

Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Plasmide und Zellstämme

Stämme für die Überexpression:

E. coli Stamm RB791 [Brent, Ptaschne]

Expressionsvektoren:

TetR^D (Aminosäuren 2 bis 208): pWH610

TetR^{BD} (Aminosäuren TetR^B 2-50, TetR^D 51-208): pWH1950

TetR^D Mutanten: pWH610-X; X=G102R, P105T, L146F, D178G

2.1.2 Pufferlösungen

Zellaufschluß und Proteinaufreinigung: Puffer S0: 20 mM Tris-HCl pH 8.0.

Puffer S10: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.02 % (w/v) NaN₃.

Puffer S200: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.02 % (w/v) NaN₃.

Puffer S1000: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1000 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.02 % (w/v) NaN₃.

Aufreinigung von Oligodesoxyribonukleotiden:

Puffer RA: 100 mM Triethylamin in H₂O, mit Essigsäure auf pH 7.5 eingestellt.

Puffer RB: 100 mM Triethylamin in Methanol, mit Essigsäure auf pH 7.5 eingestellt.

Lösung KA: 10 mM NaOH.

Lösung KB: 10 mM NaOH und 1 M NaCl.

Puffer KC: 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5.

Puffer KD: 1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5.

2.1.3 Nährmedien für die Zellanzucht

LB-Medium: 10 g/l Baktotrypton, 5 g/l Hefeextrakt und 10 g/l NaCl werden mit NaOH auf pH 7.5 eingestellt und nach dem Autoklavieren mit Ampicillin versetzt zu 100 mg/l.

SB-Medium 30 g/l Baktotrypton, 15 g/l Hefeextrakt und 30 g/l NaCl werden mit NaOH auf pH 7.5 eingestellt und nach dem Autoklavieren mit Ampicillin versetzt zu 100 mg/l.

2.1.4 Chemikalien

7HTc wurde von Boehringer Mannheim, 7CITc von Sigma bezogen. Die Tetrazykline 9glyTc, 2nitriTc, 4epiTc und 9NO₂Tc wurden freundlicherweise von Lederle Laboratories, American Cyanamid Company, zur Verfügung gestellt.

2.2 Biochemische Methoden

2.2.1 Fermentation und Zellaufschluß

Die *E. coli* Überproduzenten der verschiedenen TetR-Varianten wurden in 50% Glycerin bei -70°C gelagert. Zur Anzucht wurden Zellen des jeweiligen Überproduzenten auf einer Agarplatte, die das Antibiotikum Ampicillin (100 mg/l) enthielt, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Von dieser Platte wurde eine Kolonie gepickt und damit dann 100 ml steriles LB Medium angeimpft, das bei 200 UpM bei 37°C über Nacht geschüttelt wurde. Von dieser Vorkultur wurde die Hauptkultur (5 l LB oder SB Medium verteilt auf 5 Schüttelkolben) im Verhältnis 1:50 angeimpft und wiederum für 3 bis 4 Stunden bei 37°C geschüttelt. Das Wachstum der Hauptkultur wurde in halbstündlichem Abstand durch Messung der Extinktion eines 1 ml Aliquots bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt. Nach Erreichen einer Extinktion von 0.8 bis 1.0 OD_{600} wurde die Produktion von TetR durch Zugabe von Isopropylthiogalaktopyranosid (Endkonzentration 0.4 mM) induziert.

Nach weiteren 3 Stunden wurden die Zellen durch Abzentrifugieren in einem GS3 Rotor (Sorvall) bei 6000 UpM geerntet und das Pellet gewogen. Aus 5 l Medium wurden gewöhnlich ca. 30 g Zellen (Naßgewicht, LB-Medium) bzw. ca 70 g Zellen (SB Medium) erhalten. 30 g Zellen wurden in 100 ml S10 Puffer resuspendiert; eine Spatelspitze festes Lysozym wurde zugegeben. Der Zellaufschluß erfolgte nach einstündigem Rühren der Zellsuspension entweder durch Ultraschallbehandlung (5 x 1 Minute, 150 W) oder durch zweimalige Behandlung mit einer Zellpresse (French-Press, Aminco). Die Zelltrümmer wurden mittels Zentrifugation (14000 UpM, 30 Minuten, SS34 Rotor) von den löslichen Zellbestandteilen getrennt.

