Transkription verantwortlichen Promotoren sind als Pfeile dargestellt, die gleichzeitig auch die Transkriptionsrichtung angeben. Die RNA-Polymerasebindestellen -10 und -35 sind gekennzeichnet. Der Anfang der Pfeile entspricht dem Transkriptionsstart. Die ersten vier Aminosäuren der Gene für TetA und TetR sind gezeigt. Die Abbildung wurde Sizemore *et al.*, 1990¹⁵⁰ entnommen und teilweise modifiziert.

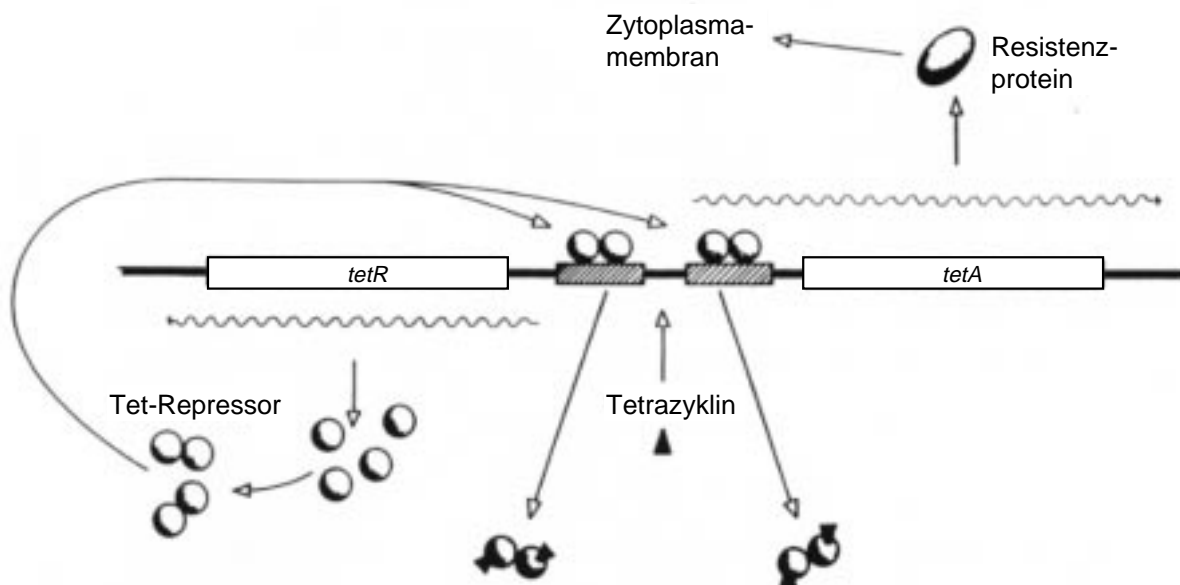


Abbildung 4: Regulation der Tetrazyklin-Resistenz

TetR-Moleküle (als Kugeln dargestellt) binden als Homodimere an den Operator (gestrichelte Boxen) und werden bei Induktion durch Tetrazyklin (Dreiecke) von dem Operator abgelöst. Nun können die Gene *tetA* und *tetR* transkribiert werden. Das synthetisierte TetA wird in die cytoplasmatische Membran eingebaut und sorgt durch Ausschleusen für die Reduktion der Konzentration des Antibiotikums in der Zelle. Die Abbildung wurde von Wissmann *et al.*¹⁷⁷ entnommen

dromischen Operatorsequenzen⁶⁵ (siehe Abb. 4). Dabei ist die Affinität von TetR zum Operator O2 zwei bis fünf mal größer als zum Operator O1^{107, 81}. Ist O1 unbesetzt, so wird das Gen *tetR* transkribiert, bis genügend TetR zur Besetzung des Operators O1 vorhanden ist. Unterhalb einer Tc-Konzentration von 10^{-6} M ist der Resistenzmechanismus abgeschaltet¹⁷⁷.

