

Ergebnisse

3.1 Das Expressionssystem

Um die Kristallstrukturanalyse von TetR^D in den drei Formen (nativ, im Komplex mit verschiedenen Tetrazyklinen und im Komplex mit verschiedenen Operatorsequenzen) durchzuführen, sind große Mengen an kristallisierfähigem Protein (mg-Maßstab) notwendig. Dafür ist ein Proteinexpressionssystem hilfreich, mit dem TetR^D schnell und homogen gewonnen werden kann. Von Dirk Schnappinger und Klaus Pfeleiderer wurde ein solches Expressionssystem zur Verfügung gestellt⁴⁵. Hierbei handelt es sich um den *E. coli*-Stamm RB791¹⁸, der auf einem Plasmid die Gene *amp^R* und *tetR^D* besitzt, wobei das erste Gen für Resistenz gegen den Selektionsmarker Ampicillin und das zweite Gen für den Tet-Repressor der Klasse D kodiert. Die Expression von *TetR^D* befindet sich unter der Kontrolle des Lactose-Operon-Promoters⁴⁵, dessen lac-Repressor durch das Substratanalogon Isopropylthiogalactopyranosid induziert werden kann¹³⁶.

Der zu produzierende Repressor ist 208 Aminosäuren lang. Da das N-terminale Methionin während der Aufarbeitung proteolytisch abgespalten wird, beginnt TetR^D mit Ser2. Die Mutation A2S wurde vorgenommen, um mit einer Schnittstelle für das Restriktionsenzym XbaI das Einfügen des Gens *tetR* in das Plasmid zu ermöglichen. Dieses Enzym erkennt TCTAGA, wobei das erste Triplet für Ser2 und das zweite für Arg3 kodiert. Die Aminosäuren 209-218 wurden deletiert, da festgestellt wurde, daß dieses Peptid in den Kristallstrukturen 2TCT und 2TRT fehlte⁶⁷. Aminosäuresequenz, Repressions- und Induktionsverhalten des Proteins wurden von Dirk Schnappinger überprüft und weichen in den biochemischen Eigenschaften nicht von dem längeren TetR^D ab. Das Kristallisa-



Abbildung 11: Aminosäuresequenzen von TetR^B und TetR^D

Die Aminosäuresequenzen sind aus den Nukleotidsequenzen der entsprechenden Gene abgeleitet. Gleiche Aminosäuren sind in der TetR^D-sequenz mit - gekennzeichnet. Mit Pfeilen sind die Schnittstellen des prozessierten TetR^D markiert. Die Aminosäuren für die Induktorkoordination sind grau unterlegt. Die Sekundärstruktur ist für den freien TetR^D angegeben.

tionsverhalten dieses verkürzten Repressors war gegenüber dem des vollständigen TetR^D signifikant verbessert ¹²⁰. Bei Anwendung dieses Überexpressionssystems konnten von allen TetR-Präparationen kristallisierfähiges Protein erhalten werden. Da sich bei dieser TetR-Variante keine Einschlußkörper bildeten, mußte die Aufreinigung nicht mehr wie zuvor über den verlustreichen Denaturierungs-Schritt mittels Guanidinium Chlorid ⁸⁰ durchgeführt werden.

Für die Röntgenstrukturanalyse des nichtinduzierten Repressors wurde desweiteren ein chimeres Protein TetR^{BD} verwendet, das in den Positionen 1 bis 50 die Aminosäuresequenz des TetR Klasse B und in den Positionen 51 bis 208 die des TetR Klasse D enthält. Insgesamt unterscheiden sich die Repressoren TetR^D und TetR^{BD} in nur 10 Positionen (siehe Abb. 11).

3.2 Kristallisation

Die Kristallisationsexperimente der TetR^D/DNA-Komplexe wurden von Claudia Alings und einige Kristallisationsexperimente der induzierten TetR^D wurden von Heike Roscher ausgeführt.

Die Kristallisation erfolgte unter Verwendung der Dampfdiffusionsmethode nach der Art des "Hängenden Tropfens". Die Kristallisation der verwendeten Repressoren war unter verschiedenen Bedingungen möglich und erfolgreich. Dabei ist das Fällungsmittel in der Regel Salz, das aus einem einwertigen Kation und unterschiedlich geladenen Anionen besteht. Die Kristalle wachsen in Gegenwart der Kationen von Kalium, Ammonium, Lithium und der Anionen Phosphat, Sulfat, Chlorid und Citrat. Zweiwertige Kationen destabilisieren den Repressor ¹⁷² und wurden daher durch Zugabe von EDTA komplexiert. Die vorbereiteten Proteinproben wurden mit der Fällungsmittellösung im optimierten Verhältnis gemischt und zur Kristallisation bei 18°C aufbewahrt. Die freien Repressoren TetR^D und TetR^{BD} sowie die Mutanten P105T, D178G kristallisierten aus einer 1 % (w/v) Proteinlösung bei neutralem pH-Wert. Als Fällungsmittel wurden 500 bis 800 mM (NH₄)₂SO₄ verwendet. Die Form der Kristalle ist ellipsoidal; in Gegenwart von Glycerin ab 5 % (v/v) tetragonal-bipyramidal, mit den Ausdehnungen von bis zu 2.0 × 1.0 × 0.8 mm³.

Zur Kristallisation von TetR^D sowie der Mutanten P105T und D178G im Komplex mit Tetrazyklin bzw. mit Tetrazyklinanaloga wurden die TetR^D/Tc/Mg²⁺-Gemische zuerst bei 30°C inkubiert, um so die vollständige Bindung des Induktors an den Repressor zu ermöglichen. Nach Abkühlung der Proben auf 18°C wurden die Komplexe unter denselben Bedingungen wie die nativen Repressoren kristallisiert. Aufgrund der hohen Bindungskonstante von 10⁹ M⁻¹ liegt TetR^D vollständig im Komplex mit dem Induktor

Tabelle 3: Bindungskonstanten der in dieser Arbeit zitierten Tc an Mg^{2+} und an TetR. Die Bindungskonstanten der Tetrazykline zu Mg^{2+} (K_M), der Induktoren $[MgTc]^+$ zu $TetR^B$ (K_A) und die Konzentrationen der Induktoren bei Halbinduktion von $TetR^B/DNA$ wurde aus Lederer et al. ⁹⁵ übernommen. (nb nicht bestimmt)

