

Modell des Induktionsmechanismus

Die Bindungstasche von $[\text{MTc}]^+$ ist ca. 30 Å von der Erkennungshelix entfernt und da die molekulare Masse des Induktors nur 2 % der des TetR-Monomers beträgt, ist eine Reihe von hochspezifischen Wechselwirkungen notwendig, die das Induktionssignal von der Bindungstasche zum DNA-Bindungsmotiv übertragen. Für elektrostatische Interaktionen zwischen der positiven Ladung des Induktors und der negativ geladenen DNA, wie im Fall des Met-Repressors berichtet wurde^{153, 130}, ist der Abstand zu groß. Es ist demnach eine Konformationsänderung des Repressors notwendig, der die DNA-Bindungsaffinität von TetR reguliert.

5.1 Der Informationsweg des Induktionssignals

In den bekannten prokaryotischen Regulatorproteinen sind mehrere Formen von Konformationsänderung beobachtet worden, die bei Bindung des spezifischen Effektormoleküls ablaufen. Beim Regulator des Tryptophan-Operons bindet das Tryptophan neben die Erkennungshelix, verschiebt diese und nimmt an der DNA-Bindung teil. Beim Regulator des

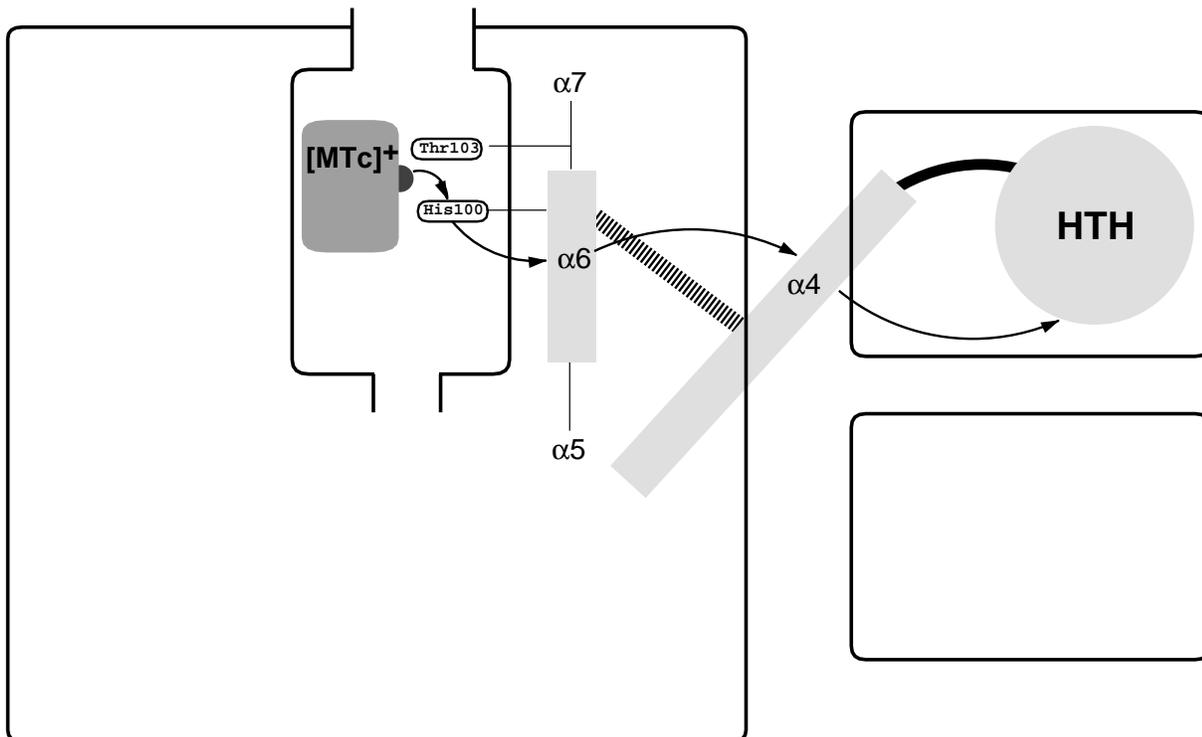


Abbildung 69: Informationsweg des Induktionssignals

Die Bindungstasche, die Helizes 4 und 6, die DNA-bindende Domäne und die Form des Repressors sind schematisiert. Pfeile zeigen den Signalweg vom gebundenen $[\text{MTc}]^+$ zum HTH-Motiv. Die gestrichelte Linie symbolisiert den Van-der-Waals-Kontakt zwischen den Helizes 4 und 6.

Lactose-Operons bindet Lactose zwischen die beiden zentralen Domänen von LacI und verändert die Position der DNA-bindenden Domäne, die an die N-terminale der beiden zentralen Domänen gebunden ist. Beim CAP-Protein befindet sich die Effektorbindungsstellen zwischen der N-terminalen Hauptdomäne und einer der beiden DNA-bindenden Domänen des Homodimers. Der gebundene Effektor cAMP induziert das Verschließen der Bindungstasche und damit eine Bewegung der DNA-bindenden Domäne. Diese drei "klassischen" Repressoren unterscheidet sich von TetR wegen der relativen Position der Effektorbindungsstelle sowie allein schon dadurch, daß im Vergleich zu allen bisher bekannte Repressoren TetR die größte Affinität zu seinem Effektormolekül besitzt.