2.2.2 Proteinreinigung

Die Proteinreinigung beruht allein auf chromatographischen Techniken. Alle Chromatographieschritte wurden bei 4°C an einer Pharmacia FPLC Anlage oder einem Pharmacia Hi-Load System durchgeführt. Der Verlauf der Chromatographie wurde durch Beobachtung der Absorption bei 280 nm und der Leitfähigkeit verfolgt. Die Zusammensetzung der gesammelten Fraktionen wurde durch denaturierende Gelelektrophorese⁸⁹ festgestellt.

Der erste Reinigungsschritt wurde an dem schwachen Kationenaustauschermaterial Sephadex CM-C50 durchgeführt (Pharmacia, 300 ml Säulenmaterial in einem XK50 Säulenkörper, Flußrate 2 ml/min). Die mit S10-Puffer äquilibrierte Säule wurde mit dem gesamten Rohextrakt beladen und mit S10 gespült, bis die Absorption des Durchflusses konstant war. TetR wurde dann mit einem Gradienten von 10 mM bis 200mM NaCl

eluiert (500ml Gradient, gemischt aus S10 und S200).

Für den zweiten Reinigungsschritt wurden die TetR-enthaltenden Fraktionen des Sephadex CM-C50 Laufs gegen S10 dialysiert und auf eine Pharmacia Resource Q-Säule aufgetragen (starker Anionenaustauscher). Dieser zweite Schritt diente gleichzeitig auch zum Aufkonzentrieren der Probe. Dabei wurde die Säule pro Lauf mit maximal 120 mg Protein beladen. Die Elution erfolgte wiederum mit aufsteigendem NaCl Gradienten von 10 mM bis 1 M (40 ml Gradient aus S10 und S1000). Nach Dialyse gegen S10 wurde der zweite Reinigungsschritt an einer Pharmacia Mono Q-Säule wiederholt. Dabei wurde die Säule pro Lauf mit maximal 30 mg Protein beladen. Die TetR haltigen Fraktionen wurden vereinigt und mit Mikrokonzentratoren (Amicon, Ausschlußgrenze 30 kDa) bis zu einer Endkonzentration von etwa 10 mg/ml aufkonzentriert.

Abschließend wurde eine Gelfiltration durchgeführt. Die Gelfiltrationssäule (200ml Pharmacia Sephacryl S100 oder 300 ml Pharmacia Sephacryl S200 im Säulenkörper XK26 bzw. eine vorgepackte Pharmacia Superdex 75-16/60 Säule) wurde mit S200 äquilibriert, mit maximal 4, 6 bzw. 0.5 ml Proteinlösung (für die jeweilige Säule) beladen und mit einer Flußrate von 1.5, 2.0 bzw. 0.75 ml/min eluiert. Die TetR-haltigen Fraktionen wurden vereinigt, auf Konzentrationen von 10 mg/ml aufkonzentriert, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Für die Kokristallisationsversuche mit der Operator-DNA wurde das Protein mit Mikrokonzentratoren gegen S0 umgepuffert, auf eine Konzentration von 20 bis 30 mg/ml aufkonzentriert und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

2.2.3 Herstellung von TetR/Tetrazyklin-Komplexen

Die Komplexierung von TetR mit verschiedenen Tetrazyklinen erfolgt durch halbstündiges Inkubieren der Mischung bei 30°C . Dafür werden 100 μl TetR^D-Lösung (0.4 mM TetR^D Monomer) in S200 ohne EDTA mit 100 μl Tetrazyklin-Lösung (2 mM) in S200 und 5 mM MgCl₂ gemischt, nach erfolgter Inkubation auf 18°C abgekühlt und sofort für Kristallisationsansätze verwendet.