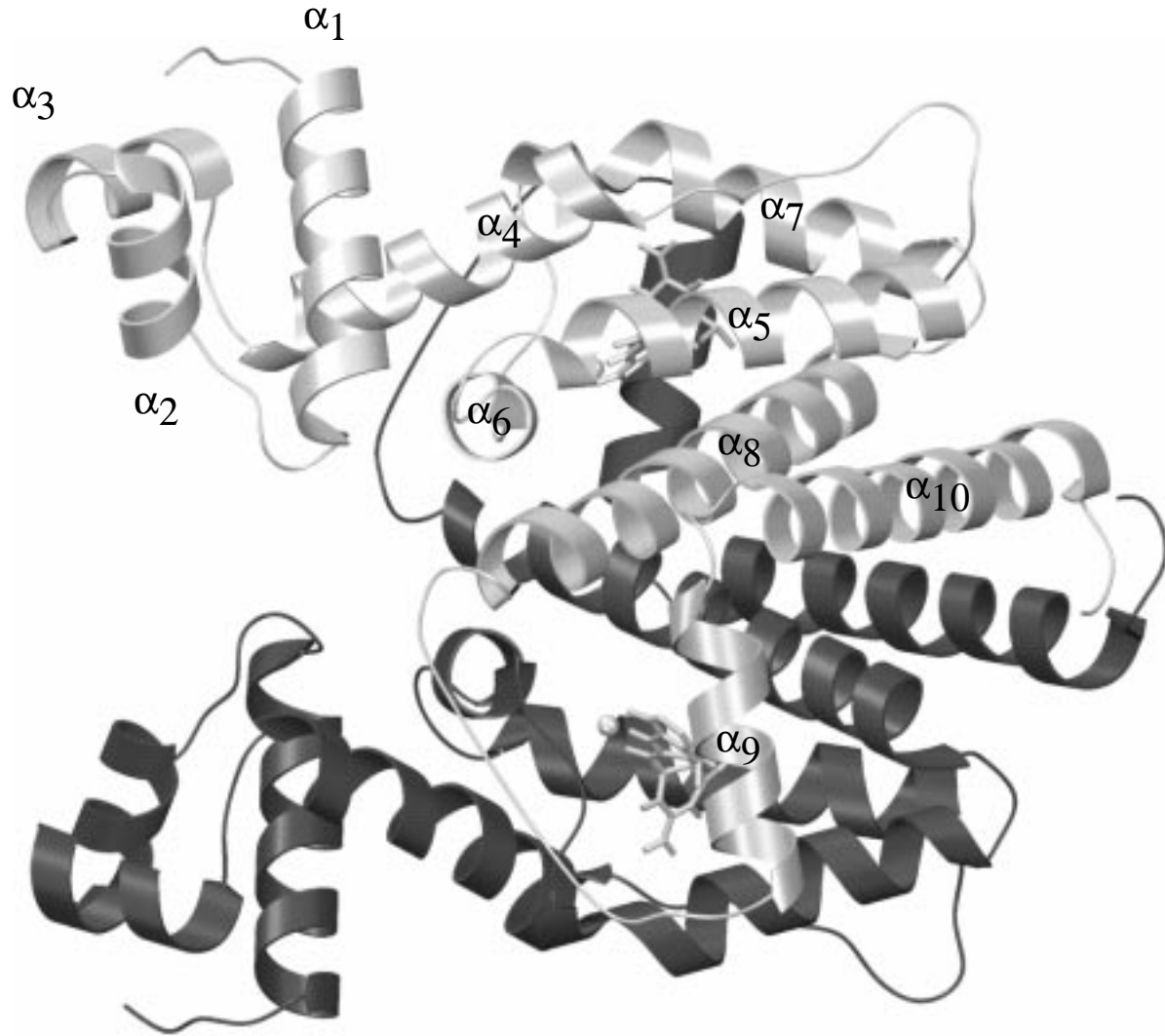


Abbildung 5: Struktur des TetR^D-Induktor-Komplexes⁶⁷

TetR^D ist ein Homodimer. Ein Monomer ist in hellgrau, das andere Monomer in dunkelgrau dargestellt. Ein Monomer besteht aus 10 Helizes, deren Nummerierung an dem hellen Monomer gezeigt ist. Die Helizes sind als Spiralen dargestellt. Die Induktormoleküle sind in der großen Proteindomäne fixiert und werden durch Kugel- und Strichmodelle präsentiert. Der in dem hellen Monomer gebundene Induktor wird teilweise durch die Helix α_5 verdeckt.

Das Membranprotein TetA besteht aus 12 die Membran durchspannenden Helizes⁴⁰, die durch peri- bzw. cytoplasmatische Peptidsegmente von durchschnittlich 11 Aminosäuren verknüpft sind. Es erkennt spezifisch den einfach positiv geladenen Komplex aus Tetrazyklin und einem zweiwertigen Kation. Dieser Komplex wird im Austausch gegen ein Proton aus der Zelle ausgeschleust¹⁸⁰. Während über die Struktur des Membranproteins TetA wenig bekannt ist, wurde die Kristallstruktur des Repressors TetR^D beschrieben^{167, 5, 1, 67}. Es handelt sich um ein Homodimer mit 207 Aminosäuren pro Monomer, die

