

Strukturanalyse

4.1 Hauptkettenverlauf und Temperaturfaktoren des freien TetR^D

TetR^D ist ein Homodimer; ein Monomer besteht aus 10 α -Helizes, die Lokalisation dieser Helizes entlang der Polypeptidkette ist in Tabelle 8 definiert und für den induzierten TetR^D 67 in Abb. 5 auf Seite 6 dargestellt sind. Die Helizes sind durch kurze Schleifenbereiche verbunden, die bis auf die Verbindung zwischen Helix 8 und 9 modelliert werden konnten. Die Länge der Helizes variiert zwischen minimal 7 (Helizes 3 und 6) und maximal 25 Aminosäuren (Helix 8). Im Mittel beträgt die Länge 13.3 Aminosäuren. Zum Vergleich: bei anderen löslichen Proteinen erstrecken sich die Helizes im Durchschnitt über 17 Aminosäuren ¹⁴⁵. Dabei sind Längen aus 7, 11 und 15 Aminosäuren bevorzugt ¹⁵, da

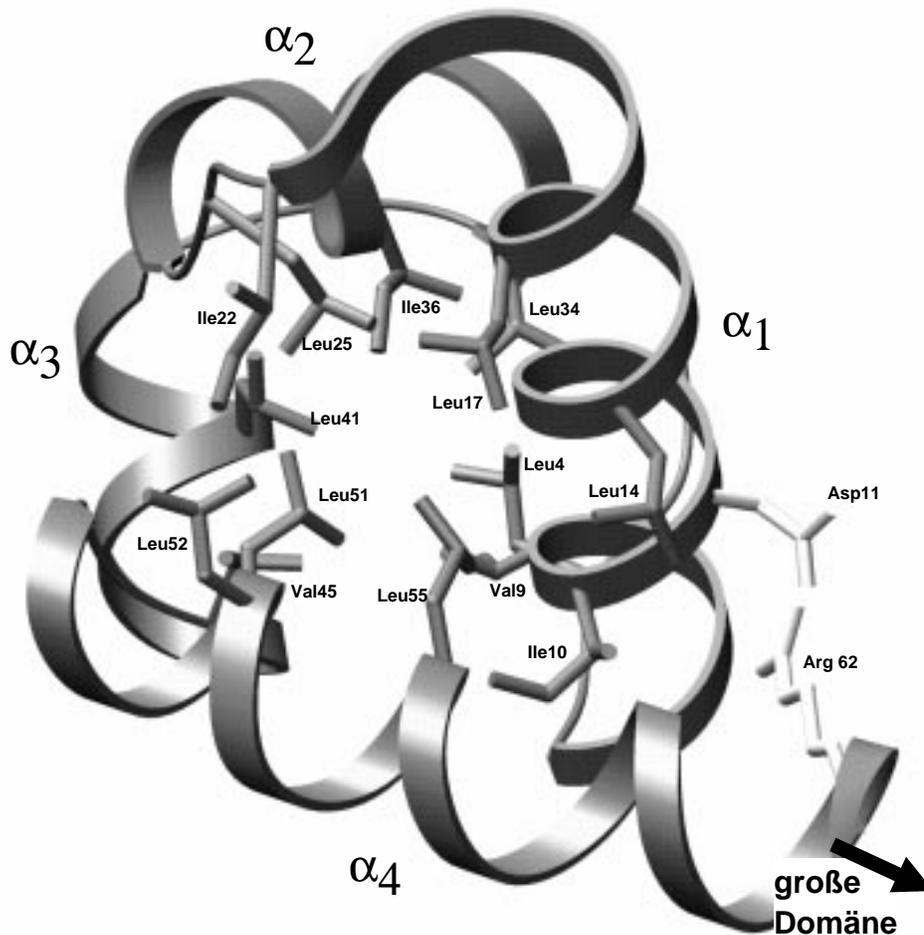


Abbildung 14: Hydrophober Kern des „3 1/2 Helixbündels“

Die hydrophoben Seitenketten der vier N-terminalen Helizes zeigen in das Innere der Domäne und bilden hydrophobe Kontakte. Die Seitenketten Asp11 und Arg62 bilden eine Salzbrücke. Die Helix 4 ist so mit den drei N-terminalen Helizes verknüpft, daß die Position der DNA-bindenden Domäne von der Orientierung der Helix 4 abhängt.

Tabelle 8: Sekundärstruktur des freien TetR^D

Aminosäurenummer	Sequenz	Sekundärstruktur
2-5	SRLN	Schleife
6-20	RESVIDAALELLNET	Helix 1
21-24	GIDG	β -turn typ I
22-25	IDGL	β -turn typ I
26	T	Schleife
27-34	TRKLAQKL	Helix 2
35-37	GIE	Schleife
38-44	QPTTYWH	Helix 3
45-48	VKN	Schleife
49-63	KRALLDALAVEILARH	Helix 4
63-65	HHD	γ -turn invers
64-67	HDYS	β -turn typ IV
68-69	LP	Schleife
70-73	AAGE	β -turn typ IV
74	S	Schleife
75-91	WQSFLRNNAMSFRRALL	Helix 5
92	R	Schleife
93-96	YRDG	β -turn typ II
96-102	GAKVHLG	Helix 6
103-106	TRPD	Schleife
107-122	EKQYDTVETQLRFMTE	Helix 7
123-126	NGFS	Schleife
127-150	LRDGLYAISAVSHFTLGAVLEQQEH	Helix 8
151	H	Schleife
152-165	TAALTD RPAAPDEN	fehlgeordnet
166-167	LP	Schleife
168-178	PLLREALQIMD	Helix 9
179	S	Schleife
180-182	DDG	β -turn typ IV
183-203	EQAFHLHGLESLIRGFEVQLTA	Helix 10
203-206	ALLQ	β -turn typ II'
207-208	IV	Schleife