2.2.4 Konzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration von TetR-Lösungen wurde UV-spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von $19000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ⁸⁰ bestimmt. Dieser Extinktionskoeffizient wurde auch zur Proteinbestimmung aller TetR-Varianten verwendet, da bei den Aminosäuresubstitutionen keine chromophoren Aminosäuren ausgetauscht wurden. Die Konzentration von Oligodesoxyribonukleotiden wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm ebenfalls UV-spektroskopisch bestimmt.

Für einzelsträngige Oligodesoxyribonukleotide wurde ein nach Cantor *et al.*, 1970²⁸ berechneter Extinktionskoeffizient benutzt. Für doppelsträngige DNA wurde ein Näherungswert von $\epsilon_{260nm} = 45 \text{ mg l}^{-1}\text{cm}^{-1}$ zugrunde gelegt. Die Konzentrationsbestimmung der Tetrazykline erfolgte durch Einwaage der Proben.

2.2.5 Reinigung von Oligodesoxyribonukleotiden

Die Oligodesoxyribonukleotide wurden entweder von Herrn Dr. Werner Schröder (Institut für Kristallographie) oder durch die Firma BIOMOL (Berlin) an einem Pharmacia Festphasen-Syntheseautomaten mit 5'-ständiger Dimethoxytritylschutzgruppe hergestellt. Die Reinigung der Oligodesoxyribonukleotide folgte der in der Dissertation von Herrn Dr. Karsten Theis beschriebenen Prozedur¹⁶² und wurde bei Raumtemperatur an einer Pharmacia FPLC Anlage durchgeführt. Der Verlauf der chromatographischen Trennschritte wurde durch Beobachten der Absorption bei 260 nm verfolgt. Der erste Reinigungsschritt besteht im Abtrennen derjenigen Oligodesoxyribonukleotide, die die Schutzgruppe nicht mehr tragen (zumeist Kettenabbruchprodukte). Dazu wird ausgenutzt, daß Oligodesoxyribonukleotide mit 5'-ständiger Schutzgruppe hydrophober sind als solche ohne Schutzgruppe und deshalb stärker an eine C18-Umkehrphasensäule (Pharmacia Resource RPC, Säulenvolumen 3 ml, Flußrate 2 ml/min) binden. Das zu reinigende Oligodesoxyribonukleotid wurde auf die mit Puffer RA (100 mM Triethylamin-Acetat in H₂O pH 7.5) äquilibrierte C18-Säule aufgetragen, die ungeschützten Oligodesoxyribonukleotide mit einem Gemisch aus Lösung RA und RB (100 mM Triethylamin-Acetat in MeOH pH 7.5) (45 % (v/v) Puffer RA) eluiert und die Säule wieder mit Puffer RA äquilibriert (2ml 100 % RA, Gradient 100 % bis 55 % in 8 ml, 4 ml 55 % , zurück auf 100 % in 4 ml und weitere 4 ml 100 % RA). Die Dimethoxytritylschutzgruppe der auf der Säule verbliebenen Oligodesoxyribonukleotiden wurde mit 6 ml 0.5 % (v/v) Trifluoressigsäure innerhalb von 30 min abgespalten und die Säule mit 6 ml RA neutral gespült. Anschließend wurde das Oligodesoxyribonukleotid mit einem Gradienten aus Lösung RA und RB eluiert (12 ml Gradient von 100 % bis 55 % RA, 8 ml 55 % , 12 ml Gradienten von 55 % bis 0 % , 6 ml 0 % , 6 ml Gradient von 0 % bis 100 % , 6 ml 100 % RA) und im Vakuum (Speedvac) eingengt. Die DNA wurde in 1 ml Lösung KA (10 mM NaOH) aufgenommen (Konzentration ca. 1 M).