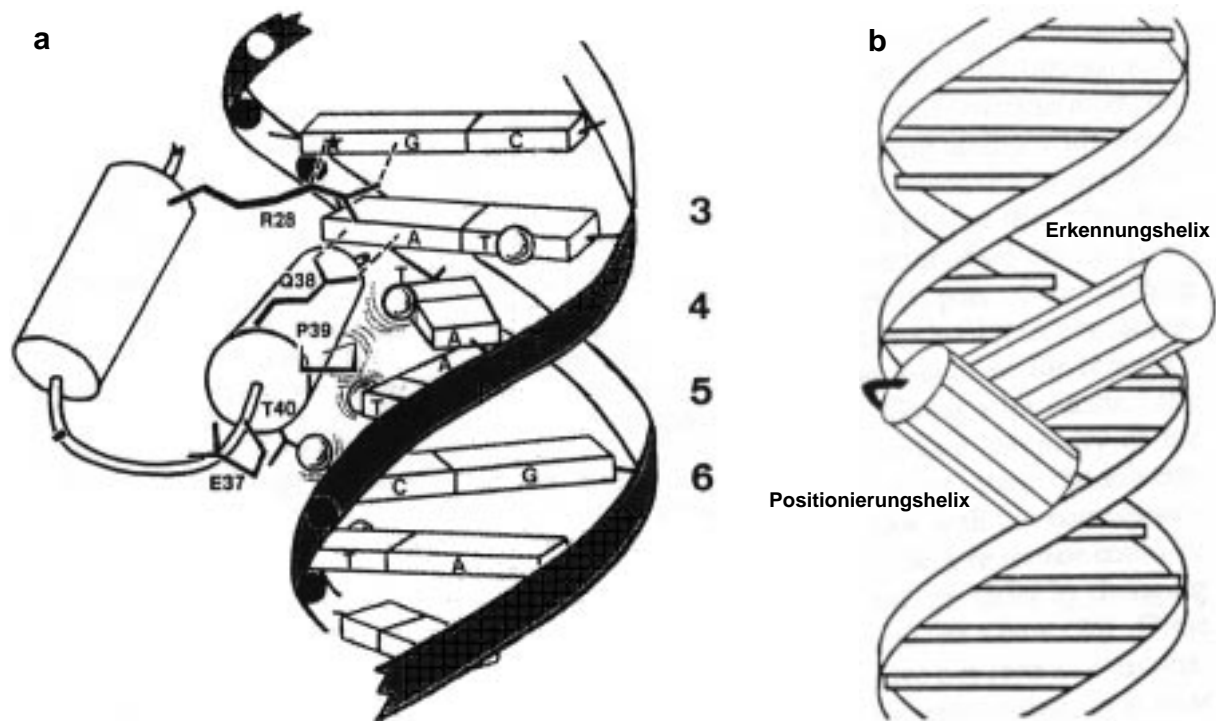


Abbildung 6: Modell der TetR^D/DNA-Erkennung

a. Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen dem DNA-bindenden Motiv von TetR^D und einem Halboperator. Die Helizes 2 und 3 sind als Säulen dargestellt. Die Basenpaare werden durch Kästen, die Aminosäureseitenketten durch Striche, Wasserstoffbrücken durch gestrichelte Linien und Van-der-Waals-Interaktionen durch gepunktete Linien präsentiert. Die Abbildung wurde aus Baumeister et al. ¹¹ entnommen.

b. Position des HTH-Motivs zur B-DNA. Die DNA-Doppelhelix ist als vertikal angeordnete Leiter dargestellt. Die Abbildung wurde von Schleif ¹⁴² entnommen.

in 10 Helizes falten (siehe Abb. 5). Der Repressor gliedert sich in 3 Domänen: die jeweils drei N-terminalen Helizes α_1 , α_2 und α_3 bilden zwei Drei-Helix-Bündel mit den beiden DNA-Bindungsstellen und die jeweils sechs C-terminalen Helizes bilden den Proteinkern, in dem die beiden Tc-Bindungstaschen lokalisiert sind. Die DNA-Bindungsdomänen sind über die Helizes α_4 und α_4' mit dem Proteinkern verbunden.

In der analysierten Struktur befinden sich TetR^D im Komplex mit zwei Induktoren [MgTc]⁺. In dieser Form kann der Repressor nicht an die Operator-DNA binden, da der Abstand der beiden DNA-bindenden Motive des TetR^D im Vergleich zu der Lokalisierung entlang des DNA-Stranges um 5 Å zu groß ist. TetR^D im Komplex mit dem Liganden [MgTc]⁺, dem Induktoren, wird als induzierter Zustand bezeichnet und die Konformationsänderung im Protein, die zu dieser Struktur führen, werden als Induktion bezeichnet.

1.4 Regulatorische Funktion des Tetrazyklin-Repressors

TetR besitzt drei wichtige Funktionen:

1. Es bindet an die spezifische Operatorsequenz *tetO* mit einer Affinitätskonstante von 10^{11} M^{-1} ^{82, 96}.
2. Es komplexiert den Induktorkomplex $[\text{MTc}]^+$ aus Tc und einem zweiwertigen Metallion (im Falle von $[\text{Mg7HTc}]^+$ mit einer Affinitätskonstante von 10^9 M^{-1} ¹⁶¹).
3. Es weist bei Induktion einen Affinitätsverlust von 10^8 gegenüber der Operator-DNA auf ⁹⁵.