Der Induktor wird im TetR^D mittels hydrophiler und hydrophober Wechselwirkungen zu verschiedenen Aminosäureseitenketten in der Bindungstasche fixiert (vgl. Kap. 4.7). Das Induktionssignal wird daraufhin durch Wechselwirkung der Seitenketten His100 und Thr103 mit dem Tc-gebundenen zweiwertigen Kation auf die Helix 6 übertragen (siehe Abb. 69). Die Helix 6 bestimmt die Position der Helix 4, die am C-Terminus fixiert und am N-Terminus flexibel ist. Mit Rotationen der Helix 4 um ihren C-Terminus wird die Position des N-terminalen Drei-Helix-Bündels variiert. Der Abstand und die relative Orientierung der HTH-Motive werden im Laufe der Induktion geändert und somit die Affinität von TetR^D zum Operator gesenkt. Im weiteren Verlauf der Diskussion werden die einzelnen Bereiche der Signaltransduktion näher analysiert.

5.2 Die drei $[MTc]^+$ -bindenden Gruppen

Im Vergleich der Kristallstrukturen von 2TCT⁷⁹ und Mg²⁺-freiem TetR^D (Form 12) zeigte sich, daß bestimmte Aminosäuren für die Tc-Bindung notwendig sind und andere für die Signaltransduktion. Anhand dieses Vergleiches lassen sich die Aminosäuren der Bindungstasche in drei Gruppen einteilen:

1. Diese Gruppe umfaßt eine der beiden hydrophilen Kontaktflächen, die sich am Ende der Bindungstasche befindet. Sie ist neben dem Wasseraustrittskanal lokalisiert und umfaßt die Aminosäuren His64, Asn82, Phe86 und Gln116. Diese Aminosäuren bilden die einzigen Wasserstoffbrücken zum Tc und komplexieren das Antibiotikum am Ring A.
2. Die Aminosäuren Pro105, Val113, Leu131, Ile134, Leu170', Leu174' und Met177' des hydrophoben Bereiches der Bindungstasche binden an die hydrophobe Seite des Tc. Diese Aminosäuren werden bei Induktorbindung fixiert und bilden den Verschuß der Bindungstasche.

- Die dritte Gruppe umfaßt die Aminosäuren His100, Thr103 und Glu147', die direkt oder über Wassermoleküle vermittelt M^{2+} koordinieren. Sie bilden die zweite hydrophile Kontaktfläche in der Bindungstasche. Mit der Bindung von $[MTc]^+$ wird das Induktionssignal von dem Tc-gebundenen M^{2+} über His100 und Thr103 weitergeleitet. Dafür ist die oktaedrische Koordinierung des zweiwertigen Kations erforderlich. Die korrekte Positionierung des Tc-gebundenen Magnesiumions wird durch die Aminosäuren der ersten beiden Gruppen gewährleistet.

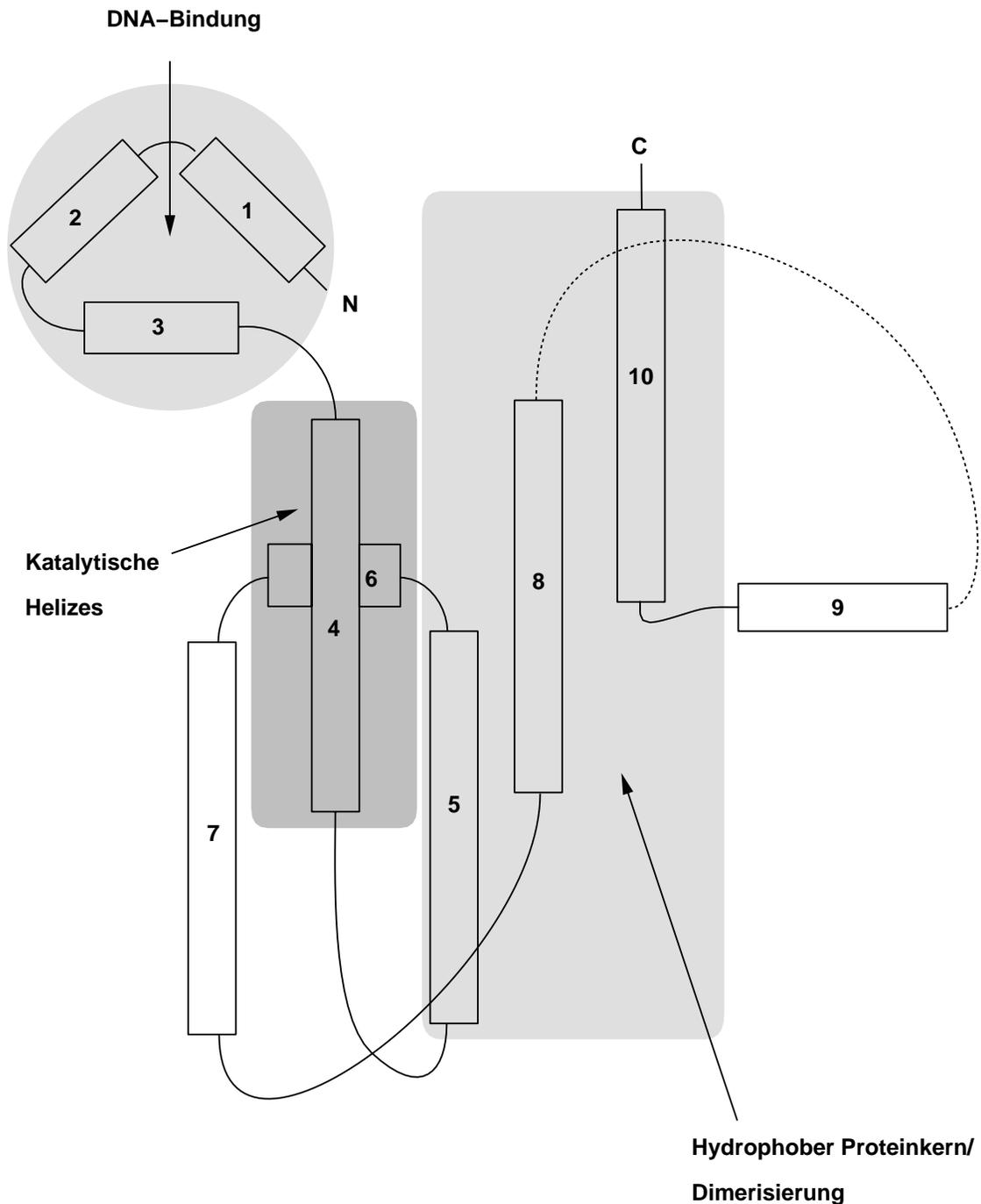
Mutationen an beliebigen Positionen innerhalb der Bindungstasche, aber insbesondere an den Aminosäuren der ersten und der dritten Gruppe verhindern entweder die korrekte Positionierung des Induktorkomplexes $[MTc]^+$ oder die weitere Signaltransduktion.