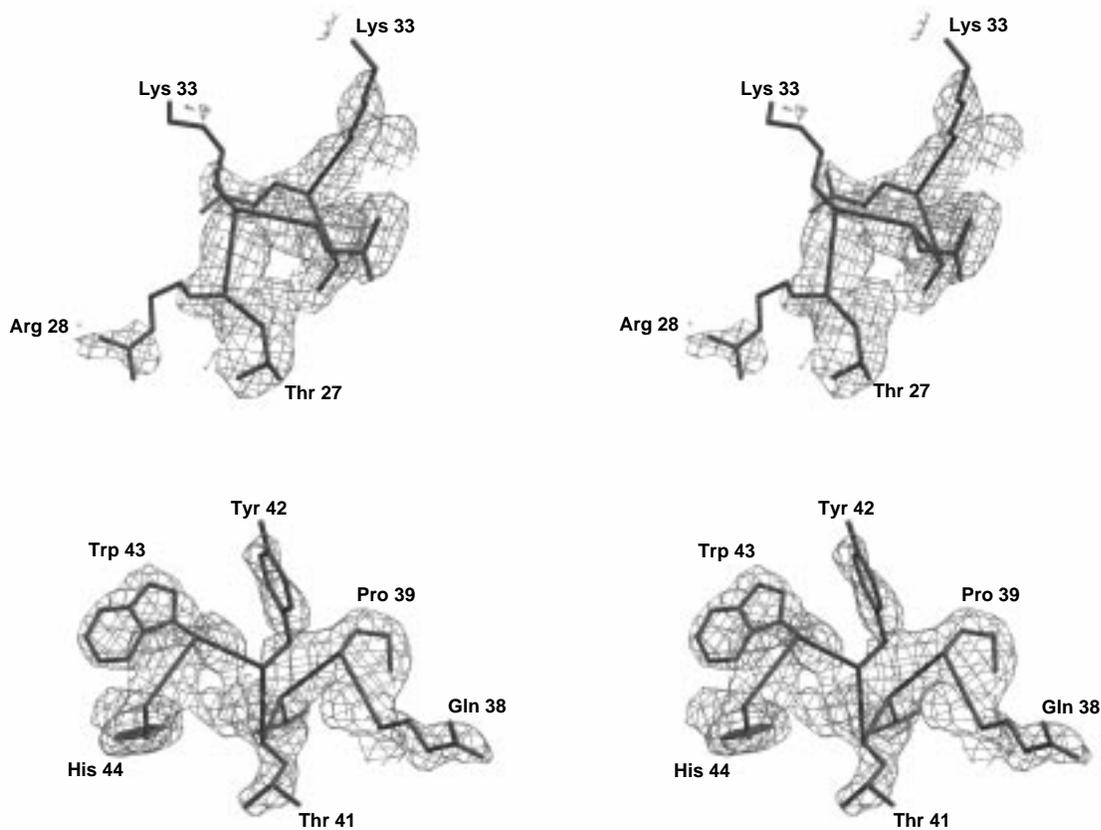


Abbildung 15: Flexibilität der Aminosäuren des HTH-Motives des freien TetR^D. In der oberen Stereoabbildung sind die Aminosäuren Thr27 bis Lys33 der Positionierungshelix und in der unteren Stereoabbildung die Aminosäuren Gln38 bis His44 der Erkennungshelix dargestellt. Die Elektronendichte wurde mit den Koeffizienten $2F_o - F_c$ berechnet und bei 1.2 Standardabweichungen (bei 2.2 Å Auflösung) über dem mittleren Dichteniveau konturiert. Die Seitenketten von Arg28, Lys29 und Lys33 sind flexibel und ihre Seitenketten liegen außerhalb der Elektronendichte, die in den Abb. als Netz dargestellt ist.

sie 2, 3 bzw. 4 Helixwindungen entsprechen.

Die Helizes 1, 2 und 3 bilden als Drei-Helix-Bündel eine eigenständige Domäne. Eine solche Domäne wurde erstmalig in der Kristallstruktur des *cro* Repressor festgestellt³, als eigenständiges Protein aus dem Lac-Repressor isoliert und für diesen sowie eine ganze Reihe anderer DNA-bindender Proteine strukturell beschrieben^{34, 184}. Das Drei-Helix-Bündel enthält das DNA-Bindungsmotiv, das Helix-Turn-Helix-Motiv, das bei TetR aus den Helizes 2 und 3 besteht. Helix 2 ist die Positionierungshelix und Helix 3 die Erkennungshelix. Das Drei-Helix-Bündel ist über eine sogenannte Linkerhelix (Helix 4) mit dem übrigen Protein verbunden (siehe Abb. 14).

Das Helix-Turn-Helix-Motiv ist so orientiert, daß der Abstand zwischen den beiden Erkennungshelizes 40.6 Å beträgt; also 6 Å mehr als die Bindung an zwei benachbarte große

Furchen der B-DNA Doppelhelix erfordern würde. Die Seitenketten des HTH-Motivs, die an der DNA-Bindung teilnehmen, sind Solvens-exponiert. Die Seitenketten von Arg28, Lys29 und Lys33 sind fehlgeordnet bzw. bilden keine Kontakte zu anderen Aminosäuren, während die Seitenketten von Gln 38, Thr40, Tyr42, Trp43 und His44 durch Wasserstoffbrücken in ihrer Position stabilisiert werden (siehe Abb. 15). Inwieweit die Positionen diese Aminosäuren mit denen im DNA-Komplex übereinstimmen, wird im Kapitel 4.11 beschrieben.

Beim Tet-Repressor ist die N-terminale Hälfte der Linkerhelix (Helix 4) ein Bestandteil der DNA-Bindungsdomäne. Mit den konservierten Aminosäuren Leu51, Leu52 und Leu55 der Helix 4 wird der hydrophobe Kern des Drei-Helix-Bündels gebildet (siehe Abb. 16). Eine Salzbrücke zwischen den Aminosäuren Asp11 und Arg62 stabilisiert das nunmehr