Der nächste Reinigungsschritt bestand in einer Anionenaustauscher-Chromatographie unter DNA-denaturierenden Bedingungen (pH 12). Verwendet wurde eine Pharmacia Mono Q-Säule mit einem Volumen von 1 ml. Das Oligodesoxyribonukleotid wurde auf die mit Lösung KA gespülte Säule aufgetragen (Flußrate 1 ml/min), mit 5 ml Lösung KA gewaschen und mit einem kontinuierlichen, aus Lösung KA und KB (10 mM NaOH und 1

M NaCl) gemischten Gradienten eluiert (von 0 auf 0.4 M NaCl in 2 ml, Gradient von 0.4 M bis 0.8 M NaCl in 16 ml, auf 1 M NaCl in 2 ml, 4 ml 1 M NaCl zum Regenerieren, auf 0 M NaCl in 1 ml, 3 ml 0 M NaCl zum Äquilibrieren für den nächsten Lauf). Anschließend wurde die Probe gegen Wasser dialysiert oder durch mehrfaches Verdünnen mit H₂O und Aufkonzentrieren auf ca. 0.5 M in Mikrokonzentratorröhrchen (Amicon) entsalzt.

2.2.6 Herstellung von Doppelstrang-DNA

Eine Lösung aus äquimolaren Mengen zweier komplementärer DNA-Einzelstränge in 100 mM NaCl und 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) wurde auf 95°C erhitzt und über Nacht im Dewar auf Raumtemperatur abgekühlt. Mittels Anionenaustauschchromatographie (Pharmacia Mono Q-Säule) unter nicht-denaturierenden Bedingungen (pH 7.5) wurde überprüft, ob Doppelstrang-DNA vorlag und mit dem Elutionsprofil der Einzelstrang-DNA verglichen. Wenn nötig, wurde die Behandlung aus Erhitzen und Abkühlen noch einmal bei einer höheren NaCl Konzentration wiederholt. Die Doppelstrang-DNA wurde auf die mit Puffer KC (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5) gespülte Säule aufgetragen, mit 5 ml Lösung KC gewaschen und mit einem Gradienten aus Puffer KC und KD (1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5)(25 ml) eluiert (Gradient von 100 mM bis 500 mM in 4 ml, Gradient von 500 mM bis 1 M in 10 ml, 1 M in 4 ml, auf 100 mM in 0.5 ml, 3 ml 100 M NaCl zum Äquilibrieren für den nächsten Lauf).

2.2.7 Herstellung von TetR-Operator-Komplexen

Repressor-Operator-Komplexe wurden durch halbstündige Inkubation der beiden Komponenten miteinander bei 4°C erhalten. Die Proben wurden für jedes Kristallisationsexperiment frisch hergestellt und sofort verwendet. Nach Optimierung der Kristallisationsbedingungen wurden für die Komplexbildung äquimolare Mengen an TetR und Operator-DNA vereinigt, wobei die Endkonzentration des Komplexes 200 μM betrug.

2.2.8 Kristallisation

Für die Kristallisationsexperimente wurde die Dampfdiffusionsmethode verwendet³⁸. Die Experimente wurden entweder in Zellkulturschalen mit 24 Vertiefungen (Limbro, ICN Flow, Meckenheim) oder Einwegeinsätzen mit 12 Vertiefungen (Nelipack Thermophorming) durchgeführt. 500 bis 1000 μl der sogenannten Fällungsmittellösung wurden in der Vertiefung vorgelegt, 2 bis 10 μl der zu kristallisierenden Probe und 2 bis 5 μl Fällungsmittellösung auf ein silikonisiertes Deckglas pipettiert, das Deckglas umgedreht und auf den gefetteten Rand der Vertiefung gelegt, so daß ein geschlossenes System entstand.

Tabelle 2: Kristallisationsbedingungen

Bei der Kristallisation der freien und induzierten TetR wurden jeweils 10 μl Proteinlösung und 5 μl Fällungsmittellösung gemischt. Bei der Kristallisation der TetR^D/DNA-Komplexe wurden jeweils 5 und 3.5 μl verwendet. Die Sequenzen der Oligodesoxyribonukleotide sind in Tabelle 4 (S. 29) aufgeführt.