5.3 Der "Falltür"-Verschluß der Bindungstasche

In dem relaxierten, freien $TetR^D$ ist die Helix 9' so positioniert, daß die Bindungstasche eine ausreichend große Öffnung für den Eintritt von $[MTc]^+$ bietet. Nach bzw. durch Induktorbindung verschiebt sich diese Helix um die Länge des halben Durchmessers einer α -Helix (2.4 Å). Die Translation der Helix 9' ist zu den DNA-bindenden Domänen gerichtet, die gleichzeitig auch zur Annäherung an die Schleife zwischen den Helix 6 und 7 führt. Die beiden Bereiche bilden Kontakte und verschließen den Eingang zur Induktorbindungstasche. Dabei bilden sich die hydrophoben Kontakte zwischen den Aminosäuren der Helix 9' und dem Induktor aus. An dieser hydrophoben Kontaktfläche sind auch noch Aminosäuren der Helizes 7 und 8 beteiligt (siehe Abschnitt 5.2). Wegen der Flexibilität der hydrophoben Aminosäuren im nichtinduzierten $TetR^D$ und der geringen Spezifität der Van-der-Waals-Wechselwirkungen, werden auch Tc-Analoga gebunden, die sich vom Tc im Bereich der hydrophoben Tc-Seite unterscheiden.

Über die funktionelle Bedeutung der Flexibilität der Helix 9 wurde bereits spekuliert⁷⁸. Bei der damals vorliegenden Auflösung der Daten von 3.1 Å wurde eine Aufwindung der Helix unter Bildung einer Reihe von β -Schleifen vorgeschlagen. Anhand der jetzt vorliegenden Kristallstrukturen konnte gezeigt werden, daß es nicht zu einer Aufwindung dieser Helix kommt, sondern daß diese Helix eine Translation parallel zur Proteinoberfläche ausführt. Im freien $TetR^D$ ist die Position der Helix 9 relativ flexibel, was sich in der fragmentarischen Elektronendichte zeigt. Im induzierten $TetR^D$ dagegen ist sie als Verschluß der Bindungstasche gut fixiert und verhindert so das Herausdiffundieren des Antibiotikums.

Die zweite Komponente des Verschlusses der Bindungstasche sind die beiden Schleifen zwischen den Helizes 6 und 7 bzw 8' und 9'. Während die zweite Schleife nur in den indu-

Abbildung 70: Schematische Darstellung des TetR^D

TetR^D besteht aus zehn Helizes, die hier als Kästen dargestellt sind. Das HTH-Motif besteht aus den Helizes 2 und 3, wobei die letztere die Erkennungshelix ist. Die Helizes 4 und 6 bestimmen die Position der DNA-bindenden Domäne, wobei die Helix 6 in ihrer Position und der Länge von der Bindung des Induktors [MTc]⁺ abhängt. Die Helizes 5, 8 und 10 bilden mit den symmetrie-äquivalenten Helizes 5', 8' und 10' den Proteinkern der großen Domäne. Die im Kapitel 5.6 angesprochenen "Federn" betreffen in dieser Abbildung die jeweils "oberen" Bereiche der Helizes 5, 7 und 8.