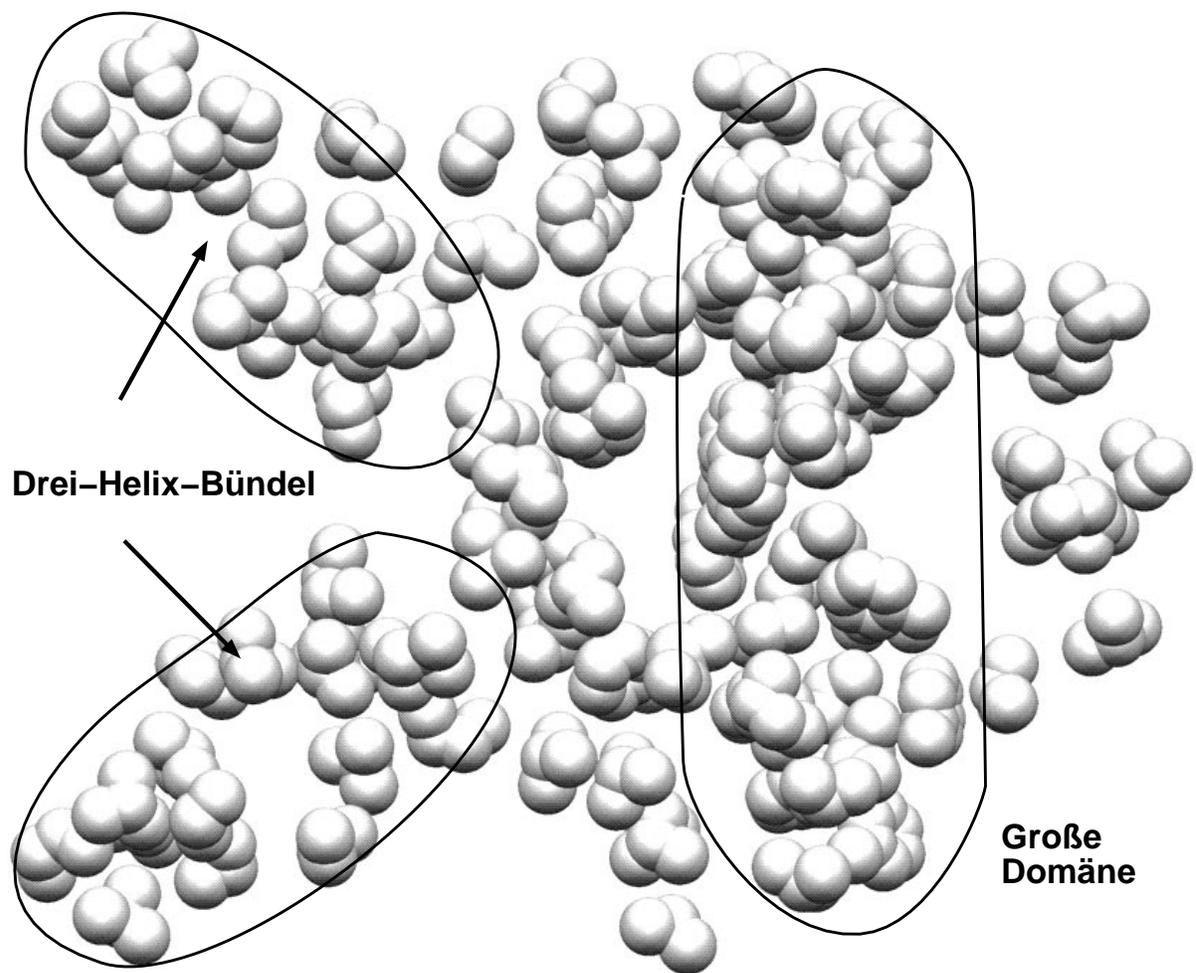


Abbildung 16: Hydrophobe Zentren des freien TetR^D

Die hydrophoben Aminosäuren des TetR^D, deren Seitenketten als Van-der-Waals-Kugeln dargestellt sind, bilden drei Zentren, die im Bild mit Ellipsen eingekreist sind. Zwei befinden sich jeweils in den N-terminalen Drei-Helix-Bündeln und eines im hinteren Bereich der großen Domäne entlang der Dimerisierungsfläche

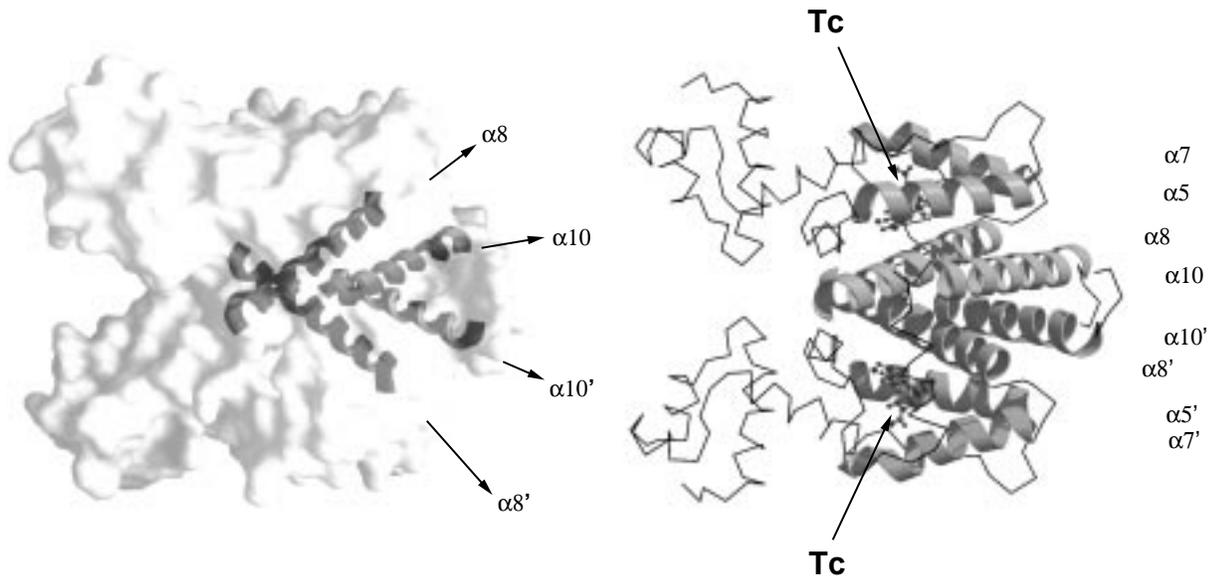


Abbildung 17: Hydrophober Kern der großen Domäne

Den Kern der großen Domäne bildet ein Vier-Helix-Bündel aus den Helizes $\alpha 8$, $\alpha 10$, $\alpha 8'$ und $\alpha 10'$ (links). Die jeweils antiparallelen Helizes eines Monomers bilden den Hauptbestandteil der annähernd planaren Dimerisierungsfläche. Der Verlauf der Helizes vom N- zum C- Terminus ist durch den nebenstehenden Pfeil symbolisiert. Zusammen mit diesen Helizes bilden $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 5'$ und $\alpha 7'$ ein Acht-Helix-Bündel, an dessen linker Seite sich die beiden Bindungstaschen für den Induktor [MTc] befinden (rechts).

” $3\frac{1}{2}$ -Helixbündel” (Abb. 14). Die Integration der Helix 4 in die DNA-Bindungsdomäne macht dieses Konstrukt zu einer Art Werkzeug aus Kopf und Stiel, dessen funktionelle Bedeutung im Kapitel 5.7 diskutiert wird. Um Verwechslungen zu vermeiden, wird die DNA-Bindungsdomäne im weiteren als Drei-Helix-Bündel bezeichnet. Die Helix 1 ist mit 15 Aminosäuren die längste in dieser Domäne und bildet als einzige der drei Helizes Wasserstoffbrücken zum übrigen Protein ⁷⁸.