Repressor/Operator-Wechselwirkungen. TetR enthält als Homodimer zwei DNA-Bindungsmotive. Es handelt sich dabei um die Helizes 2 und 3, die eine strukturelle Einheit, das α -Helix-Turn- α -Helix-Motiv (HTH) ¹⁵⁵, bilden, das auch in anderen Regulatorproteinen gefunden wurde, die an DNA binden. Die Helix 2 ist die sogenannte Positionierungshelix, Helix 3 die Erkennungshelix (siehe Abb. 7). Bei DNA-Bindung ist die Positionierungshelix ungefähr parallel zur DNA-Helix orientiert, während die Erkennungshelix in der tiefen Furche des DNA-Doppelstranges gebunden wird, wie in Abb. 6 dargestellt ist. Beide Helizes sind durch eine drei Aminosäuren lange Peptidschleife verbunden. Molekularbiologische Arbeiten haben gezeigt, daß TetR mit den beiden α -Helizes 3 und 3' ('-bezeichnet die Helizes und Aminosäuren des zweiten Monomers) in zwei aufeinanderfolgende große Furchen einer palindromischen B-DNA bindet (Schematisch ist die Struktur

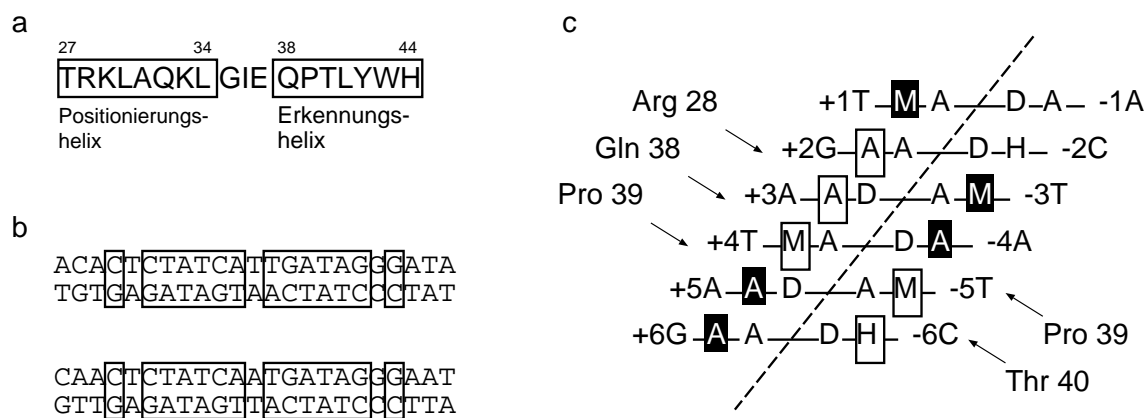


Abbildung 7: DNA-Erkennung durch TetR^D

a) Aminosäuresequenz des HTH-Motives von TetR^D, b) DNA-Sequenz der beiden Operatoren O1 und O2 des Plasmids (Resistenzklasse D), Palindromische Bereiche sind markiert, c) Sequenzspezifische Wechselwirkungen zwischen TetR^B/TetR^D zum Operator (Aminosäure- und DNA-Sequenz sind bis auf die Aminosäure 36 für beide Repressor/Operator-Komplexe gleich). Abbildung c wurde aus Helbl et al. ⁵⁸ übernommen.