Tetrazyklin		K_M $\times 10^3 (M^{-1})$	K_A $\times 10^9 (M^{-1})$	Konz. bei Halb- induktion $\times 10^{-6} (M)$
Tetrazyklin	7HTc	2.4	3.3	2.2
7chloro-Tetrazyklin	7ClTc	1.3	10.0	0.24
6-demethyl-6-dehydroxy-Tetrazyklin	6dodmTc	3.5	8.0	0.34
9-nitro-Tetrazyklin	9NO ₂ Tc	nb	nb	nb
9-(N,N-dimethyl-glycyl-amido)-6-demethyl-6-dehydroxy-Tetrazyklin	9glyTc	7.5	0.64	nb
2-nitrilo-Tetrazyklin	2CN-Tc	2.9	3.8	0.65
4-epi-Tetrazyklin	4epi-Tc	2.9	0.01	170.0

vor. Mutationen im Protein oder Substitutionen am Tc können die Bindungskonstante verringern (siehe Tab. 3), was sich auf das Kristallisationsverhalten auswirkt. Da als Koinduktor ein zweiwertiges Metall erforderlich ist ¹⁶¹, wurde $MgCl_2$ zugesetzt, welches in einem Fall in den Kristallen gegen $NiCl_2$ ausgetauscht wurde (Form 9, siehe Seite 32).

Bis auf zwei Ausnahmen kristallisieren die freien und die Induktor-gebundenen Repressoren in der Raumgruppe $I4_122$. In der asymmetrischen Einheit befindet sich ein Monomer; die Dimerachse liegt in den Kristallen entlang einer zweizähligen Symmetrieachse. In den Kristallisationsansätzen, in denen $TetR/[Mg7ClTc]$ in Gegenwart eines vierfachen molaren Überschusses an EDTA gegenüber Mg^{2+} kristallisierte, bzw. in denen die Mutante D178G/7ClTc in Gegenwart eines 50-fachen Überschusses an Mg^{2+} gegenüber dem Repressor angesetzt wurde, wuchsen Kristalle der Raumgruppe $P4_32_12$.

Die Kristallmorphologie der Kristalle der Induktor-gebundenen Repressoren ist vergleichbar. Die gelbe Farbe der Kristalle wird durch die Tetrazykline verursacht; die Farbtintensität ist in den verschiedenen Komplexen unterschiedlich und hängt von dem jeweiligen Tetrazyklinanalogon ab. Die Kristalle der induzierten Repressoren werden entlang der tetragonalen Achse bis zu 1.5 mm lang und sind insgesamt kleiner als die des freien TetR. Für die Kokristallisationsversuche mit der Operator-DNA wurden üblicherweise äquimolare Mengen an $TetR^D$ und Operator-DNA gemischt und bei 4°C für 60 min inkubiert. Die Kristallisation wurde bei 18°C angesetzt, da es bei tieferen Temperaturen häufig zu Kristallverwachsungen kam, während die Kristalle bei höheren Temperaturen instabil wurden.

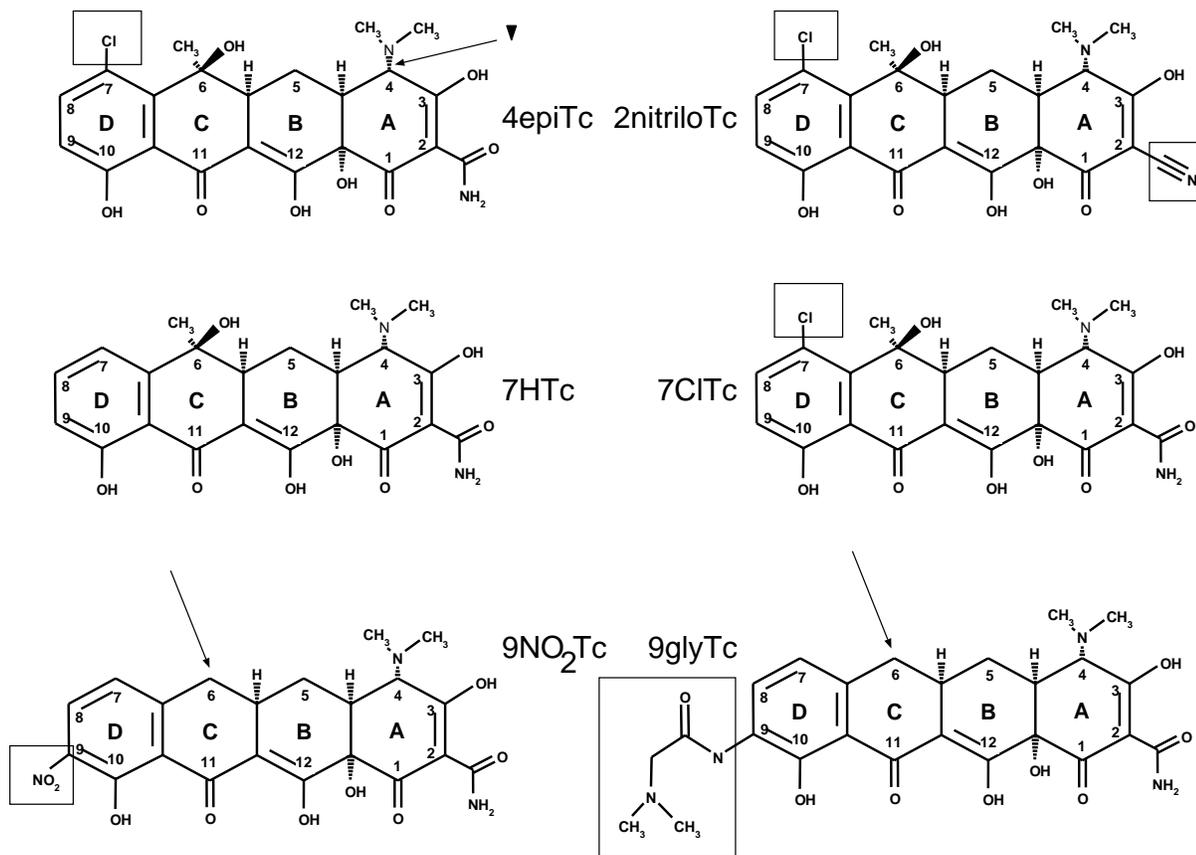


Abbildung 12: Strukturen der Tc-Analoga

Die Modifikationen des 7HTc sind jeweils eingerahmt bzw. mit einem Pfeil angedeutet.