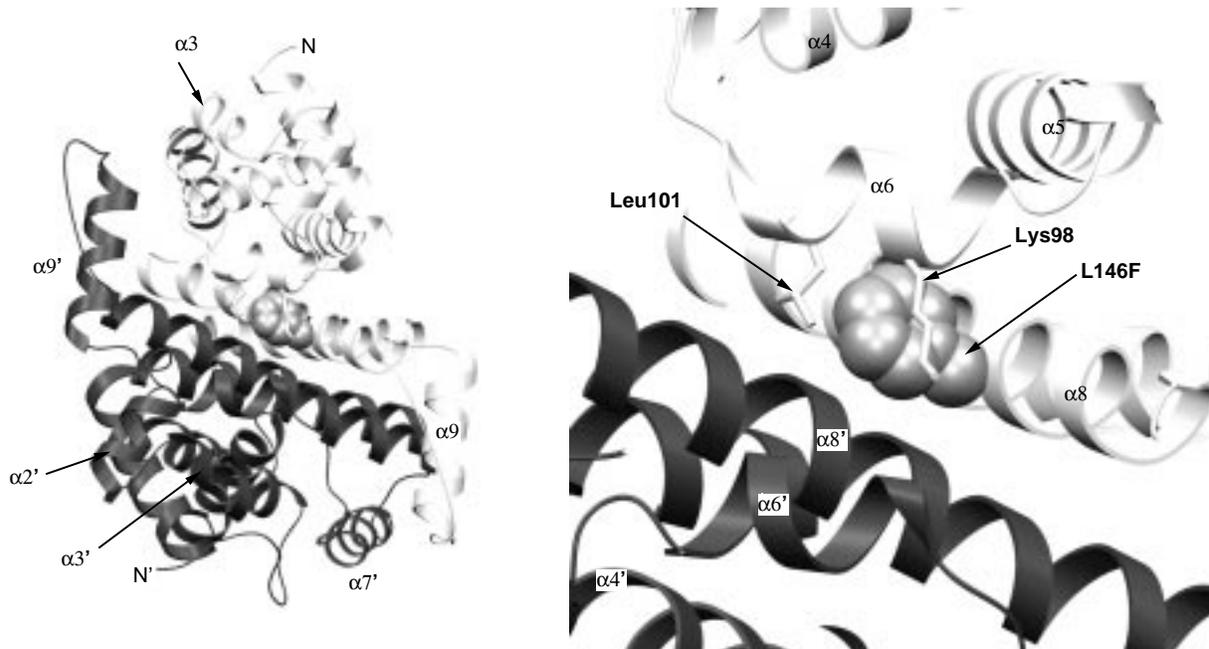


Abbildung 72: Interaktion zwischen Phe146 und der Helix 6

Die Substitution von Leu146 durch Phe146 wurde am Graphikdisplay vorgenommen. Dabei wurde das Leucin aus dem TetR^D/15merDNA-Komplex (Form 6) durch Phenylalanin unter Beibehaltung der Orientierung der Seitenkette substituiert. Jeweils ein Monomer ist hell und das andere dunkel dargestellt. In der detaillierten rechten Abbildung sind die beiden Aminosäuren Lys98 und Leu101 der Helix 6 gezeigt, die Phe146 kontaktieren. Das Phe146 (als van-der-Waals-Sphären gezeigt) dringt mit seinem aromatischen Ring in eine der Furchen der Helix 6 und stabilisiert so die Position dieser Helix in der DNA-gebundenen Konformation. Dadurch wird die Translation der Helix 6 verhindert und die Mutante ist nicht induzierbar.

die Helix 6 im ersten Schritt der Induktion um 1.5 Å verschoben wird. Die Translation der Helix 6 findet nur bei Induktion des DNA-gebundenen Zustandes statt, da im freien TetR die Positionen der Helix 6 mit der im induzierten Zustand übereinstimmt. Das Kation übernimmt eine entscheidende Aufgabe bei der Induktion, da durch ihn die Translation der Helix 6 initialisiert wird. Erst wenn die Helix 6 die Position erreicht, die in den DNA-freien TetR vorliegt, ist die Komplexierung des zum Induktor gehörenden Kations möglich. Experimente unter Verwendung anderer Metallionen, die eine höhere Affinität zu Imidazol besitzen, können TetR effektiver induzieren, da sie eine höhere Affinität zu His100 besitzen ¹¹⁹).

Im nächsten Schritt der Induktion entwindet sich die C-terminale Schleife der Helix 6 und die Aminosäuren 100 bis 103 bilden eine β -Schleife. Diese beiden Veränderungen in der Induktorbindungstasche (Verschiebung und Sekundärstrukturänderung) wirken sich auf die Gesamtstruktur des Repressors aus und sind die eigentliche Ursache für den Verlust der Affinität von TetR zu seinem Operator. Im Kapitel 5.6 wird gezeigt, daß die Translation der Helix 6 durch das Relaxieren der deformierten Helizes 5 und 8 gefördert wird. Die

Position der Helix 6 ist mit der Deformation der Helizes 5 und 8 (im DNA-gebundenen Zustand) bzw Helix 7 (im induzierten Zustand) gekoppelt. Die gleichzeitige Deformation aller drei Helizes ist bei DNA- oder $[MTc]^+$ -Bindung nicht möglich, und darum entscheidet die Position der Helix 6, in welchem Bereich es zu Spannungen kommt. Im freien TetR^D sind die drei Helizes 5, 7 und 8 relaxiert.