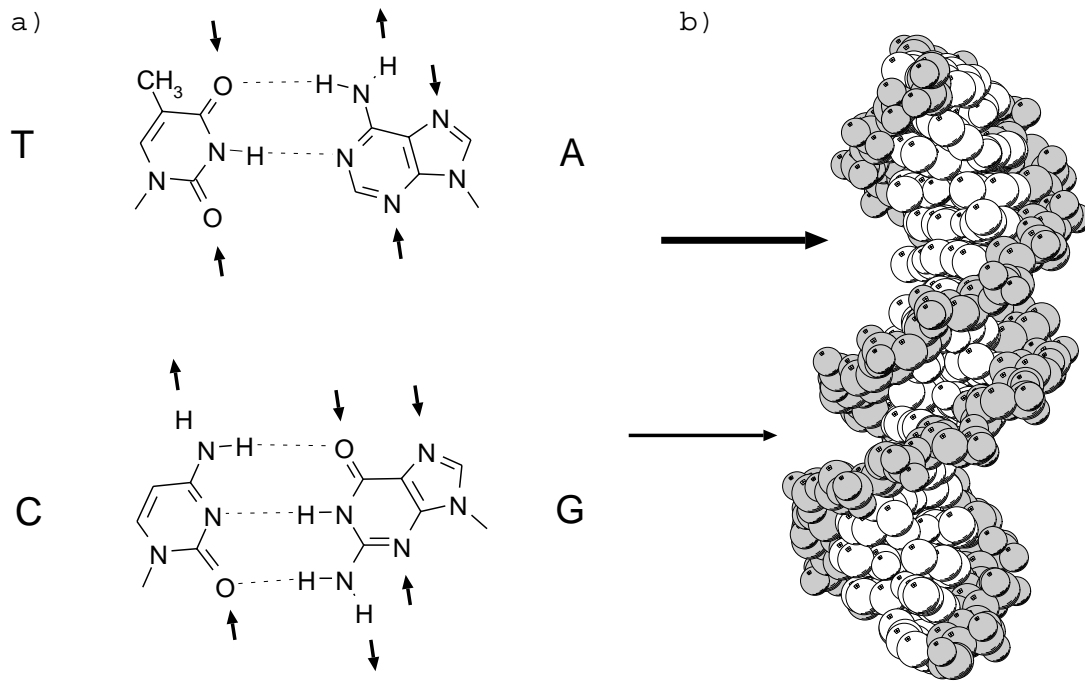


Abbildung 8: Struktur der DNA

a) Adenin und Thymin bzw. Guanin und Cytosin bilden paarweise Wasserstoffbrückenbindungen aus. Zusätzliche Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren sind jeweils mit Pfeilen markiert. b) In der doppelsträngigen B-DNA liegen die Basenpaare innen (weiß), das Gerüst aus über Phosphordiester verbundenen Desoxyribosegruppen (grau) außen. Die Lagen der Furchen sind durch Pfeile angedeutet (fett bzw. dünn für große bzw. kleine Furche).

der DNA in Abb. 8 dargestellt). Kontakte zur dazwischen liegenden kleinen Furche wurden nicht festgestellt. Mit direkten Protein-DNA-Kontakten, die schematisch in Abb. 7 dargestellt sind, bindet TetR an den Operator. Dabei werden spezifisch die Basenpaare 2 bis 5 erkannt. Die Sequenz der nachfolgenden Basenpaare 6 bis 9 ist für die Repressorbindung weniger wichtig; sie nimmt vom Zentrum aus an Bedeutung ab. Die Sequenz des mittleren Basenpaares ist nicht entscheidend für die Repressorbindung; es fungiert ausschließlich als Abstandshalter für die beiden Operatorhälften.

Komplexierung von Tc. Tc bindet mit einer 1000 mal größeren Affinität an TetR als an das Ribosom, so daß die Expression des Resistenzproteins eingeleitet wird, bevor das Antibiotikum seine toxische Wirkung ausüben kann. Ein TetR-Molekül bindet zwei Induktorkomplexe, bestehend aus dem Tc und einem zweiwertigen Metallion. Die Induktorkomplexe binden im Inneren der großen TetR-domäne und sind vom umgebenden Lösungsmittel abgeschirmt. Über Wasserstoffbrücken und hydrophobe Kontakte (siehe Abb. 9) wird der Komplex stabilisiert. An der Bindung jeweils eines Induktormoleküles sind beide Monomere beteiligt. Tc-Analoga induzieren ebenfalls den Resistenzmechanis-

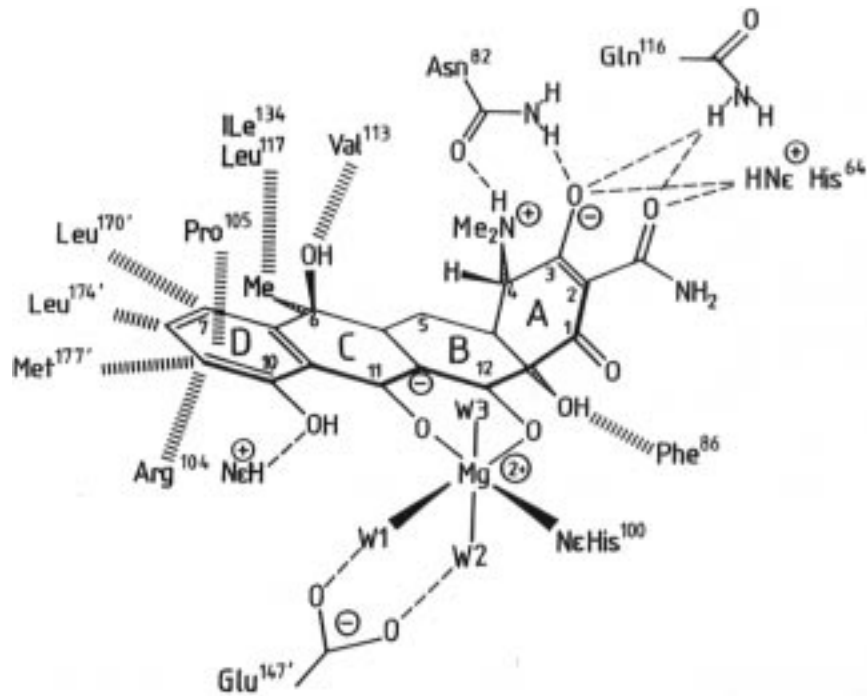


Abbildung 9: Wechselwirkungen zwischen TetR^D und [Mg-7HTc]
 Wasserstoffbrücken sind als gepunktete Linien und hydrophobe Wechselwirkungen als gestrichelte Balken dargestellt. Mit W1, W2 und W3 sind die drei Wassermoleküle bezeichnet, die Teil der oktaedrischen Mg²⁺-Koordination sind. Die Abbildung wurde aus Hinrichs *et al.*, 1994 67 übernommen.

mus. Dabei sind Modifikationen an der hydrophoben Seite des Tetrazyklins (Tc-Atome 5 bis 9) erlaubt. Substitutionen hydrophiler oder geladener Gruppen am Tc vermindern sowohl die Tc-Resistenz-Antwort als auch die antibiotische Wirkung.