Die Helizes 8, 10, 8' und 10' bilden als Vierhelix-Bündel den Kern der großen Domäne des Proteins (siehe Abb. 17, linke Seite). Der hydrophobe Kern ist ellipsoidal und bestimmt die Form der großen Domäne mit den beiden [MTc]-Bindungstaschen (siehe Abb. 16); er erstreckt sich hauptsächlich, von den DNA-Bindungsdomänen aus gesehen, ”hinter” den [MTc]-Bindungstaschen. Für die Bildung des hydrophoben Kerns sind die Helizes 5, 7, 8, 10 und die Schleife C-terminal zu Helix 4 verantwortlich. Diese Verteilung der Hydrophobizität im Proteininneren erklärt die Notwendigkeit zur Dimerisierung. In Lösung werden ausschließlich Dimere beobachtet ⁶⁴, und nur durch Denaturierung des Proteins werden Monomere gebildet.

Verschiedene Deletionsmutanten, bei denen einzelne Aminosäuren oder auch Peptidbereiche entfernt wurden, sind instabiler als die Wildtyp-TetR ¹². Deletionen im Bereich

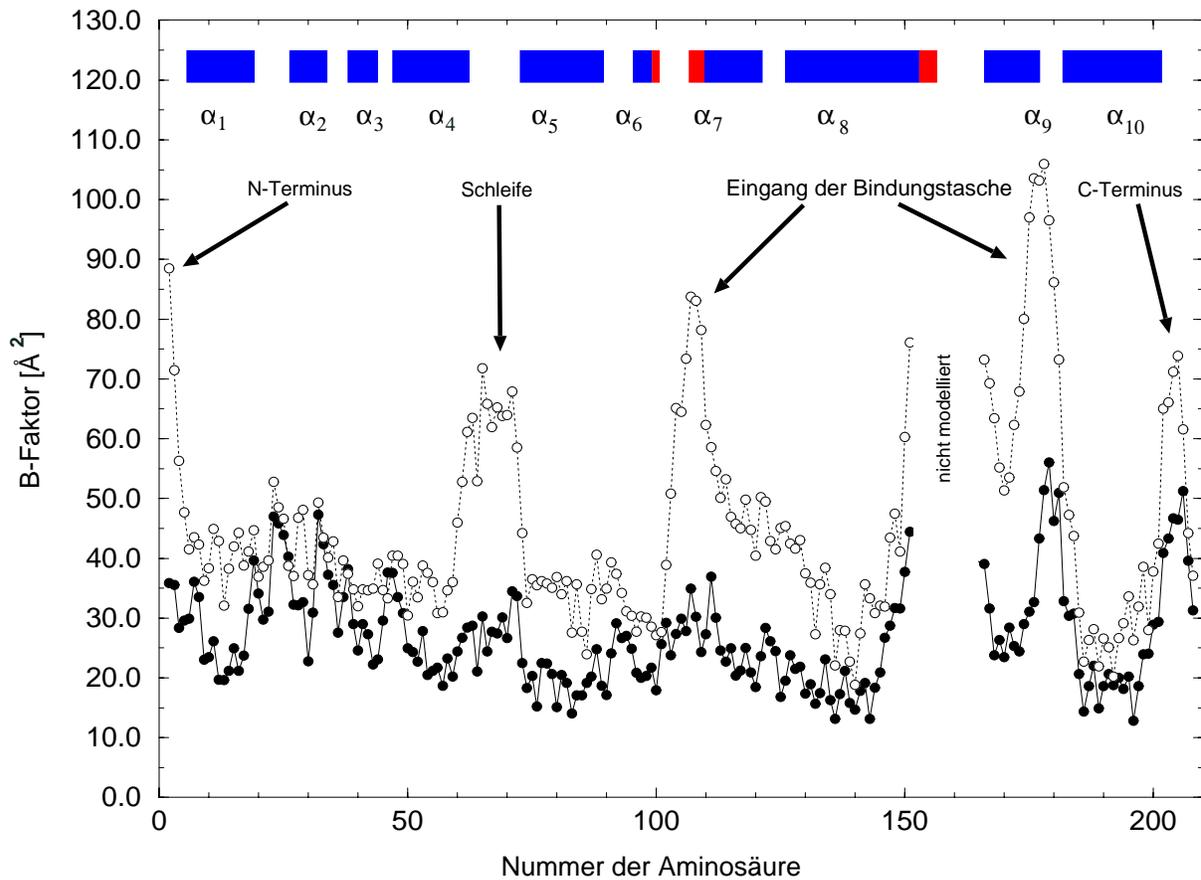


Abbildung 18: Temperatur-Faktor des freien und des induzierten TetR
 Für diese Darstellung wurden die Temperatur-Faktoren der C_{α} -Koordinaten der Form 2 (○) und von 2TCT (●) verwendet. Hohe Werte der Temperatur-Faktoren sind am N- und am C-Terminus sowie in der Nähe der nicht modellierten, flexiblen Schleife zu beobachten.

vom N-Terminus bis Trp75 verringern die Stabilität nicht und führen zu Repressordimeren ohne DNA-Bindungsaktivität. Deletionen in der variablen Region zwischen den Helizes 8 und 9 führen zu einem induktionsdefizienten Phänotyp. Es konnte gezeigt werden, daß der Bereich von Trp75 bis zum C-Terminus für die Dimerisierung notwendig ist ¹².

In Abb. 18 sind die Verläufe der Temperaturfaktoren der C_{α} des freien (Form 2) und des induzierten TetR^D (2TCT ⁷⁹) dargestellt. Die relative hohen Werte an den N- und C-Termini der Polypeptidketten sowie im Bereich der flexiblen Schleife deuten darauf hin, daß wie in anderen Proteinen diese Bereiche flexibler als die übrigen Bereiche sind. Die niedrigen Temperaturfaktoren entlang der Helizes 5, 8 und 10 sprechen für ihre Lage im Proteininneren. Auffallend sind die relativ hohen Werte für die Bereiche der Helizes 7 und 9, die teilweise Solvens-exponiert sind. Die funktionelle Bedeutung dieser Flexibilität wird in den Kapiteln 5.3 und 5.6 diskutiert.

Im Verlauf der weiteren Analyse werden die Strukturen der beiden TetR^D-Komplexe (mit DNA bzw. mit Induktor) mit der des freien TetR verglichen. Diese Strategie wurde

gewählt, da der frei TetR in verschiedenen Bereichen des Proteins entweder mit der Konformationen des DNA-gebundenen bzw. des induzierten TetR übereinstimmt. Außerdem sind die beobachteten Bewegungen bei der Induktion im Vergleich mit anderen Proteinen im TetR zu komplex sind; sie werden erst später im Zusammenhang betrachtet.