3.2.1 Länge und Sequenz der eingesetzten DNA

Die Parameter Länge und Sequenz des jeweiligen DNA-Fragments, das in der Kokristallisation eingesetzt wurde, stellen zusätzliche Variablen für die Optimierung der Kristallisationsbedingungen dar. TetR bindet an ein 13 bp langes palindromisches DNA-Fragment, dessen Sequenz konserviert ist. Zur Verbesserung der Kristallisationseigenschaften des Komplexes können demzufolge nur die Basenpaare, die mehr als 7 bp vom Mittelpunkt der Sequenz entfernt sind, angefügt oder entfernt bzw. einzelne terminale Nukleotide angehängt werden.

Protein/DNA-Kristalle wurden mit verschiedenen DNA-Fragmenten (siehe Tabelle 4) erhalten. Wie auch schon früher beobachtet wurden⁷⁸, handelt es sich dabei aber nicht um Einkristalle. Von diesen Kristallen wurden Diffraktionsdaten gemessen, die entlang einer Richtung ein orthogonales Beugungsmuster mit den entsprechenden Zellkonstanten von 49 und 50 Å lieferten. Entlang den anderen beiden Orientierungen wurden keine voneinander getrennte Reflexe beobachtet. Worin die Ursache dieser Verwachsungen besteht, konnte nicht ermittelt werden.

Tabelle 4: Zur Kristallisation verwendete Oligonukleotide

Die palindrome Operatorsequenz beschränkt sich auf die Basenpaare 1 bis 6 sowie 8. Experimente mit mehr als 22 Basenpaare langen Operatoren waren nicht erfolgreich ⁷⁸. Die jeweils obere Sequenz der Duplexe besitzt auf der linken Seite das 5'-Ende.

Länge	Enden	Sequenz	Ergebnis
<i>tetO1</i>		ACT CTA TCA T TGA TAG GGA TGA GAT AGT A ACT ATC CCT	
<i>tetO2</i>		ACT CTA TCA A TGA TAG GGA TGA GAT AGT T ACT ATC CCT	
22	TA	TC ACT CTA TCA T TGA TAG GGA C G TGA GAT AGT A ACT ATC CCT GA	verwachsen
21	TA	TT ACT CTA TCA T TGA TAG GGA A TGA GAT AGT A ACT ATC CCT A	verwachsen
21	TT	T ACT CTA TCA T TGA TAG GGA T TA TGA GAT AGT A ACT ATC CCT	verwachsen
21	blunt	C ACT CTA TCA T TGA TAG GGA G G TGA GAT AGT A ACT ATC CCT C	verwachsen
18	TT	CT CTA TCA T TGA TAG GGT TGA GAT AGT A ACT ATC CC	drei Kristallformen
17	TA	CT CTA TCA T TGA TAG GA TGA GAT AGT A ACT ATC C	verwachsen
17	AT	ACT CTA TCA T TGA TAG G GA GAT AGT A ACT ATC CT	verwachsen
17	blunt	CT CTA TCA T TGA TAG GG GA GAT AGT A ACT ATC CC	verwachsen
15	blunt TA/CG	T CTA TCA T TGA TAG G A GAT AGT A ACT ATC C	eine Kristallform
15	blunt CG/CG	C CTA TCA T TGA TAG G G GAT AGT A ACT ATC C	eine Kristallform
13	blunt	CTA TCA T TGA TAG GAT AGT A ACT ATC	eine Kristallform

Mit einem 18 bp langen DNA-Fragment wurden erstmalig Einkristalle vom TetR/DNA-Komplex erhalten ¹¹⁷, wobei die Kristallisationsbedingungen denen sehr ähnlich waren, bei denen mit anderen Oligonukleotiden verwachsene Kristalle beobachtet wurden. Bei diesem Oligonukleotid handelt es sich um einen 17mer DNA-Doppelstrang, der an den

3'-Enden jeweils ein Thymin besitzt. Nach Optimierung der Kristallisationsbedingungen konnte dieser TetR^D/DNA-Komplex in drei Formen kristallisiert werden. Die Kristallisationsbedingungen unterscheiden sich hinsichtlich der Molekularmasse des Fällungsmittels Polyethylenglykol und der Additive CaCl₂ und Ca(CH₃COO)₂. Zwei dieser drei Kristallformen konnten erfolgreich zur Röntgenstrukturanalyse benutzt werden.

Anhand der Röntgenstrukturanalyse der dritten Kristallform (Form 5 siehe Seite 32) des Komplexes mit dem 18mer-Oligonukleotid war ersichtlich, daß sich aufgrund der engen Packung der Moleküle in den Kristallen die Operatorenenden durch Kollision der Duplexe aufwinden (siehe Abschnitt 4.12). In der vorgegebenen Elementarzelle mit $a = 50.3 \text{ \AA}$ hätte lediglich ein 15mer Oligonukleotid Platz. Bei der Modellierung eines regulären 15mers in die Struktur des Komplexes mit dem 18mer Oligonukleotid (Form 5) ergab sich, daß die Duplexe zwar aneinander gereiht sind, aber durch die Versetzung der Oligonukleotiden keine kontinuierliche Helix ausbilden. Zur Verbesserung der Kristallisationsbedingungen wurde daher ein 15mer Duplex ohne Überhang zur Komplexbildung eingesetzt. Die Auflösung der röntgenographischen Daten konnte mit diesen Kristallen von 3.0 auf 2.5 \AA verbessert werden.

In der Struktur mit dieser 15mer-DNA (Form 6) gibt es einige Unstimmigkeiten. Die Seitenkette des Trp43 der Erkennungshelix von TetR^D kollidiert mit der 3'-Base des Nachbarduplexes. Es handelt sich dabei um eine Purinbase des terminalen, nicht-palindromischen Basenpaares. Die Basen Adenin und Guanin liegen an jeweils beiden Enden zu 50 % vor. Um die Packung zu verbessern bzw. diese Fehlordnung zu vermeiden, wurden zwei Strategien gewählt. Zum einen wurden die unsymmetrischen terminalen Basenpaare AT/GC zu GC/GC umgewandelt bzw. aus dem Operator entfernt und so nur als 13mer DNA-Doppelstrang für die Kristallisationsexperiment verwendet. Beide Ansätze resultierten in Kristallen höherer Qualität. Die diesbezüglichen Arbeiten sind noch nicht abgeschlossen.