Probe	Ligand/DNA	Fällungsmittel/Salzzusatz/Puffer	Kristallform
freier TetR	-	500-800 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8	Ellipsoide
TetR/[Mg-Tc]	5 facher Überschuß von [Mg-Tc]	500-800 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8	Ellipsoide
TetR/DNA	äquimolar 18mer	12.5 % PEG MME 5K, 100 mM NaCl, 100 mM CaCl ₂ , 100 mM Imidazol pH 8	dreieckige Plättchen
TetR/DNA	äquimolar 18mer	12.5 % PEG 4K, 100 mM NaCl, 100 mM CaCl ₂ , 100 mM Imidazol pH 8	hexagonale Stäbchen
TetR/DNA	äquimolar 18mer	12.5 % PEG MME 5K, 150 mM NaCl, 150 mM Ca(CH ₃ COO) ₂ , 150 mM Imidazol pH 8	rechteckige Plättchen
TetR/DNA	äquimolar 15mer TA/CG-Enden	10.5 % PEG 4K, 150 mM NaCl, 100 mM CaCl ₂ , 100 mM Imidazol pH 8	rechteckige Plättchen
TetR/DNA	äquimolar 15mer CG/CG-Enden	7.5 % PEG 4K, 100 mM NaCl, 100 mM Ca(CH ₃ COO) ₂ , 100 mM Imidazol pH 8	rechteckige Plättchen
TetR/DNA	äquimolar 13mer	9.25 % PEG 4K, 100 mM NaCl, 100 mM Ca(CH ₃ COO) ₂ , 100 mM Imidazol pH 8	quadratische Pyramiden

Die Zusammensetzungen der Fällungsmittellösungen der einzelnen Kristallisationsansätze sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die Bedingungen für die Kristallisation der freien und induzierten TetR^D wurden von Frau Dr. Caroline Kisker⁸⁰ übernommen. Die Bedingungen für die Kristallisation der TetR^D/DNA-Komplexe wurden ausgehend von der Versuchsreihe von Scott *et al.*, 1995¹⁴⁷ ermittelt.

Die Kristallisationsschalen wurden bei 4 bzw. 18°C aufbewahrt und nach dem Anset-

zen täglich, später in größeren Abständen, unter einem Mikroskop kontrolliert. Für die Kristallisationsexperimente mit TetR, TetR^D-Tc Komplexen und TetR^D-DNA Komplexen wurden die entsprechenden Konzentrationen von 200, 100 und 200 μM TetR Dimer verwendet. In den Ansätzen lag $[\text{MgTc}]$ im 5-fachen Überschuß und die Operator DNA im äquimolaren Verhältnis zu TetR^D vor.

2.3 Kristallographische Methoden

2.3.1 Messung von Röntgen-Diffraktionsdaten

Röntgen-Diffraktionsdaten wurden nach der Rotationsmethode aufgenommen⁶. Die Kristalle wurden für die Messung entweder in Glaskapillaren montiert oder in Schlaufen schockgefroren. Im ersten Fall wurden die in Fällungsmittellösung gewaschenen Kristalle mittels einer Pipette in eine Glaskapillare mit einem maximalen Durchmesser von 1,5 mm überführt und trockengelegt. Das Austrocknen der Kristalle wurde durch Flüssigkeitsreste an der inneren Kapillarwand verhindert. Die Kapillare wird mit Hartwachs luftdicht verschlossen und senkrecht zum Röntgenstrahl sowie parallel zum kühlenden Luftstrom mit Hilfe eines Goniometerkopfes orientiert. Die Kapillare wurde während der Messung durch einen Trockenluftstrom auf 4 bzw. 18°C temperiert.

Im zweiten Fall wurden die Kristalle durch rasches Abkühlen schockgefroren. Die Kristalle wurden nach dem Waschen in Fällungsmittellösung schrittweise in 20 % (v/v) Glycerin enthaltende Fällungsmittellösung überführt. Das Glycerin soll Eisbildung der Kristalle beim Einfrieren verhindern helfen. Die Kristalle werden dann mit Hilfe einer kleinen Nylon-Schleife gefischt, die sich an einem Metallstift befindet und über eine Halterung und einen Magneten an dem Goniometerkopf befestigt wird. Die Schleife, die maximal dreimal so groß war wie der Kristall, kann mit dem Kristall entweder sofort in dem 100 K kalten Kühlstrom an der Meßapparatur oder in flüssigem Propan gefroren werden. Das Propan wird im flüssigem Stickstoff (88 K) fest und läßt sich später im Kühlstrom (100 K) wieder auftauen. Durch das Einfrieren in Propan ist es möglich, instabile Kristalle über längere Zeiträume zu lagern.