Die Translation der Helix 6 ist wahrscheinlich der Grund dafür, daß bei der Mutante L146F keine Induktion zu beobachten ist (siehe Abschnitt 4.9). Der Phenylring von F146 kontaktiert eine Furche der Helix 6 und befindet sich in ihr, wenn die Helix 6 in der Position des DNA-gebundenen TetR^D vorliegt (siehe Abb. 72). Die Translation der Helix bei Induktion wird somit gestört, der DNA-gebundene Zustand begünstigt und damit ist diese Mutante nicht induzierbar.

5.5 Der "Hebel" - die Helix 4

Die Helix 4 bildet drei Verknüpfungen zwischen den funktionell wichtigen Teilen von TetR^D (siehe Abb. 71). Ihr N-Terminus ist Teil des hydrophoben Kerns der DNA-Bindungsdomäne und positioniert diese Domäne relativ zur großen Repressordomäne. Der mittlere Teil der Helix 4 ist in Van-der-Waals-Kontakt mit der Helix 6, die bei Induktion die Position der Helix 4 verändert. Der C-Terminus der Helix 4 ist schließlich an der Koordination des Induktors beteiligt, da die erste Aminosäure nach der Helix 4, His64, eine der vier Aminosäuren ist, die direkte Wasserstoffbrücken zum Tc ausbilden, das durch die umgebenden Aminosäuren relativ fixiert ist.

Die Bewegungen der Helix 4 beschränken sich auf verschiedene Rotationsbewegungen um ihren C-Terminus und entsprechen damit dem Modell der von Gerstein et al.⁵² beschriebenen Scharnierbewegungen. Im freien TetR^D befinden sich die beiden Helizes 4 und 4' in solchen Positionen, daß die Erkennungshelizes der HTH-Motive 40.6 Å voneinander entfernt sind. Sowohl bei Induktion als auch bei DNA-Bindung verringert sich dieser Abstand durch unterschiedliche Drehbewegungen der Helix 4, wobei die Rotationsnormalen senkrecht zueinander stehen. Während sich bei DNA-Bindung der N-Terminus parallel zur großen Furche der DNA, also nahezu senkrecht zur DNA-Helix bewegt, wird er durch Induktorbindung parallel zur DNA-Helix bewegt. In beiden Fällen schwingt die Helix 4 um den C-Terminus. Der Winkel beträgt bei DNA-Bindung 4° und bei Induktorbindung 3° (berechnet mit `helixang`²⁹).

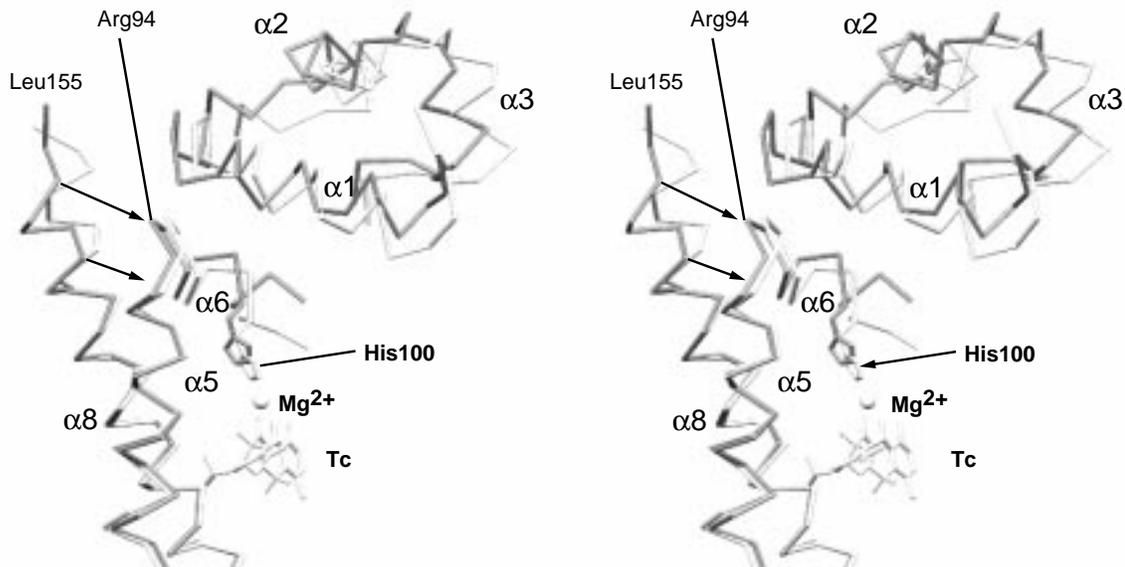


Abbildung 73: Die "Federn" 5 und 8

Die C-Termini der Helizes 5 und 8 werden im DNA-Komplex deformiert, so daß sie bei Induktion die Verschiebung der Helix 6 katalysieren. Dargestellt sind von den TetR^D-Komplexen mit [Mg-7ClTc]⁺ (hell, 2TCT⁷⁹) und mit DNA (dunkel, Form 6) die C_α-Atome der Helizes 1, 2, 3, 5, 6 und 8. Die Pfeile markieren die Wechselwirkungen zwischen den Helizes 5, 6 und 8.