3.2.2 Kristallformen des TetR^D/DNA-Komplexes

TetR^D kristallisierte im Komplex mit der 18mer DNA in drei Formen (zur Reihenfolge der Numerierung siehe Tabelle 3.3 auf Seite 32). In Tabelle 5 sind die Charakteristika dieser Kristalle angegeben. Die Kristallsymmetrie der hexagonalen Form 4 spiegelte sich in einem hexagonalen Querschnitt der Kristalle wider. Die Kristalle der Form 5 erreichten nicht die Größe der anderen beiden Formen mit 18mer-DNA, jedoch zeigten sie Reflexe bis zu einer höheren Auflösung, was sich auf die kleine Elementarzelle und auf eine dichtere Packung zurückführen läßt. Während in Form 4 der Lösungsmittelgehalt 58 % beträgt, liegt er in Form 5 bei 36 %.

Tabelle 5: Kristallformen der TetR^D/DNA-Komplexe

Die Länge der DNA ist als Anzahl der Nukleotide pro DNA-Einzelstrang angegeben. In Klammern steht darunter die Länge des DNA-Doppelstranges, der in der Kristallstruktur beobachtet wurde. Die Kristallstruktur der Form 3 wurde nicht gelöst, da die asymmetrische Einheit ca. 21 TetR^D/DNA-Komplexe enthält.

Form	Länge	Enden	Kristallform	Raumgruppe	Kristallgröße
3	18mer	3'T-Überhang	dreieckige	C2	$2.0 \times 1.0 \times 0.2 \text{ mm}^3$
	?	3'T-Überhang	Plättchen		
4	18mer	3'T-Überhang	hexagonale	P6 ₁ 22	3.0 mm lang, 0.3 mm im Durchmesser
	(11bp)	3'T-Überhang	Stäbchen		
5	18mer	3'T-Überhang	rechteckige	P2 ₁	$0.4 \times 0.2 \times 0.1 \text{ mm}^3$
	(17bp)	3'T-Überhang	Plättchen		
6	15mer	AT Basenpaar	rechteckige	C222 ₁	$2.5 \times 0.5 \times 0.5 \text{ mm}^3$
	(15bp)	GC Basenpaar	Plättchen		
7	15mer	GC Basenpaar	rechteckige	P2 ₁ 2 ₁ 2	$0.2 \times 0.2 \times 0.05 \text{ mm}^3$
	(15bp)	GC Basenpaar	Plättchen		
8	13mer	GC Basenpaar	quadratische	P4 ₁ 2 ₁ 2	0.8 mm lang, 0.1 mm entlang der Grundfläche
	(13bp)	GC Basenpaar	Pyramiden		

Die Komplexe mit den beiden 15mer DNA-Duplexen wuchsen zu rechteckigen Plättchen mit zwei unterschiedlichen Raumgruppen. Der Komplex mit der 13mer DNA (Form 8) kristallisierte in der tetragonalen Raumgruppe P4₁2₁2; diese Kristalle zeigten ebenfalls die tetragonale Symmetrie in Form von Pyramiden mit quadratischer Grundfläche.

3.3 Messung von Beugungsdaten

Die Röntgenstrahlung besitzt wegen ihrer Frequenz eine hohe Energie, die neben der kristallspezifischen Diffraktion auch zu Ionisierungs- und Radikalzuständen führt. Die Radikale modifizieren Nachbarmoleküle und stören die periodische Anordnung der Gitterbausteine, so daß die Beugungsqualität abnimmt. Da die Diffusion der gebildeten Radikationen temperaturabhängig ist, werden die Datensammlungen von Proteinkristallen häufig an eingefrorenen Kristallen bei Temperaturen um 100 K durchgeführt.

Für die Messungen bei 100 K eignen sich insbesondere kleine kompakte Kristalle oder Plättchen, bei denen der Abkühlungsprozeß schnell und gleichmäßig verläuft. Große Kristalle lassen sich nur schwer einfrieren, ohne die Beugungsqualität zu vermindern. Daher wurden die großen Kristalle der freien und der Induktor-gebundenen Repressoren in

Struktur	TetR ^D frei	TetR ^{BD} frei	18mer- DNA	18mer- DNA	18mer- DNA	15mer- DNA TA/CG	15mer- DNA CG/CG	13mer- DNA	Ni- 7CITc	Mg- 9glyTc	Mg- 9NO ₂ Tc	7CITc ohne Mg	2 7CITc 1 Mg	4epiTc	2CNTc	PT105 frei	PT105 7CITc	DG178 frei	DG178 7CITc	DG178 2 7CITc 1 Mg
Form	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Raumgruppe	I4,22	I4,22	C2	P6,22	P2 ₁	C222 ₁	P2,2,2	P4,2,2	I4,22	I4,22	I4,22	I4,22	P4 ₃ 2,2	I4,22	I4,22	I4,22	I4,22	I4,22	I4,22	P4 ₃ 2,2
a(A)	69.1	69.81	297.4	88.34	50.30	38.04	51.25	63.50	68.94	68.94	69.10	69.79	69.25	69.74	69.41	68.91	69.70	70.02	69.50	69.20
b(A)	69.1	69.81	153.3	88.34	49.82	193.20	51.38	63.50	68.94	68.94	69.10	69.79	69.25	69.74	69.41	68.91	69.70	70.02	69.50	69.20
c (A)	182.93	184.95	362.2	320.46	96.29	91.75	107.77	296.96	189.89	180.75	182.93	182.34	182.37	183.38	181.65	181.07	181.50	182.88	182.39	181.50
α in grad	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90
β in grad	90	90	98.9	90	97.0	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90
γ in grad	90	90	90	120	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90
Wellenlänge (A)	0.975	0.9375	0.9117	0.908	0.981/ 1.5418	1.5418	1.5418	0.97	1.5418	0.92	0.975	0.9995	1.5418	0.87	0.9204	0.9117	0.92	0.92	0.981	1.087
Auflösung von/bis (A)	23.6/2.2	18.5/2.4	39.7/7.0	38.2/3.9	29.6/3.0	34.5/2.45	19.3/4.0	19.8/3.5	23.5/2.2	17.2/2.4	17.8/2.2	30.8/2.4	19.9/2.7	27.7/2.7	19.9/2.65	19.4/2.3	27.7/2.4	23.9/2.2	33.3/2.7	15.0/2.4
Unabhängige Reflexe	10487	9076	25656	6965	9302	12437	1404	7774	11250	8428	11066	7958	12710	6010	6023	9071	8161	6317	5871	17893
Redundanz	3.1	4.8	2.2	7.5	4.1	3.7	2.1	2.7	4.5	3.2	4.1	2.7	4.7	3.7	2.8	4.6	3.9	2.6	7.1	6.2
Vollständigkeit (%)	89.5	97.8	75.8	96.4	96.1	97.2	53.1	92.2	97.7	96.0	98.6	86.2	99.1	94.2	90.5	97.3	89.1	52.7	90.2	99.6
Wilson B-Faktor	47.3	42.3	331.3	88.4	10.7	57.9	51.9	72.2	32.1	46.5	37.8	60.8	32.9	71.1	72.0	37.9	55.8	41.2	70.3	32.8
R sym.	8.3	7.3	6.9	9.8	10.6	9.0	14.1	10.4	6.0	5.9	4.7	5.3	7.8	6.6	7.2	5.1	9.4	6.6	6.5	6.3
R sym. letzte Schale	36.3	24.8	39.1	29.5	21.3	28.7	45.0	43.6	26.8	19.3	17.3	39.7	22.8	27.0	33.8	18.9	33.7	31.4	46.7	23.2
I / σ	8.19	6.13	14.45	13.4	7.9	12.1	5.88	8.66	16.4	15.6	37.4	12.7	13.3	14.9	13.1	19.6	6.7	9.3	21.5	23.4
I / σ letzte Schale	3.8	2.9	3.2	2.9	2.9	3.3	2.2	2.1	3.2	3.8	7.8	2.3	5.1	3.0	2.5	6.2	3.8	3.3	4.8	5.3