4.2 Kristallpackungen

4.2.1 TetR^D ohne DNA

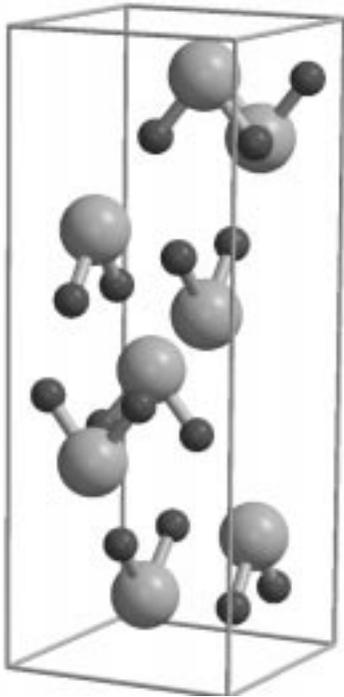
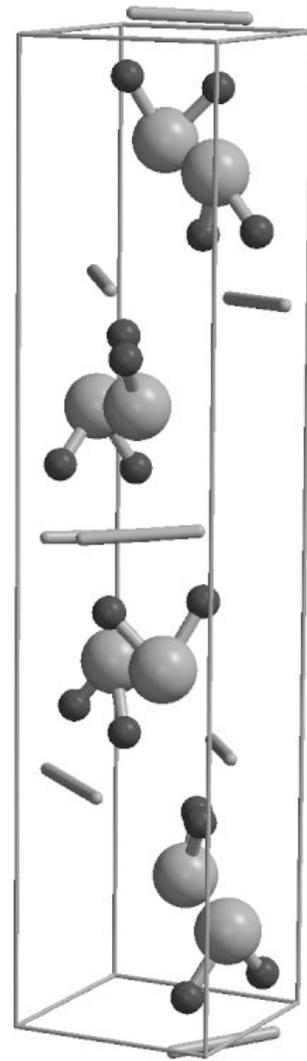
TetR^D kristallisiert im freien und im induzierten, [MTc]-gebundenen Zustand in den Raumgruppen I4₁22 (entspricht I4₃22) und P4₃2₁2 mit einem Monomer bzw. einem Dimer in der asymmetrischen Einheit. Die Kristallpackung ist in beiden Fällen sehr ähnlich. Da sich aber in zwei Fällen (siehe Seite 33) die beiden Monomere des Homodimers unterscheiden, ist die Symmetrie von I4₁22 auf P4₃2₁2 erniedrigt. In Abb. 19 ist die Kristallpackung für die Raumgruppe P4₃2₁2 dargestellt; die der Raumgruppe I4₁22 ist nicht gezeigt.

Die Differenzen in den Gitterkonstanten der Elementarzellen verschiedener Komplexe sind nicht größer als 1.9 %. Die Dimerachse von TetR entspricht in den Kristallstrukturen mit der Raumgruppe I4₁22 einer kristallographischen zweizähligen Achse, die parallel zur tetragonalen Achse orientiert ist. In dieser Richtung stehen sich jeweils die DNA-Bindungsdomänen zweier Repressoren gegenüber. Außerdem sind entlang der kristallographischen Achsen **a** und **b** die Repressordimere mit ihren größten ellipsoidalen Seitenflächen parallel zueinander angeordnet, wobei das ihre DNA-Bindungsdomänen in entgegengesetzte Richtungen zeigen. Ein Repressordimer steht dabei mit zwei anderen Repressoren in Kontakte. Innerhalb dieser Kontaktfläche werden zwischen zwei Repressoren zahlreiche Wasserstoffbrücken ausgebildet ⁷⁹.

4.2.2 TetR^D mit DNA

Bei der DNA-Bindung wird die Gesamtstruktur des Repressors nur unwesentlich verändert. Der Gyrationradius des Repressors der Klasse B im DNA-gebundenen Zustand beträgt 30 Å ⁹³, der des freien TetR^B 31.1 Å ⁹³. Es ist zu erwarten, daß bei ähnlicher Gesamtstruktur die Moleküloberfläche des TetR^D im DNA-Komplex äquivalente Kristallkontakte wie in den DNA-freien TetR^D-Strukturen zuläßt. Die Packungsanalyse wurde für folgende Kristallformendurchgeführt; in Klammern ist die Zahl der asymmetrischen Einheiten und ihr Inhalt angegeben: 4 (12 Dimere/Duplexe), 5 (2 Dimere/Duplexe), 6 (8 Monomere/Einzelstränge), 7 (4 Monomere/Einzelstränge) und 8 (8 Dimere/Duplexe).

In Kristallen von Protein-DNA-Komplexen bilden die Oligonukleotid-Duplexe häufig durch Aneinanderreihen "unendliche" Helizes. Die Packung liegt in den Formen 4, 5, 6 und

P4₃2₁2 (Form 13, 20)**P4₁2₁2 (Form 8)**Abbildung 19: Kristallpackungen der TetR^D-Komplexe (Teil 1)

Kristallpackungen aller DNA-freien TetR (a) und des DNA-Komplexes Form 8 (b, TetR^D/13mer, Raumgruppe P4₁2₁2). Die Struktur des TetR^D wurde schematisiert. Die große Domäne ist durch große, die beiden Drei-Helix-Bündel durch kleine Kugeln repräsentiert. In den DNA-Komplexen ist die DNA durch einen Stab dargestellt. Sie bilden keine "unendliche Helix". Die Packungen der Kristalle der freien und induzierten TetR sind gleich und werden hier durch die Kristallpackung in der Raumgruppe P4₃2₁2 dargestellt.

7 vor. Der Verlauf der DNA-Struktur entspricht jedoch nicht wirklich einer "unendlichen" DNA, da die großen und kleinen Furchen zwischen jeweils zwei DNA-Duplexen versetzt sind. In Form 8 liegen die DNA-Fragmente benachbarter Komplexe getrennt voneinander vor. Im Kristall sind sie so angeordnet, daß sie senkrecht zur tetragonalen Achse in einer Ebene liegen (Abb. 19 unten). Es gibt vier dieser Ebenen pro Elementarzelle bei $z=0$, $z=1/4$, $z=1/2$ und $z=3/4$, in denen sich jeweils 2 Operatoren befinden. Zwischen diesen Schichten sind jeweils 2 Repressoren angeordnet.