5.6 Die "Federn" - die Helizes 5, 7 und 8

Es ist sehr unwahrscheinlich, daß einzig und allein die Wechselwirkungen von [MTc]⁺ und TetR den Repressor induzieren. Im TetR[MTc]₂-Komplex werden zwar mehr Wasserstoffbrücken gebildet, unter anderem durch die größere Anzahl von modellierten Wassermolekülen. Aber für einen Affinitätsverlust von 10⁸ ($\Delta G = -45.7$ kJ) sind bei Induktion 10 bis 15 zusätzliche Wasserstoffbrücken notwendig. Das ist bei der Anzahl von freien Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren nicht möglich. Es ist eher zu vermuten, daß zusätzliche Effekte, die bei DNA-Bindung unter Spannung gesetzt werden, diese aber nicht reduzieren, die Induktion dagegen katalysieren.

Im Zentrum der großen Proteindomäne existieren zwei Helizes, 5 und 8, die eine solche Funktion ausführen könnten. Beide Helizes sind im Zentrum der großen Proteindomäne lokalisiert, und kontaktieren mit ihren C-Termini den N-Terminus von Helix 6. Im DNA-gebundenen Zustand sind Helix 5 und Helix 8 relativ zu den beiden anderen TetR-Formen verschoben (siehe Abb. 73). Dabei handelt es sich um Rotationen der C-terminalen Bereiche der jeweiligen Helix (6 bzw. 8 Aminosäuren) um eine Aminosäure im Mittelteil der entsprechenden Helix (Phe86 und Leu146) von 7° bzw. 13°.

Es ist anzunehmen, daß im freien Zustand, der in diesem Bereich mit dem induzierten TetR übereinstimmt, beide Helizes eine relaxierte Form annehmen, was im DNA-Komplex nicht der Fall ist. Aus diesem Grund, liegen die vier Helizes (5, 5', 8 und 8') im gespannten