Tabelle 6: Kristallparameter und Beugungsdaten

Übersicht über die Kristallparameter sowie die zur Strukturlösung und -verfeinerung verwendeten Beugungsdaten. Die Vollständigkeit der Daten, das mittlere Signal-zu-Rauschen Verhältnis ($\langle I_{\text{HKL}}/\sigma_{\text{HKL}} \rangle$) und die Übereinstimmung mehrfach gemessener Reflexe ($R_{\text{sym}} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$, $\langle I \rangle$: Mittelwert über symmetrieäquivalente Meßwerte) ist für den gesamten Datensatz angegeben.

Glaskapillaren montiert und bei 4°C gemessen. Die TetR/DNA-Kristalle wurden für die Beugungsexperimente meistens in flüssigem Propan schockgefroren. Um Eisbildung beim Einfrieren zu verhindern, wurden die Kristalle in der Reservoirlösung in 5 %-Schritten im Verlauf von 15 min mit 20 % Glycerin versetzt, das der Reservoirlösung zugesetzt wurde. Aus technischen Gründen mußten bei der Datensammlung am Synchrotron in Paris (LURE, DW-32) die Kristalle aus der Glycerinlösung direkt in den Stickstoff-Kühlstrom gebracht werden. Der Kühlstrom hatte eine Temperatur von 125 K anstelle der üblichen 100 K; vermutlich war das die Ursache für die hohe Mosaizität der Kristalle, die in diesem Fall 1.5° betrug und sonst zwischen 0.2° und 0.6° liegt. In Tabelle 6 sind Charakteristika

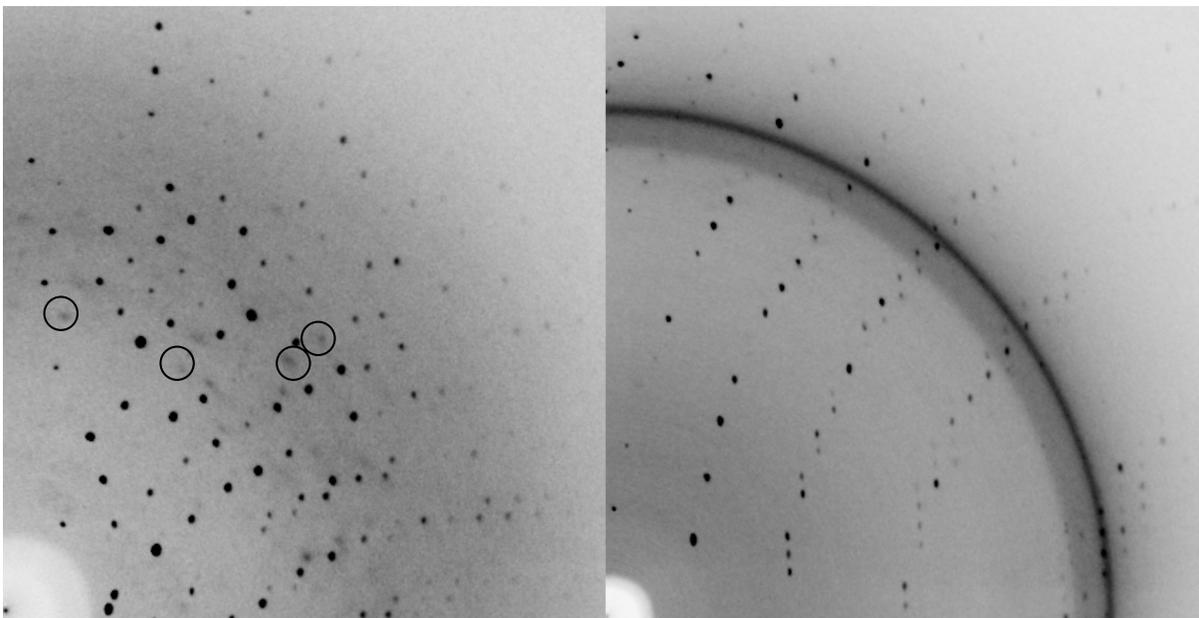
Abbildung 13: Reflexmuster bei verschiedenen TetR^D-Komplexen

Abb. links: TetR^D im Komplex mit [Co-7CITc]⁺, max Auflösung 2.12 Å. Abb. rechts: TetR^D im Komplex mit 15mer DNA, max Auflösung 2.44 Å, Ring bei 3.8 Å.

Die relative Größe der Reflexe und das Auftauchen zusätzlicher "diffuser" Reflexe in den Diffraktionsaufnahmen (siehe Kreise in Abb. links) der Kristalle von freien und Induktorgebundenen Repressoren ist aufgrund der Mobilität der DNA-bindenden Domänen größer als die in den Aufnahmen von Kristallen der TetR^D/DNA-Komplexe¹²⁹. Dieses Verhalten wurde auch in den anderen Datensätzen (siehe Tabelle 6) beobachtet. Beide Diffraktionsaufnahmen wurden an einem MAR Research Flächenzähler mit einem Radius von 90 mm und mit CuK_α-Röntgenstrahlung (Wellenlänge = 1.5418 Å) aufgenommen.

der gemessenen Datensätze aufgelistet.