Zwei unterschiedliche Modelle für den Induktionsmechanismus. Mit der Bindung des Tc an TetR^D ändert sich die Struktur des Repressors. Der Abstand der beiden Erkennungshelizes vergrößert sich von 34 Å im Komplex mit dem Operator einer B-DNA auf 39 Å im Komplex mit [MgTc]⁺. Dabei nimmt die Affinität des Repressors zum Operator dramatisch ab und führt zur Dissoziation. Es wurden zwei Modelle vorgeschlagen 67, 112, durch die der Übergang von DNA-gebundenem zu induziertem TetR^D möglich ist.

Modell 1. Die Induktion bewirkt eine Wippbewegung der Helix 4 auf der Helix 6, die als Achse dient (siehe linkes Schema in Abb. 10). Die Helix 4 ist am C-Terminus mit der Induktorbindungstasche verbunden und bildet nach Induktorbindung durch einen Kanal nahe der Helix 4 über die Aminosäure His64 Wasserstoffbrücken zum Tc. Am N-Terminus der Helix 4 befindet sich das DNA-bindende Drei-Helix-Bündel, welches durch die Bewegung der Helix 4 in eine andere Position verschoben wird.

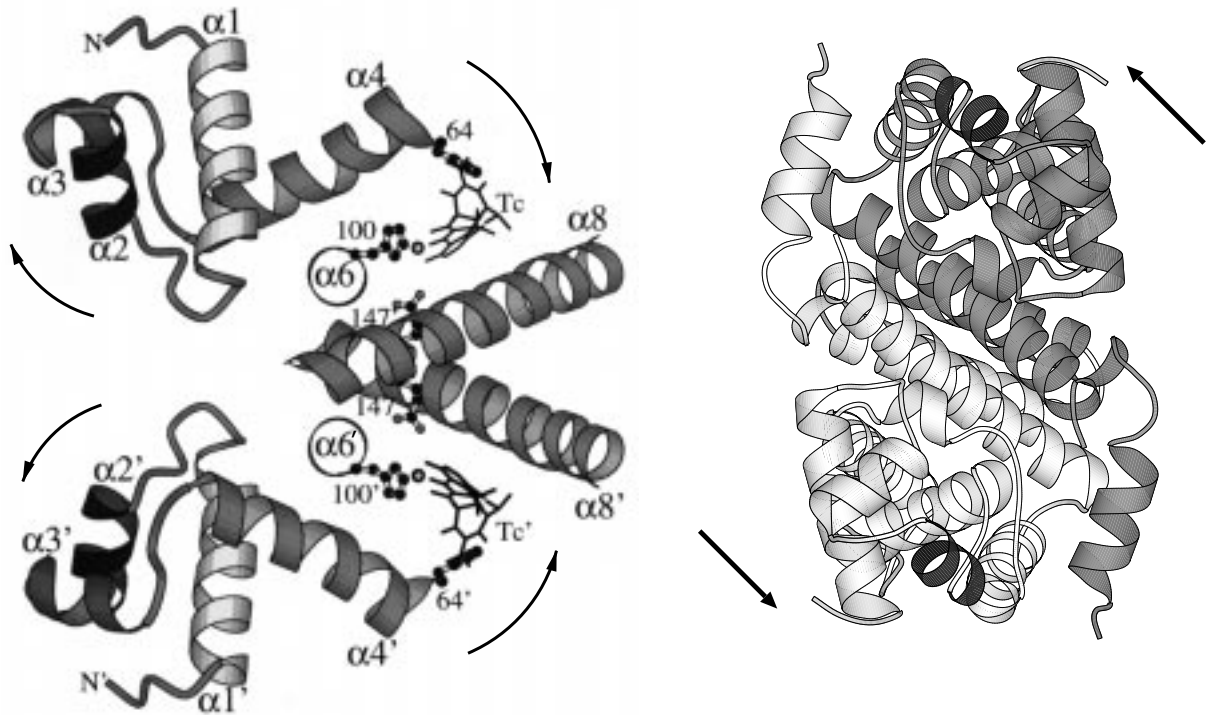


Abbildung 10: Zwei unterschiedliche Modelle für den Induktionsmechanismus. Pfeile symbolisieren die vorgeschlagenen Konformationsänderungen während der Induktion. Dabei stellt das linke Bild den „Wippmechanismus“ und das rechte den Mechanismus mit Interdomänenbewegung dar. In dem linken Bild verknüpfen die Helizes $\alpha 4$ und $\alpha 4'$ die Drei-Helix-Bündel $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ mit den Induktorbindungstaschen und positionieren die HTH-Motive durch eine Wippbewegung, wobei die Helizes $\alpha 4$ und $\alpha 4'$ jeweils auf den Helizes $\alpha 6$ und $\alpha 6'$ liegen. Die beiden gekrümmten Pfeile neben den Tc's stellen die Verschiebung des C-Terminus der Helizes $\alpha 4$ und $\alpha 4'$ dar. Die beiden Pfeile an $\alpha 2$ und $\alpha 3$ symbolisieren die Rotation der Drei-Helix-Bündel entsprechend der vorgeschlagenen Wippbewegung. Diese Abbildung wurde aus Hinrichs *et al.*, 1994⁶⁷ entnommen. In dem rechten Bild ist TetR^D vertikal zur Bildebene um 90° rotiert. Die HTH-Motive zeigen zum Betrachter. Ein Monomer ist hell, das andere dunkel und die beiden symmetrisch angeordneten Erkennungshelizes sind schwarz dargestellt. Die beiden Pfeile stellen die vorgeschlagenen Rotationsrichtungen der beiden Monomere gegeneinander dar (nach Müller *et al.*¹¹².)