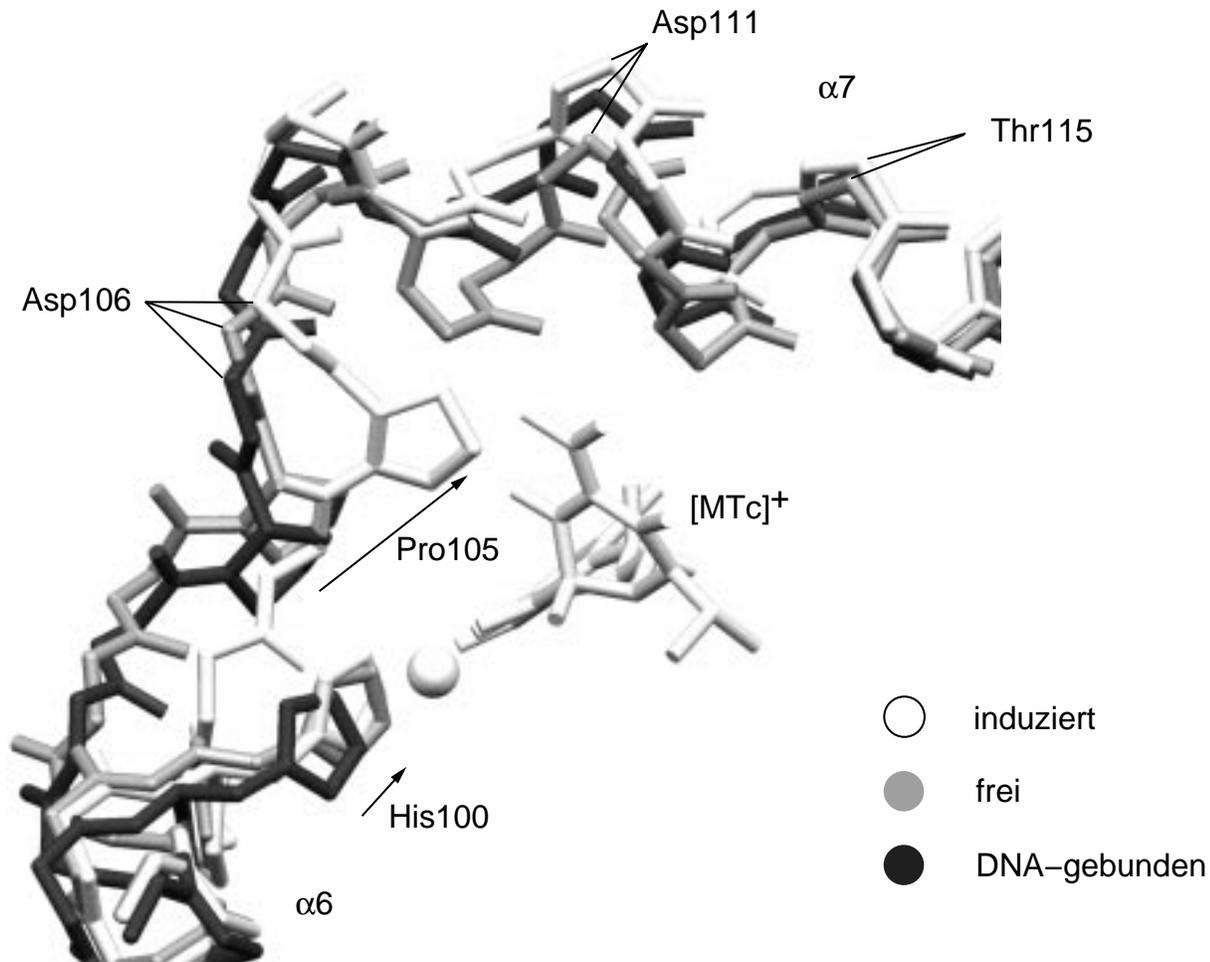


Abbildung 74: Vergleich der drei TetR-Formen im Bereich der $[MTc]^+$ -Bindungstasche. Gezeigt sind die überlagerten Strukturen von TetR^D im induzierten (weiß, 2TCT⁷⁹), im freien (grau, Form 1) und im DNA-gebundenen Zustand (schwarz, Form 6). Mit Pfeilen sind die Verschiebungen von His100 und Pro105 während der Induktion dargestellt.

Zustand vor, der zwar keinen direkten Einfluß auf die DNA-Bindung hat, aber mit der Position der Helix 6 bzw. 6' wechselwirkt (siehe Abb. 73). Durch Überführung der "gespannten" Helizes 5 und 8 in die Konformation des induzierten TetR wird eine Translation der Helix 6 gefördert.

Die dritte "Feder" befindet sich am N-Terminus von Helix 7. Bei Induktion des freien TetR bildet sich aus dem N-Terminus der Helix 7 eine 3_{10} -Helix. Im nichtinduzierten TetR^D liegt die Helix 7 als reine α -Helix vor. Die Helixentwindung von α - zu 3_{10} -Helix ist energetisch ungünstig und wird durch Wechselwirkungen des Induktors mit der Helix 7 und der Schleife vor dem N-Terminus von Helix 7 erzwungen (siehe Abb. 74). Der energetisch günstigere Zustand liegt in dem freien TetR^D vor. Dort erstreckt sich die Helix 7 von Aminosäure 107 bis 121. Diese Helix ist relativ flexibel, was durch die hohen

Temperaturfaktoren verdeutlicht wird (Abb. 18 Seite 45) und wesentlich sein könnte für die Deformation in die 3_{10} -helikalen Struktur bei Induktion.

Die Verkürzung der Helix 7 erfolgt aufgrund von zwei Ereignissen. Einerseits wird der N-Terminus der Helix zum Proteinkern gezogen und andererseits wird der mittlere Teil der Helix vom Protein weggedrückt (vgl. Abb. 26 auf Seite 55). Die Bewegung des N-Terminus erfolgt aufgrund einer Translation der Aminosäure Pro105 zum Mittelteil von Helix 7, die durch hydrophobe Kontakte zum Induktor erzwungen wird (siehe Abb. 74). Die Bewegung des zentralen Teils der Helix 7 ist die Folge des Kontakts zwischen den Substituenten am Atom 6 des Tc-Rings C und der Aminosäureseitenkette Val113.

Die Deformation der Helix 7 ist funktionell wichtig. Es ist notwendig, daß sich der N-Terminus dieser Helix zu einer energetisch ungünstige 3_{10} -Helix umwandelt, damit der Schleifenbereich aus den Aminosäure 103 bis 106 unter Spannung steht und die Position der Helix 6 fixiert wird. Bei DNA-Bindung ist es notwendig, daß sich die Helix 6 von der Helix 7 wegschiebt, um die Helix 4 und damit das N-terminale Drei-Helix-Bündel zu positionieren. Ist aber durch Induktorbindung die Helix 7 bereits entwunden und ist so eine Vergrößerung des Abstands zwischen den Helizes 6 und 7 nicht möglich, kann sich die Helix 6 nicht bewegen und eine DNA-Bindung ist so nicht möglich.

Im DNA-Komplex (Form 6) besitzt die Helix 7 eine Konformation, die im Mittel zwischen der des freien und des induzierten TetR liegt. Das Sekundärstrukturanalyseprogramm DSSP⁷⁴ erkennt die Helix 7 erst ab Tyr110, wie im induzierten TetR. Dagegen erstreckt sich die Helix 7 in dem TetR/DNA-Komplex der Form 5 (3.0 Å Auflösung) von Lys108 bis Glu122. Diese Unterschiede lassen sich auf die oben angesprochene Flexibilität am N-Terminus der Helix 7 erklären. Man kann also annehmen, daß die Helix 7 im DNA-gebundenen TetR zwar bei Glu107 anfängt, aber daß dieser N-Terminus deformiert ist. Die Ursache dafür liegt in der Verschiebung der Helix 6 von der Helix 7 weg (siehe Kapitel 5.4). In beiden TetR, frei und DNA-gebunden, ist der N-Terminus der Helix 7 nicht so rigide, wie in anderen α -Helizes. Deshalb ist die Defomation im DNA-gebundenen TetR möglich.