Die Datensätze, die von den hexagonalen Kristallen mit der 18mer DNA gesammelt wurden, zeigen eine anisotrope Diffraktion. Entlang der langen hexagonalen Achse wurden Reflexe bis 2.9 Å Auflösung beobachtet; in den beiden anderen Richtungen wurde nur eine Auflösung bis 3.9 Å erreicht und limitiert daher die Vollständigkeit der gemessenen Daten im Bereich von 2.9 bis 3.9 Å. Die berücksichtigte Auflösungsgrenze für die verschiedenen Kristallformen wurde aufgrund des jeweiligen Signal-Rausch-Verhältnisses und der Qualität der berechneten Elektronendichtekarten festgelegt.

Die qualitativ besten Datensätze wurden von Kristallen der TetR^D/Induktor-Komplexe mit einer maximalen Auflösung bis zu 2.2 Å gesammelt (siehe Tab. 6). Die Art der verwendeten Röntgenstrahlungsquelle spielt dabei keine Rolle. Sowohl die Kristalle des freien TetR als auch der Komplexe mit modifizierten Tc-Analoga diffraktierten bis zu einer ähnlich guten Auflösung, aber mit schlechterer Datenqualität. Dies läßt sich mit der Flexibilität des Proteins im Bereich der Induktorbindungstasche erklären, die sich teilweise auf das gesamte Protein erstreckt. TetR^D ist im freien Zustand relaxierter mit einem Gyrationradius von 32 Å⁸⁴, der 2 Å größer ist als der des induzierten Repressors TetR^D[Mg-anTc]₂. Die Flexibilität des Proteins spiegelt sich im Wilson-Temperatur-Faktor (Wilson-B-Faktor) wider, der dem mittleren isotropischen Temperaturfaktor entspricht. Während er bei den Datensätzen der freien Proteine bei 42.3 und 47.3 Å² liegt, ist sein Wert bei den Kristallen der induzierten Repressoren deutlich niedriger (28.8 Å² für 2TCT).

Die Reflexe in den Beugungsaufnahmen der DNA-gebundenen Repressoren sind insbesondere bei niedriger Auflösung besser definiert als die in den Aufnahmen von DNA-freiem TetR. Die Qualität der Reflexe ist dabei grundsätzlich von den geringen strukturellen Unterschieden der Moleküle in den kristallographischen Elementareinheiten im Kristallgitter abhängig. Je größer die Unterschiede sind, um so diffuser erscheinen die Reflexe in den Diffraktionsaufnahmen. In den TetR^D/DNA-Komplexen sind die DNA-Bindungsdomänen durch die DNA fixiert und so in ihrer Flexibilität eingeschränkt (siehe Abb. 13).

3.4 Strukturlösung mit molekularem Ersatz

Da die unterschiedlichen TetR^D-Formen in verschiedenen Kristallformen kristallisierten, wurden die Strukturen der Formen 4, 5, 6, 7, 8, 13 und 20 (siehe Tab. 6 mit molekularem Ersatz) gelöst. Die übrigen Formen besaßen die Raumgruppe der beiden publizierten TetR^D-Komplexe (I4₁2₁2)^{67, 79} und sind zu diesen Strukturen isomorph. Für die Formen 13 und 20 wurde die Struktur des induzierten Repressors TetR^D[Mg7CITc]₂ (2TCT⁷⁹) als Suchmodell verwendet. Um ein geeignetes Modell zur Lösung der Struktur des TetR^D/DNA-Komplexes zu finden, wurden zwei Strategien verfolgt. Bei der ersten

wurde ein Strukturmodell eines Komplexes aus der bekannten Struktur des induzierten Repressor (2TCT⁷⁹) und einer Operator-DNA erzeugt. Dazu wurde manuell das Fragment einer B-DNA erzeugt, deren Sequenz mit der des tet-Operators übereinstimmt. Diese Doppelstrang-DNA wurde am Graphikdisplay so in der Nähe der beiden DNA-Bindungsdomänen positioniert, daß die zweizählige Symmetrie des Repressors erhalten blieb und die hypothetischen Protein/DNA-Kontaktpunkte die biochemischen Daten am besten erklären konnten. Bei dieser Modellierung wurden auch die Atomkoordinaten eines Komplexes aus einem halben Operator und einem Helix-Turn-Helix-Motiv⁵⁷ verwendet. Dieses Modell wurde von Dr. Vera Helbl zur Verfügung gestellt und basiert auf molekularbiologische Untersuchungen. Die andere Strategie beruht auf der Verwendung der Struktur des induzierten Repressors (2TCT⁷⁹).

Für die Strukturlösung mit molekularem Ersatz wurde das Programm AMoRe verwendet. Als Kriterium für die richtige Lösung dienten die Testparameter Korrelationskoeffizient und R-Faktor. Der Schwerpunkt der Strukturkoordinaten wurden in den Mittelpunkt eines orthogonalen Koordinatensystems verschoben. Dabei wird gleichzeitig ein Radius des Suchmodelles bestimmt. Unter Verwendung dieses Parameters wurde die Rotationssuche im Auflösungsbereich von 20 bis 4 Å durchgeführt. Variationen dieser Parameter führten zu unterschiedlichen Korrelationskoeffizienten, aber nicht zu anderen Lösungen. Die Translationssuche wurde mit den besten Lösungen der Rotationssuche durchgeführt. War bis zu diesem Zeitpunkt die Raumgruppe wegen unklarer systematischer Auslöschungen von Reflexen nicht bekannt, so wurde die Translationssuche in den möglichen Raumgruppen durchgeführt und der R-Faktor der erhaltenen besten Lösungen beobachtet. Nach erfolgreicher Translationssuche wurde als letzter Schritt eine Starre-Körper-Verfeinerung durchgeführt und die erhaltene Lösung mit X-PLOR verfeinert.