Zur Messung von Diffraktionsdaten standen Flächenzähler zur Verfügung. Es wurden dabei Imageplate-Systeme (MAR Research, Hamburg) mit einem Radius von 90 und 150 mm verwendet. Als Röntgenquellen standen in Berlin die beiden institutseigenen Röntgeneratoren mit rotierender Anode (ENRAF-Nonius FR 571, Delft) sowie folgende Synchrotronquellen zur Verfügung:

- am Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY) in Hamburg; Meßstationen X11, X31 und BW7A der 'EMBL-Outstation';

- am 'Synchrotron Radiation Source' (SRS) in Daresbury; Meßstationen 9.5 und 9.6 und
- am 'Laboratoire pour l'Utilisation du Rayonnement Électromagnétique' (LURE), Orsay, Paris; Meßstation DW-32.

Die Reflexe auf den einzelnen Aufnahmen wurden mit dem Programm `denzo`¹²¹ indiziert und integriert. Anschließend wurden die Aufnahmen mit dem Programm `scalepack`¹²¹ gegeneinander skaliert und symmetrieäquivalente Reflexe gemittelt. Aus den Intensitäten und ihren Standardabweichungen wurden dann mit dem Programm `truncate` (CCP4-Programmpaket²⁹) Strukturfaktoramplituden und ihre Standardabweichungen berechnet.

2.3.2 Strukturlösung

Aufgrund der fehlenden Phaseninformation beim Diffraktionsexperiment ist neben der Kristallisation die Strukturlösung ein zentrales Problem in der Röntgenstrukturanalyse. Das Phasenproblem und damit die Struktur eines kristallisierten Makromoleküls kann auf drei verschiedenen Wegen gelöst werden.

Multipler isomorpher Ersatz²⁷. Die Diffraktionsdaten des nativen Datensatzes werden mit denen kombiniert, die von mit Schweratomen getränkten Kristallen resultieren. Anhand der Positionen der einzelnen Schweratome läßt sich die Phaseninformation der Kristallstruktur ermitteln.

Multiple anomale Dispersion¹⁶. In die Struktur des Makromoleküls wird entweder durch Schwefel/Selen-Austausch von Methioninen oder durch Komplexbildung mit einer Schweratomverbindung ein anomaler Streuer eingebaut. Der Diffraktionsbeitrag dieser zusätzlichen Atome variiert in Abhängigkeit von der Wellenlänge und der strukturellen Umgebung des jeweiligen Atoms. Die Kombination der Diffraktionsdaten bei verschiedenen, jeweils spezifischen Wellenlängen führt zur Phaseninformation der Kristallstruktur.

Molekularer Ersatz¹³⁵. Diese Methode kann verwendet werden, wenn für das zu untersuchende Makromolekül eine ihr ähnliche Struktur bereits bekannt ist. Bei einer Identität der Aminosäuren zweier Proteine von 50 % , stimmen die Strukturen ungefähr zu 80 % überein³³. Bei geringerer Aminosäureidentität sinkt die Strukturähnlichkeit und erschwert die Strukturlösung mittels molekularem Ersatz.

Alle verwendeten Programme sind Teile des CCP4 Programmpakets²⁹, mit Ausnahme von `FRODO`⁷¹, `O`⁷², `X-PLOR`^{22, 24} und einigen Hilfsprogrammen.

Isomorpher Ersatz

Zur Strukturlösung des nativen TetR und der Tetrazyklin-Komplexe, die in der tetragonalen Raumgruppe $I4_122$ kristallisieren, wurde als Ausgangsstruktur der Proteindatenbankeintrag ¹³ 2TCT ⁷⁹ (TetR^D im Komplex mit [Mg-7ClTc]) verwendet. Das Koordinaten-File wurde nach Entfernung der Koordinaten des Induktors [Mg-Tc]⁺ und der Wassermoleküle für die Strukturverfeinerung verwendet.