In den Strukturen mit "unendlicher" DNA sind die Operatorfragmente in linearer (5,

6 und 7) oder in helikaler (4) Weise aneinander gereiht (siehe Kapitel 4.12.3). In der helikalen Anordnung besteht entsprechend der hexagonalen Raumgruppe eine Helixwindung aus 6 DNA-Operatoren. Aufgrund der dichten Packung der Moleküle ist der Platz für die DNA-Fragmente in den Formen 4 und 5 zu gering, um eine B-DNA zu bilden. In der Form 5 existiert nur ein reguläres 11mer, das aus der zentralen palindromischen Sequenz gebildet wird; die übrigen 6 bp sowie die beiden 3'-terminalen Thyminen sind fehlgeordnet. In der Form 4 reihen sich die 17mer-DNA-Duplexe aneinander, wobei aber die 3'-terminalen Thyminen Wasserstoffbrücken zum Nachbar-Duplex ausbilden. Die 3'-terminalen Thyminen wirken wahrscheinlich innerhalb der Kristallpackung stabilisierend, da die Kristallisationsexperimente mit einem 17mer ohne Überhang, also dem 18mer ohne die beiden 3'-terminalen Thyminen, nicht erfolgreich waren.

Die Kristallstrukturen werden hauptsächlich durch Protein-Protein-Kontakte stabilisiert, da ca. 80 % der TetR^D/DNA-Atome zum Protein gehören. Diese Protein-Protein-Kontakte lassen sich wie folgt beschreiben:

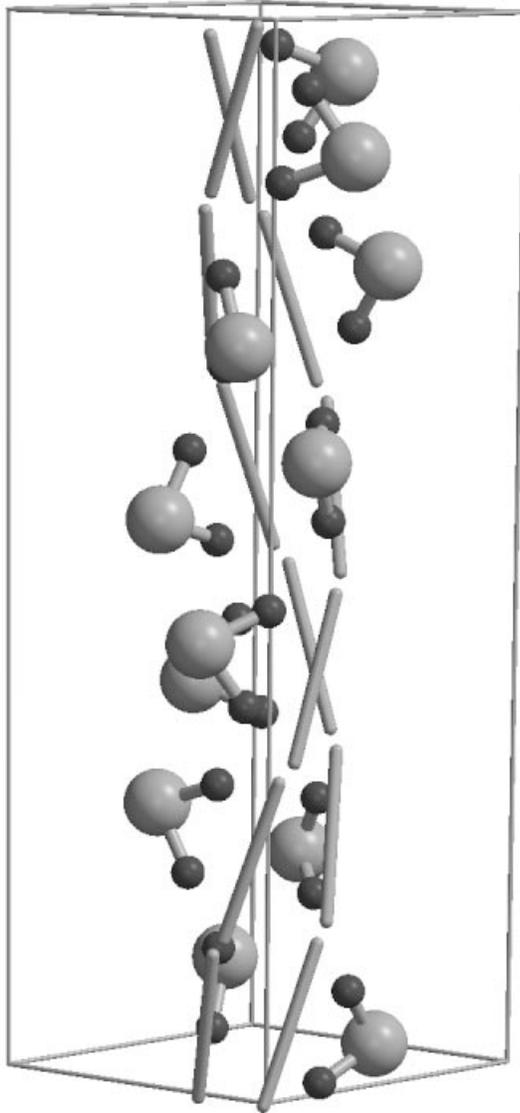
Form 4, Raumgruppe P6₁22, Abb. 20. Repressoren, die sich übereinander entlang der helikalen "Unendlich"-DNA befinden, besitzen wegen der Versetzung keine Kontakte. Dagegen bildet ein Protein-Molekül zum Protein eines benachbarten DNA-Stranges Kontakte über die Helizes 4 und 5 aus. Dabei bildet sich ein Vier-Helixbündel aus den Helizes beider Repressoren. Jeder Repressor ist an zwei solcher Vier-Helixbündel beteiligt.

Form 5, Raumgruppe P2₁, Abb. 20. In dieser Kristallform werden hauptsächlich zwei Kontaktflächen ausgebildet. Die beiden Repressoren, die sich in der Elementarzelle befinden, stehen im Kontakt einerseits über Helizes 7 und 9', den N-Terminus der Helix 8 sowie den C-Terminus der Helix 10' und andererseits über Helix 5 und den C-Terminus von Helix 4 sowie die Schleife zwischen beiden. Die zweite Kontaktfläche umfaßt jeweils zwei Repressoren, die entlang des "unendlichen" DNA-Stranges nebeneinander liegen. Sie besteht aus den Helizes 4 und 7 beider Repressoren.

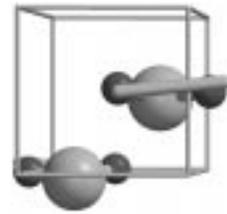
Form 6, Raumgruppe C222₁, Abb. 20. Die Helizes 5 und 7 und der N-Terminus von Helix 9 eines Repressors bilden Kontakte zu den entsprechenden Elementen von zwei anderen TetR^D/DNA-Komplexen aus. Die andere Kontaktfläche umfaßt die „Breitseite“ des Repressors, wobei sich jeweils die Helizes 1 zweier Nachbarmoleküle berühren und außerdem die Helix 4, die Schleife abschließend an Helix 4 und der C-Terminus von Helix 6 mit der Helix 9 des Nachbarmoleküles in Kontakt treten.

Form 7, Raumgruppe P2₁2₁2 Die Kristallkontakte entsprechen den für Form 4 beschriebenen.

P6₁22
(Form 4)



P2₁(Form 5)/
P2₁2₁2 (Form 7)



C222₁(Form 6)

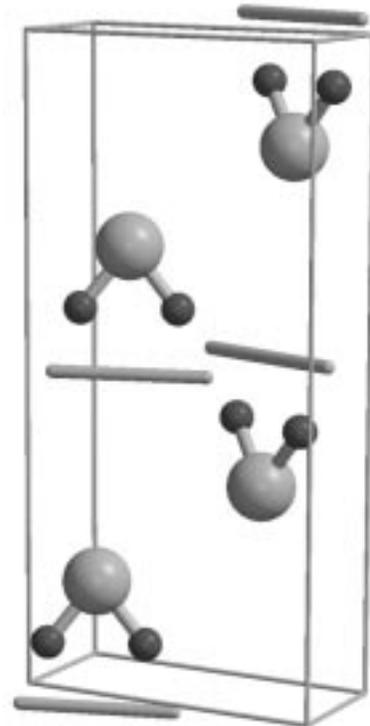


Abbildung 20: Kristallpackungen der TetR^D-Komplexe (Teil 2)

Stereodarstellungen zur Packung der TetR^D/DNA-Komplexe in den Formen 4, 5 (7) und 6. Die Struktur des TetR^D wurde schematisiert. Die große Domäne ist als große, die beiden Drei-Helix-Bündel durch kleine Kugeln repräsentiert. In den DNA-Komplexen ist die DNA durch einen Stab dargestellt. In den Schemata sind TetR^D/18mer in der Raumgruppe P6₁22 mit den helikal angeordneten DNA-Duplexen, TetR^D/18mer in der Raumgruppe P2₁ bzw TetR^D/15mer(GC/GC) in der Raumgruppe P2₁2₁2 und TetR^D/15mer(AT/GC) in der Raumgruppe C222₁ dargestellt. In den beiden rechts abgebildeten Kristallpackungen liegt eine lineare Anordnung der Doppelstrang-DNA vor.