Modell 2. Die beiden TetR-Monomere bewegen sich entlang der Dimerisierungsfläche gegeneinander. Da die beiden Erkennungshelizes am weitesten von dieser Dimerisierungsfläche entfernt sind, reicht eine Interdomänenrotation von ca. 2 bis 4 ° aus, um die Konformation des DNA-gebundenen TetR^D in die des induzierten zu überführen.

1.5 Induktionsmechanismen bakterieller Repressoren

Für eine Reihe von DNA-bindenden Proteinen konnten die Strukturen der freien und der DNA-gebundenen Formen im kristallisierten Zustand bzw. in Lösung bestimmt werden. Anhand der Unterschiede der Konformationen und der Wechselwirkungen des jeweili-

gen Proteins mit seinem spezifischen Effektormolekül konnte der Mechanismus aufgelöst bzw. über ihn spekuliert werden. In der Regel ist der Effektor, der die DNA-Bindung erleichtert bzw. erschwert, ein metabolisches Ausgangsmolekül oder ein bakterielles Syntheseprodukt, dessen Konzentration oberhalb einer definierten Schwelle die Expression bestimmter Gene hemmen oder aktivieren soll. Bei Verbesserung der DNA-Bindung ist der gebundene Effektor ein Korepressor, bei Verschlechterung der DNA-Bindung handelt es sich um einen Induktor.

Die Bindung des Effektormoleküls bewirkt häufig innerhalb des Proteins eine Konformationsänderung, wobei man die beiden Formen Scharnier- und Scherbewegung unterscheidet ⁵². Bei den Scharnierbewegungen werden die jeweiligen Sekundärstrukturelemente bzw. Domänen an den sie verbindenden Peptidschleifen gekippt. Bei Scherbewegungen werden diese Fragmente entlang mehrerer paralleler Grenzflächen gegeneinander verschoben. Bei beiden Strukturänderungen werden Hauptkettentorsionswinkel geringfügig verändert, ohne daß sich dabei die Sekundärstruktur ändert.

Methioninrepressor MetJ. Für diesen Repressor wurden die Strukturen des Apo- und des Holorepressors ¹³¹ sowie des Repressor-Operator Komplexes ¹⁵³ bestimmt. Da diese drei Strukturen sehr ähnlich sind, wird postuliert, daß die positive Ladung des Korepressors S-Adenosylmethionin das elektrostatische Potential des DNA-bindenden, antiparallelen β -Faltblatts des Proteins vergrößert, was zu einer höheren Affinität zur negativ geladenen DNA führt ¹²⁵.

Tryptophanrepressor TrpR. Zwei Moleküle Tryptophan (Trp) binden an TrpR und bewirken eine Vergrößerung des Abstands der DNA-bindenden Helizes im Protein um 4.8 Å ^{122, 183}. Diese Konformationsänderung wird direkt durch den Korepressor bewirkt. Es handelt sich um eine Scherbewegung. Die so positionierten HTH-Motive bilden sequenzspezifische Wasserstoffbrücken zur Operator-DNA, und zwar ausschließlich über Wassermoleküle. Die beiden Trp-Moleküle befinden sich an der Repressor/Operator-Kontaktfläche und sind in das Wasserstoffbrückennetz eingebunden.

Regulator des Lactose-Operons LacR. Ein Monomer von LacR besteht aus vier Domänen, dem N-terminalen Drei-Helix-Bündel mit dem HTH-Motiv, zwei zentralen Domänen mit der Effektor-Bindungstasche und einer C-terminalen Dimerisierungsdomäne. Vier solcher Monomere bilden die funktionelle Einheit von LacR, ein Tetramer, das an zwei palindromische, 93 bp voneinander entfernte Operatoren bindet ^{49, 100} und dabei die DNA um 360° biegt. Jeweils ein Dimer binden an eine palindromische Operator-DNA. Mit der Bindung des Induktors *allo*-Lactose zwischen den

beiden zentralen Domänen eines Monomers wird die DNA-Bindungsaffinität beider Dimere reduziert. Bei der Induktion bewegen sich die beiden zentralen Domänen eines Monomers entsprechend einer Scharnierbewegung gegeneinander und verändern so die Position des entsprechenden HTH-Motivs.