Molekularer Ersatz

Die Strukturlösung der verschiedenen DNA-Komplexe erfolgte mit dem Programm AmoRe ¹¹³. Dabei wurden die vom Programmautor angegebenen Protokolle für Rotations-, Translationssuche und Starre-Körper-Verfeinerung angewandt. Für den molekularen Ersatz wurden die Beugungsdaten in einem Auflösungsbereich von 4 bis 20 Å verwendet. Alle anderen Parameter wurden aus der Beispiel-Datei übernommen. Im Falle der Kristallstrukturen, bei denen aus den Diffraktiondaten nur das Kristallsystem (z. B. primitiv orthorhombisch), nicht aber die Raumgruppe (z. B. Raumgruppe 18, $P2_12_12$) bestimmt werden konnten, wurde die Raumgruppe anschließend anhand der Korrelationskoeffizienten bestimmt.

Die erhaltenen Rotations- und Translationslösungen wurden unter Verwendung des Programms `pdbset` auf das Suchmodell angewendet, um anschließend mit dem Programm `''0''` die Kristallpackung darzustellen. Die Struktur des Repressor-Operator-Komplexes in der hexagonalen Raumgruppe $P6_122$ wurde mit zwei Startmodellen gelöst. Zum einen wurde der Proteinanteil des induzierten Repressors (2TCT ⁷⁹) und zum anderen ein Protein/DNA-Komplex aus B-DNA und dem induzierten Repressor verwendet, wobei das zweite Modell manuell erzeugt wurde. Die Position und Orientierung des Repressors war in beiden Lösungen identisch. Die Kristallstrukturen des TetR/DNA-Komplexes in den Raumgruppen $P2_1$ und $C222_1$ wurden durch molekularen Ersatz unter Verwendung der hexagonalen Struktur gelöst. Die Kristallstruktur von TetR^D mit der Raumgruppe $P4_32_12$ wurde durch molekularen Ersatz mit dem induzierten Repressordimer als Suchmodell ermittelt.

2.3.3 Verfeinerung und Modellbau

Ziel der Verfeinerung ist es, ein atomares Strukturmodell mit einer möglichst guten Geometrie zu erhalten, welches die experimentellen Daten optimal erklärt. Die Differenz zwischen den gemessenen (F_o) und den aus dem Modell berechneten Strukturfaktoramplituden (F_c) soll also minimiert werden. Zur Lösung dieses Problems gibt es verschiedene

rechnerische Ansätze.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Modelle nach der Kleinste-Quadrate-Methode und nach der der Moleküldynamik entlehnten Methode des simulated annealing²⁴ verfeinert. Dazu wurde das Programm X-PLOR verwendet. In diesem Programm werden die zu verfeinernden Parameter durch eine Energiefunktion beschrieben. Neben der potentiellen Energie des Systems, die inter- und intramolekulare Wechselwirkungen berücksichtigt, geht in diese Energiefunktion ein Pseudoenergieterm ein, der die Abweichung zwischen gemessenen und berechneten Strukturfaktoramplituden beschreibt. Zur Berechnung der potentiellen Energie wurde ein Kraftfeld benutzt, das auf geometrische Parameter zurückgeht, die speziell zur Verwendung in der Proteinkristallographie aus hochaufgelösten Kristallstrukturen von Aminosäuren und Polypeptiden ermittelt wurden.

2.3.4 Koordinatenanalyse und Abbildungen

Überlagerungen von Atomkoordinaten wurden mit dem Programm `lsqkab` durchgeführt, die Analyse der Koordinaten mit den Programmen `Procheck`⁹⁰, `Promotif`⁶⁹, `Act`²⁹, `ONO`⁷², `whatif`¹⁷⁰, `X-PLOR`^{24, 22}, `SCHNaP`^{55, 102} und `Curves`^{91, 92, 133}. Abbildungen wurden mit Hilfe der Programme `SETOR`⁴⁶, `GRASP`¹¹⁵, `MOLMOL`⁸⁵, `MOLSCRIPT`⁸⁸, `Showcase`¹⁴⁹, `ALSCRIPT`¹⁰, `CLUSTALW`¹⁶³, `tgif`³⁰, `Raster3D`^{9, 109, 108} und `RASMOL`¹³⁹ erstellt.