Form 8, Raumgruppe P4₁2₁2, Abb. 19. Jeweils ein Repressor kontaktiert 4 andere, von denen 3 in benachbarten Zellen liegen. Das "zentrale" Molekül ist mit seinen DNA-Bindungsdomänen entlang einer Richtung der tetragonalen Achse orientiert, während die vier Nachbarmoleküle in die entgegengesetzte Richtung zeigen. Ent-

lang der tetragonalen Achse liegen alle fünf Komplexe auf einer Höhe. Der zentrale TetR^D/DNA-Komplex bildet jeweils zu zwei sich gegenüberliegenden Molekülen die gleichen Kontakte. Die erste Kontaktfläche besteht aus den Helizes 7, 9' und den Schleifen anschließend an die Helizes 3 und 8 (zentrales Molekül) sowie dem C-Terminus von Helix 1 (Nachbarmoleküle). Die zweite Kontaktfläche setzt sich aus den Helizes 5, 9 und 10 (zentrales Molekül) und den Helizes 2, 3, 4 und 7 (Nachbarmoleküle) zusammen.

4.3 Unterschiede in den Sekundärstrukturen

Die Sekundärstrukturen der TetR^D-Formen wurden nach Kabsch und Sanders ⁷⁴ bestimmt. Die Verläufe der Helizes in den drei Zuständen "frei" (Form 1), "DNA-gebunden" (Form 6) und "induziert" (Form 9, TetR^D[Ni7CITc]₂) sind in Abb. 6 dargestellt. Die Unterschiede in der Sekundärstruktur finden sich an den C-Termini der Helizes 6, 8 und 10, sowie an den N-Termini der Helizes 3 und 7. Diese Helizes sind um maximal 5 Aminosäuren verkürzt oder verlängert.

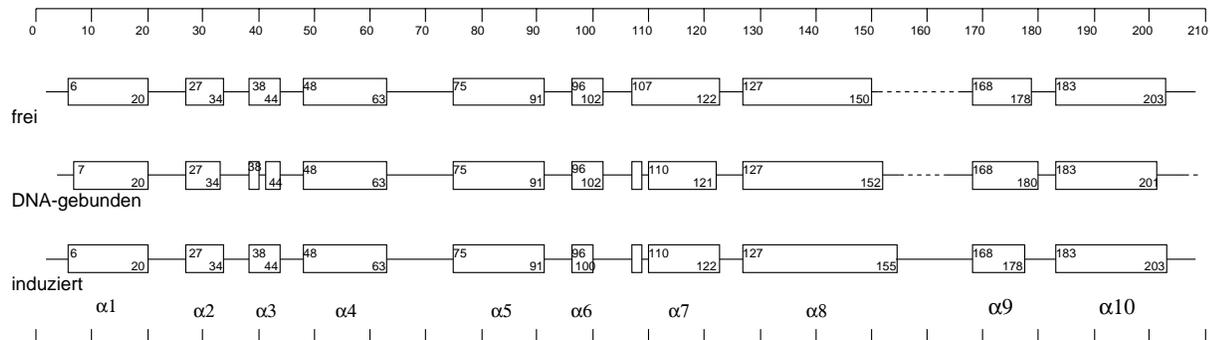


Abbildung 21: Sekundärstruktur der drei TetR^D-Formen

Die Sekundärstruktur wurde mit DSSP ⁷⁴ berechnet. Boxen stellen α -Helizes dar, Linien sind Schleifenbereiche und die gepunkteten Linien entsprechen nicht modellierten Peptidsegmenten. Die Zahlen in den Boxen entsprechen jeweils den Aminosäuren der Helixanfänge bzw -enden (vgl. Tabelle 8). Unterhalb der Sekundärstrukturen ist die Reihenfolge der Helizes angegeben. Die flexible Schleife zwischen den Helizes 8 und 9 konnte nur in den induzierten Monomeren der Formen 9 und 13 modelliert werden.

4.4 Strukturvergleich von freiem und induziertem TetR

TetR kristallisiert in induzierter wie auch in freier Form in der Raumgruppe I4₁22. Die Gitterkonstanten unterscheiden sich nur um maximal 1.9 %. Da in beiden Formen dieselben Kristallkontakte ausgebildet werden, können die strukturellen Unterschiede der

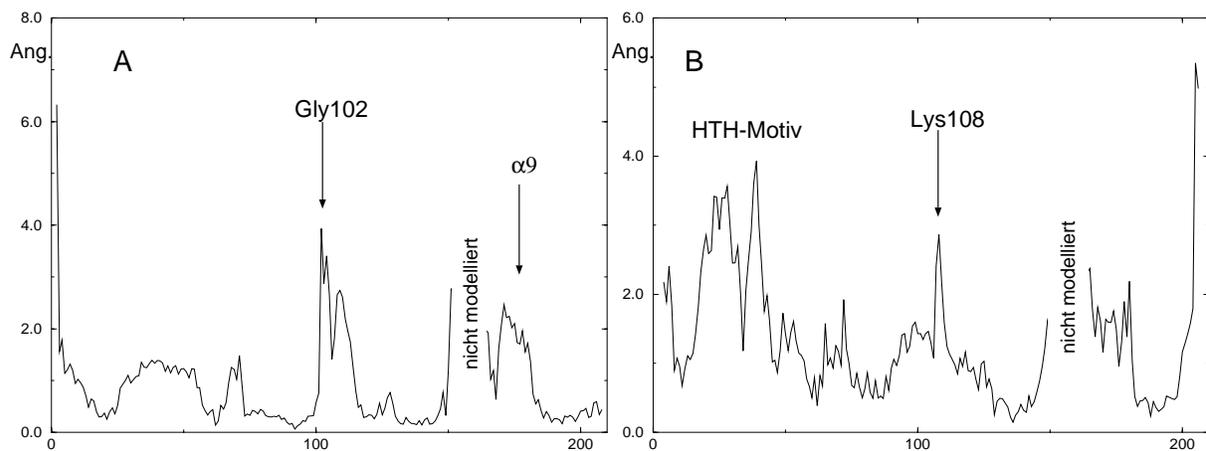


Abbildung 22: Standardabweichungen der Aminosäurepositionen des induzierten (A) und des DNA-gebundenen TetR^D (B) von der freien Form

Für die Bestimmung der Standardabweichungen der einzelnen Aminosäuren wurden die Koordinaten der Hauptkettenatome verwendet. Signifikante Abweichungen zwischen dem induzierten und dem freien TetR^D befinden sich an Position Gly102 (Pfeil), wo sich die Helix 6 entwindet, im Bereich des Drei-Helix-Bündels (einschließlich HTH-Motiv) und der Helix 9. Unterschiede an den Termini des Proteins und in der Nähe der flexiblen Schleife liegen ebenfalls vor.