Von dem TetR^D/DNA-Komplex wurde zunächst die Struktur in der Form 4 berechnet. Bei der Verwendung beider Startmodelle, also der des erzeugten DNA-Komplexes und der des Repressors ergaben sich Lösungen, bei denen die Position des Repressors identisch war. Diese Position entsprach der richtigen Lösung. Mit dieser Lösung wurde der TetR/DNA-Komplex verfeinert. Dieses Strukturmodell diente anschließend zur Strukturlösung der Formen 5, 6, 7 und 8.

3.5 Kristallographische Verfeinerung

Die Verfeinerung der zunächst groben Strukturmodelle wurde mit dem Programm X-PLOR der Versionen 3.1²⁴ und 3.845²². 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 Gütekriterium dienen der kristallographische R- Faktor ²³ und der freie R-Faktor ²¹ sowie die erhaltene Molekülgeometrie des verfeinerten Modells. Der freie R-Faktor wird aus 5 bis 10 % der Daten berechnet (nicht mehr als 1000 Reflexe), die von der Verfeinerung ausgeschlossen wurden, und beschreibt objektiv die Qualität der Verfeinerung. Bei Konvergenz des freien R-Faktors wurde die Verfeinerung abgebrochen und das erhaltene Modell als optimale Lösung festgehalten. Aufgrund des ungünstigen Daten-zu-Parameter-Verhältnisses von 1.5 bis 1.7, wird die Geometrie des Modells in sinnvollen Rahmen eingegrenzt. Diese Restriktionen, deren Parameter statistisch aus hochaufgelösten Kleinstrukturen bestimmt wurden ^{41, 124}, begrenzen die Bindungslängen und -winkel, die Planarität der Peptidbindungen und aromatischen Gruppen, Tetraeder- und Torsionswinkel sowie nichtbindende Van-der-Waals-Kontakte. Hinsichtlich der Temperaturfaktoren wurden ebenfalls Einschränkungen vorgenommen. Hierbei werden die Differenzen der Temperaturfaktoren benachbarter Atome limitiert, da sie aneinander gekoppelt sind. Die mittleren Standardabweichungen der Temperaturfaktoren für zwei aneinander gebundene Atome sind jeweils 1.5 und 2.0 für Haupt- und Seitenkettenatome, bzw. 2.0 und 2.5 für Atome die über ein drittes Atom aneinander gebunden sind. Für eine Verbesserung des Daten-zu-Parameter-Verhältnisses wurden für die Verfeinerungen der TetR^D/DNA-Komplexe die DNA-Basen nur in planarer Form zugelassen und ein Verbiegen unterbunden.

Als Ausgangsmodell für die Strukturen des freien TetR^D und der Mehrzahl der TetR^D-Komplexe, die in der Raumgruppe I4₁22 kristallisieren und isomorph sind, wurden die Atomkoordinaten von 2TCT ⁷⁹ verwendet. Das Strukturmodell von 2TCT wurde bis auf die Atomkoordinaten des Polypeptides reduziert und die Temperaturfaktoren auf 30 Å² festgelegt.

Die kristallographische Verfeinerung mit X-PLOR gliedert sich in drei Teile. Zuerst wurde das Startmodell als starrer Körper um seine Position geringfügig rotiert und translatiert, um eine grobe Anpassung zu erreichen. Da hier nur sechs Parameter verfeinert werden, ist eine Konvergenz von Modell und Daten relativ schnell erreicht. Daraufhin wurde das Polypeptid in Fragmente bis zu minimal 5 Aminosäuren aufgeteilt und diese jeweils als starre Körper bewegt. In der Starre-Körper-Verfeinerung sind die Energieterme für die Geometrieparameter ausgeschaltet, so daß bei dieser Verfeinerung nur der Energieterm optimiert wird, der die Differenz zwischen den gemessenen und berechneten Strukturparametern beinhaltet. Im zweiten Teil der Verfeinerung wurde eine Moleküldynamik durchgeführt ²⁰. Sie gliedert sich in zwei Schritte. Im ersten wurde dem Molekül bei konstanter Temperatur ein Energiebetrag zugeführt, der verschiedene Bewegungen der Atome erlaubt. Mit diesen Bewegungen werden Fehler, wie zum Beispiel zu kurze Van-

der-Waals-Kontakte von symmetrieäquivalenten Molekülen, eliminiert. Im zweiten Schritt wurde das Molekül auf hypothetische 2000 K erhitzt und langsam abgekühlt. Damit wird dem Molekül schrittweise Energie entzogen, dessen Geometrie durch Begrenzen der Bewegungsfreiheit in einer Konformation konvergiert, die den gemessenen Daten am besten entspricht. Mit dem "Erhitzen" wird die Bewegungsfreiheit des Moleküls erhöht, werden Energiebarrieren für Konformationsänderungen von Haupt- und Seitenketten überwunden. Gleichzeitig wird bei dieser Prozedur die Strukturinformation der Ausgangsmodells, der sogenannte model-bias⁶⁸, entfernt.

Die Korrektur von Fehlern im Strukturmodell ist an der Divergenz des kristallographischen R-Faktors und des freien R-Faktors sichtbar. Zu Beginn der Moleküldynamik sind beide Werte ungefähr gleich. Die Differenz zwischen beiden vergrößert sich im Verlauf der Verfeinerung bis zu 30% und hängt entscheidend von der Auflösung der verwendeten Daten ab. Im weiteren wurde durch Minimieren des kristallographischen R-Faktors das Modell an die Daten angepaßt. Dabei wurden nur die Veränderungen der Struktur akzeptiert, bei denen gleichzeitig auch der freie R-Faktor sank und die Molekülgeometrie den Standard-Werten⁴¹ entsprach. Nach abgeschlossener Verfeinerung betrug die Differenz der Prozentwerte zwischen freiem und kristallographischem R-Faktor zwischen 4.6 und 9.2 (siehe Tabelle 7).

Im Fall des chimären Repressors TetR^{BD} wurden vor der Moleküldynamik die 10 Aminosäuren der DNA bindenden Domäne der TetR^D-Sequenz mit der von TetR^B substituiert und am Graphikdisplay in die vorhandene Elektronendichte modelliert. War keine Elektronendichte zu beobachten, so wurde die jeweilige Aminosäure so modelliert, daß deren Geometrie und die Van-der-Waals-Kontakte den Standard-Werten⁴¹ entsprachen. Die Aminosäuren von 150 bis 165 wurden in den meisten Strukturen nicht modelliert, da für sie keine bzw. geringe Elektronendichte vorlag. Der Beginn und das Ende dieser nicht-modellierten Peptidschleife variiert innerhalb der verfeinerten Strukturen. Aufgrund der höheren Flexibilität des freien Proteins im Vergleich zum induzierten und DNA-gebundenen war der Anteil des nicht-modellierten Proteins maximal und betrug im Fall des TetR^{BD} 6.7%.