5.7 Orientierung und Abstände der DNA-Bindungsmotive

Der Schwerpunktabstand der Erkennungshelizes von TetR^D beträgt im DNA-gebundenen Zustand 36.6 Å. Beim Ablösen von der DNA vergrößert er sich auf 40.6 Å und beträgt im induzierten TetR^D 39.1 Å (siehe Abb. 75). Es ist schwierig zu sagen, ob sich bei der Induktion der DNA-gebundenen Form die Erkennungshelizes erst auf weitere 4 Å voneinander entfernen, um sich dann wieder um 1.5 Å zu nähern, jedoch ist offensichtlich, daß im freien TetR der Abstand der Erkennungshelizes dem spannungsfreiesten Zustand

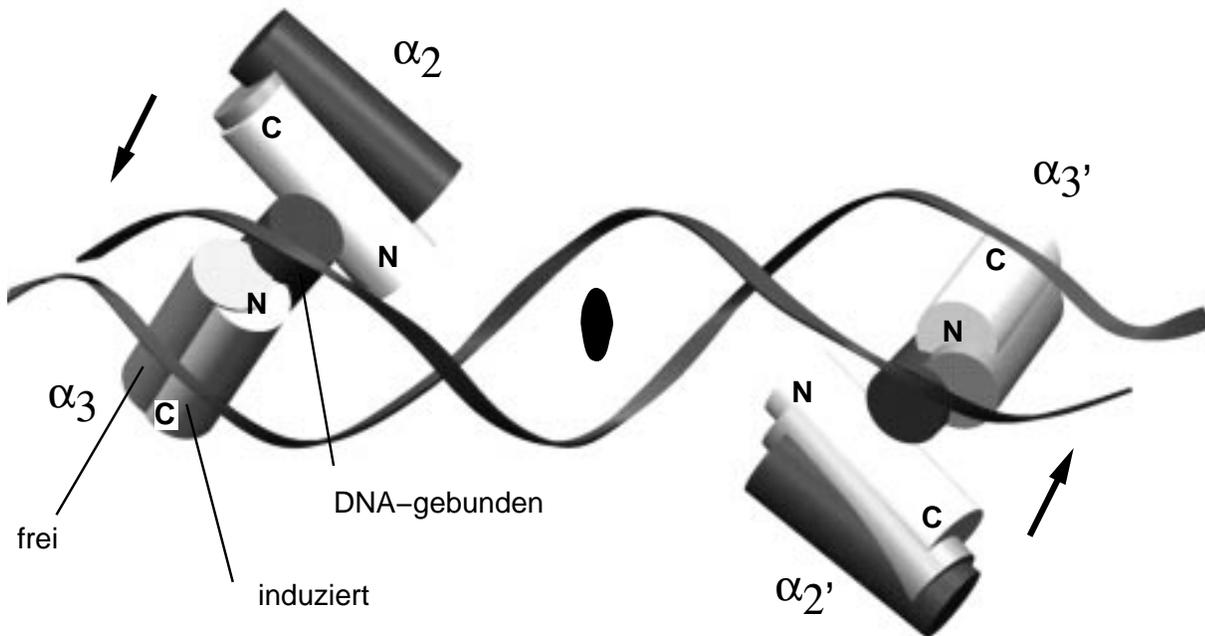


Abbildung 75: Bewegung des DNA-Bindungsmotivs bei Induktion

Gezeigt sind die beiden Helix-Turn-Helix-Motive, wobei die Helizes als Säulen symbolisiert sind. Die DNA wird durch die zwei horizontal gewundenen Schleifen präsentiert. Mit den beiden Pfeilen sind die Bewegungsrichtungen der HTH-Motive von dem DNA-gebundenen (dunkel) zu dem induzierten Zustand (hell) dargestellt. Bei Induktion bewegen sich die HTH-Motive entlang der tiefen Furche, so daß sich der Schwerpunktabstand der Erkennungshelizes von 36.6 auf 39.6 Å vergrößert. Zum Vergleich ist die Position der HTH-Motive im freien Zustand dargestellt (grau). Im freien TetR^D beträgt der Abstand der Erkennungshelizes 40.6 Å. Die Ellipse im Zentrum markiert die zweifache Rotationssymmetrie.

entspricht. Durch Bindung an den Operator oder an den Induktor wird TetR^D in eine gespannte, energetisch ungünstigere Konformation gezwungen. Nach erfolgter Induktion ist die Bindung an die DNA so schwach, daß sie freigegeben wird.

Der Abstand der HTH-Motive wird entsprechend dem vorherigen Abschnitt durch die Helizes 4 und 4' bestimmt. Bei Induktion des freien Repressors verschiebt sich das Drei-Helix-Bündel um ca. 1 Å und translatiert die Erkennungshelix (Helix 3) um ca. 1.5 Å. Bei DNA-Bindung ist neben der Translation des Drei-Helix-Bündels von ca. 2.5 Å parallel zur DNA-Helixachse (Verschiebung der Erkennungshelix um ca. 3.0 Å), noch eine Rotation des Drei-Helix-Bündels um 13° zu beobachten. Diese Rotation gewährleistet eine optimale Lage der Erkennungshelix in der großen Furche und ermöglicht die Ausbildung der spezifischen Wechselwirkungen zwischen Operator und Repressor.