Regulator des Arabinose-Operons AraC. Das Homodimer AraC besteht aus einer Dimerisierungsdomäne und zwei Drei-Helix-Bündeln, die die HTH-Motive enthalten¹⁵². Für das HTH-Motive existieren pro Repressor-Dimer 3 Bindungsstellen, zwei in einer palindromischen Operatorsequenz I_1 und I_2 und eine dritte O_2 , 210 bp entfernt³⁹. Im nichtinduzierten Zustand sind die Operatorhälften I_1 und O_2 gebunden. Mit der Bindung des Effektors Arabinose verändert sich die Dimerisierungsdomäne, die beiden Monomere rotieren um etwa 180° gegeneinander, was zur Bindung der Operatorhälften I_1 und I_2 zur Dissoziation von O_2 führt. Der Wechsel der Bindungsstellen verändert die Konformation des 210 bp langen DNA-Fragments, wodurch die Transkription reguliert wird.

Katabolit-Genaktivator CAP. Das Homodimer CAP komplexiert viermal den Effektor cAMP, bindet an ein sequenz-spezifisches DNA-Fragment und bewirkt eine Krümmung der DNA um 90° . CAP besteht aus einer N-terminalen Dimerisierungsdomäne und den beiden C-terminalen DNA-Bindungsdomänen, deren jeweilige Verknüpfungen sich nahe der zweizähligen Dimerachse befinden. Bei Effektorbindung werden die beiden C-terminalen DNA-Bindungsdomänen zur N-terminalen Domäne rotiert. Es handelt sich dabei um eine Scharnierbewegung; die "Scharniere" befinden sich an den Übergängen zwischen den Domänen jeweils eines Monomers. Im freien Zustand besitzt das Protein eine "offene Konformation"¹²³, die durch die Effektorbindung "geschlossen" wird. Dabei bewegen sich die Peptidsegmente um so mehr, je weiter sie sich von der zweizähligen Achse befinden. Als Folge der Rotation entfernen sich die Erkennungshelizes voneinander und ermöglichen die DNA-Bindung^{144, 126}.

Die hier aufgeführten Transkriptions-Faktoren regulieren die Expression spezifischer Gene, die für den Metabolismus der bakteriellen Zelle sind. Mit der Bindung der jeweiligen Effektoren wird eine Änderung der Affinität zum Operator um mehrere Zehnerpotenzen erreicht. Dabei sind an den Induktionsmechanismen in der Regel nur zwei Konformationen beteiligt: "induziert" oder "nicht induziert". Ein zufälliges Lösen eines nicht-induzierten Repressors von seinem Operator ist bei dieser Art von Regulation von geringer Bedeutung. So zum Beispiel ist der Operator des Lac-Repressor zu 5 % nicht besetzt; das Operon wird dann trotz Abwesenheit des Induktors *allo*-Laktose transkribiert.

Im Fall von TetR darf es eine solche Fehlfunktion nicht geben ¹¹⁴, denn die zufällige Expression von TetA wirkt auf die Zelle wachstumshemmend. Deshalb muß der Induktionsmechanismus für TetR hochspezifisch und die Wahrscheinlichkeit, daß TetR in Abwesenheit von Tc vom Operator dissoziiert, minimal sein. Die beiden vorgestellten Modelle der TetR-Induktion ^{67, 112} entsprechen eher den Zwei-Konformationen-Mechanismus für die oben beschriebenen Transkriptionsfaktoren und müssen im weiteren eingehender untersucht werden.

1.6 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit wurde 1994 begonnen. Zu diesem Zeitpunkt waren in unserer Arbeitsgruppe die Kristallstrukturen der Komplexe von TetR^D mit [Mg-7HTc] und [Mg-7ClTc] ermittelt worden. Anhand dieser Strukturen konnten viele molekularbiologische und biochemische Eigenschaften des Proteins erklärt werden. Es wurde gezeigt, wieso der induzierte Repressor nicht mehr an die Operatorsequenz binden kann und wie der Induktor im Protein koordiniert wird, doch blieben wichtige Fragen zur Funktion ungeklärt. Aufgrund der Statik des Strukturmodells konnte kein experimentell begründeter Induktionsmechanismus vorgeschlagen werden.

In dieser Arbeit sollten deshalb folgende Problemstellungen behandelt werden:

1. Wie gelangt der Induktor in den Repressor?
2. Welche Strukturänderungen des TetR finden durch Induktorbindung statt?
3. Wie wird das Induktionssignal von der Induktorbindungsstelle zur DNA-Bindungsdomäne geleitet?
4. Wie bindet TetR^D am Operator, und welche Strukturänderungen des TetR führen zur Ablösung des Repressors von der DNA?
5. Wodurch wird der große Affinitätsverlust von TetR gegenüber seinem Operator nach Induktorbindung möglich?

Zur Klärung dieser Fragen wurde TetR^D nativ, mit verschiedenen Tc-Derivaten, mit verschiedenen Operatorfragmenten und in Form nichtinduzierbarer Mutanten kristallisiert. Die Röntgenstrukturanalyse dieser Proteine und Vergleiche der resultierenden Strukturen sollten dann Rückschlüsse auf Konformationsänderungen des Repressors ermöglichen.