Die Kristallformen der TetR^D/DNA-Komplexe unterscheiden sich u. a. hinsichtlich der Größe ihrer asymmetrischen Einheit. Der Inhalt der asymmetrischen Einheit ist für die sechs Formen in Tabelle 7 beschrieben. Bei den Kristallformen 5 und 6, in denen ein DNA-Duplex bzw. ein DNA-Einzelstrang in der asymmetrischen Einheit vorliegt, wurde das zentrale Basenpaar AT zweifach fehlgeordnet mit einer Besetzung von jeweils 50 % modelliert. In den Kristallformen 4, 7 und 8 wurde willkürlich in einem der DNA-Einzelstränge die zentrale Basenposition mit Adenin besetzt und die gegenüberliegende

Tabelle 7: Kristallographische Verfeinerung

Freiheitsgrade und Ergebnisse der Verfeinerung. Die Abweichungen der Modelle von der Standardgeometrie^{41, 124} sind als Wurzel der mittleren Quadrate angegeben. Die Struktur der Form 3 wurde nicht gelöst. Aufgrund der Auflösung wurde von den DNA-Komplexen die Geometrie nicht verfeinert. Bei den Formen 4 und 8 sowie der beiden Mutanten in den Formen 16, 18 und 19 wurde nur die Starre-Körper-Verfeinerung, ein Zyklus "Simulated annealing" und die Gruppentemperaturverfeinerung durchgeführt. Eine weitere Verfeinerung war bei der vorliegenden Datenqualität nicht sinnvoll.

Struktur	TetR ^D	TetR ^{BD}	18mer	18mer	15mer AT/GC	15mer GC/GC	13mer	Ni-7CITc	Mg-9gylTc	Mg-9NO ₂ Tc	7CITc ohne Mg	zwei 7CITc ein Mg	4epiTc	2CNTc	PT105o	DG1780+
Form	1	2	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	17	20
Inhalt der as. Einheit	Monomer	Monomer	Dimer/ Duplex	Dimer/ Duplex	Monomer/ Einzelstr.	Monomer/ Einzelstr.	Dimer/ Duplex	Monomer	Monomer	Monomer	Monomer	Dimer	Monomer	Monomer	Monomer	Dimer
max. Auflösung	2.2	2.4	3.9	3.0	2.5	4.0	3.5	2.2	2.4	2.2	2.4	2.7	2.7	2.65	2.4	2.4
Anzahl der Reflexe	10487	9076	6538	9302	11520	1294	7259	11250	8428	11066	7958	12709	6010	6023	8160	17891
Anzahl der Atome ohne Solvens	1550	1541	3835	3666	1877	1877	3631	1675	1605	1609	1575	3282	1582	1581	1588	3194
R Faktor	23.2	21.4	36.6	28.3	24.4	38.7	30.5	20.0	22.2	23.3	24.2	20.3	24.3	26.1	22.5	23.2
freier R Faktor	29.6	27.5	45.1	34.5	30.7	40.4	37.8	24.6	27.7	28.4	32.4	26.5	30.7	32.7	30.2	28.9
mittlerer B-Faktor																
Hauptketten- atome	55.8	45.5	-	20.6	44.6	-	-	36.3	47.2	36.9	67.2	45.2	57.7	59.3	55.7	40.4
Seitenketten- atome	59.5	49.5	-	20.6	47.5	-	-	40.0	49.5	41.6	70.6	47.1	62.0	54.1	59.6	43.1
Induktor/DNA	-	-	-	23.6	55.0	-	-	26.6	43.1	33.2	59.5	51.0	78.1	63.3	76.0	53.2
Solvens	56.5	48.8	-	-	48.9	-	-	44.2	43.5	53.4	-	41.6	63.3	52.0	64.3	41.9
Anzahl der Wasser	27	28	-	-	41	-	-	90	27	61	0	58	5	6	9	35
Abweichungen von der Standardgeo- metrie																
Bindungslängen	0.007	0.007	-	0.008	0.008	-	-	0.013	0.008	0.010	0.009	0.012	0.013	0.008	0.008	0.007
Bindungswinkel	1.21	1.20	-	1.99	1.34	-	-	2.51	1.31	1.56	1.33	2.58	2.80	1.49	1.37	1.28
Planare und chirale Gruppen	1.18	1.18	-	3.99	1.31	-	-	1.70	1.14	1.26	1.56	1.77	2.01	1.76	1.17	1.62
Torsionswinkel	18.6	19.8	-	22.4	20.6	-	-	19.6	19.8	18.9	18.1	19.3	19.1	19.2	18.8	18.5

Base des andere Stranges als Thymin modelliert da bei der vorliegenden Auflösung zwischen Purin und Pyrimidin nicht unterschieden werden kann.

Tc wurde nach dem "simulated annealing" in die vorhandene Restelektronendichte im Bereich der Bindungstasche modelliert. Flexible Bereiche der Tc-Moleküle, für die keine Elektronendichte zu beobachten war, wurden erst dann eingebaut, wenn die Elektronendichte mit Phasenwinkeln aus den Modellen verbessert war, daß eine Interpretation möglich war. Im dritten Teil der Verfeinerung wurde durch wechselseitiges Verfeinern der Atompositionen und der Temperaturfaktoren sowie durch manuelle Korrektur das Modell am Graphikdisplay an die Daten angepaßt. Die Geometrie der Atomkoordinaten wurde in den letzten Schritten der Verfeinerung mit verschiedenen Programmen `Act`²⁹, `ONO`⁷², `Procheck`⁹⁰, `Promotif`⁶⁹, `whatif`¹⁷⁰, `X-PLOR`^{24, 22}, analysiert. Alle Aminosäuren bis auf Leu204 liegen in erlaubten Bereiche des Ramachandran-Diagrammes¹³². Diese Aminosäure ist in allen DNA-freien Strukturen C-terminal zu Helix 10 und Teil einer β -Schleife vom Typ II'¹³⁴. In den DNA-Komplexen ist dieser Bereich α -helikal. Die Geometrieparameter der übrigen Aminosäuren stimmen mit den Standardwerten überein. In Tabelle 7 sind die Verfeinerungsdaten zusammengefaßt.