Der DNA-gebundene (Form 6) und der freie TetR^D unterscheiden sich in der Position des Drei-Helix-Bündels mit anschließender Helix 4 und in dem Bereich um die Helix 6.

beiden Formen nur auf die Bindung des Induktors und die nachfolgende Induktion (Konformationsänderung) zurückgeführt werden.

Die Atomkoordinaten des freien und des induzierten TetR^D lassen sich mit einer mittleren Standardabweichung von 0.85 Å überlagern. Die größte Abweichung liegt im Bereich von Gly102 und Thr103 (siehe Abb. 22). Im freien TetR gehört dieser Bereich zur Helix 6. In der induzierten Struktur bilden die Aminosäuren His100 bis Thr103 eine β -Schleife⁶⁷. His100 gehört außer zur β -Schleife auch noch zur Helix 6. Diese Helix wird dadurch um 2 Aminosäuren verkürzt. Interessanterweise sind die beiden N- und C-terminalen Aminosäuren der Helix 6 jeweils Glycine. Diese Aminosäure kommt häufig in Schleifenbereichen vor, wo die stereochemischen Bedingungen keine Aminosäure mit einer ausladenden Seitenkette zulassen^{101, 134}. Im Fall von TetR^D sind die Glycine an den Position 96 und 102 für die Funktion essentiell (siehe auch Seite 59). Beide Aminosäuren sind in allen Tet-Repressoren der bekannten sieben Klassen konserviert.

Die bei Induktion stattfindende Entwindung der C-terminalen Schleife der Helix 6 verändert die Sekundärstruktur an den Positionen Leu101 und Gly102 (zur Funktion siehe Kapitel 4.8.1). Dabei geht die Wasserstoffbrücke zwischen Gly102 N und Lys98 O verloren, sie wird jedoch durch eine Wasserstoffbrücke der neu gebildeten β -Schleife zwischen Thr103 N und His100 O ersetzt (siehe Abb. 23). Die Induktorbindung bewirkt

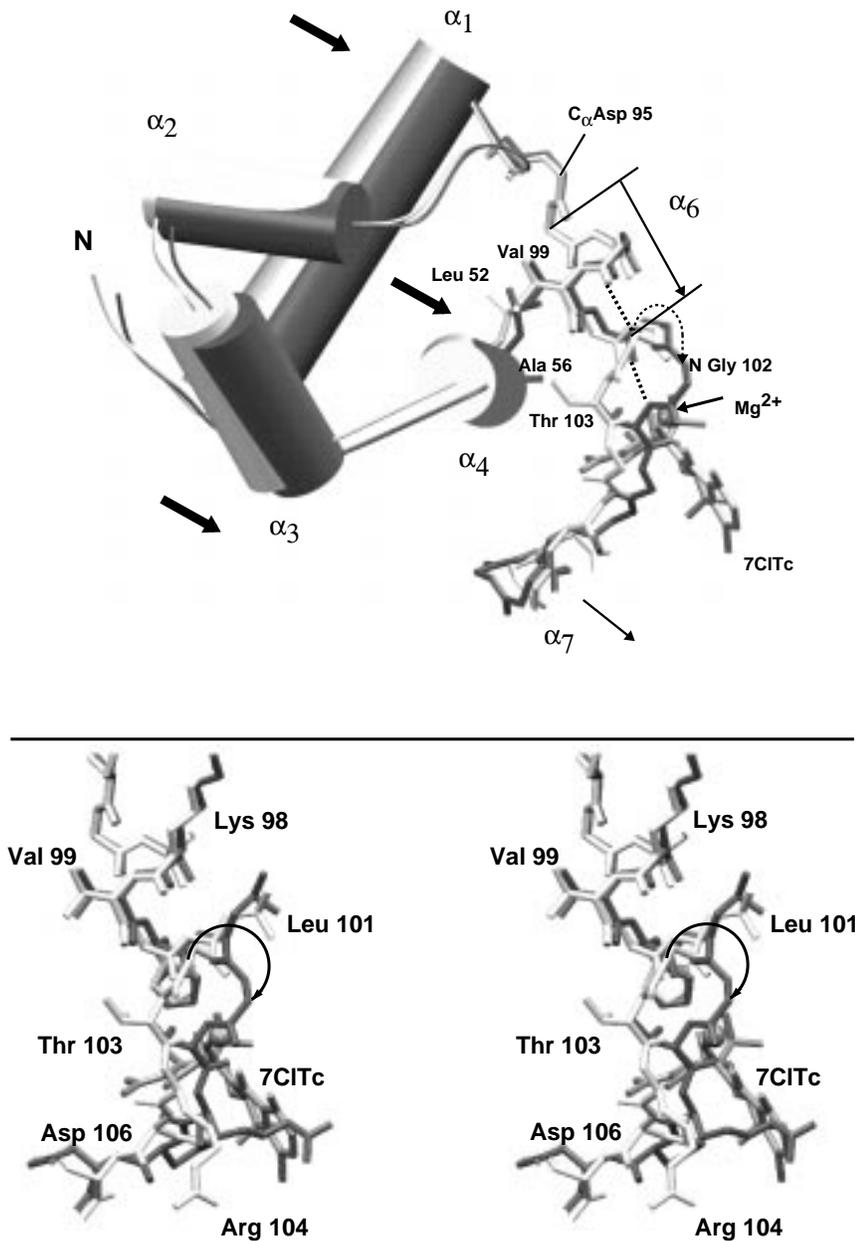


Abbildung 23: Strukturänderungen bei Induktorbindung

In beiden Abbildungen ist der freie TetR^D hell und der TetR^D/Induktor-Komplex dunkel dargestellt. oben: Mit der Bindung des Induktors [MgTc]⁺ wird die Helix 6 entwunden, wobei die Peptidbindung zwischen Leu101 und Gly102 umklappt. Dadurch ändert sich das Wasserstoffbrückenmuster in diesem Bereich. Die Verschiebung der Hauptkette von Gly102 bis Arg104 bewirkt eine Veränderung der Position der Helix 4 und damit auch die des Drei-Helix-Bündels α_1 , α_2 , α_3 . Der [MgTc]⁺-Komplex befindet sich in dieser Abb. unten rechts. Die dicken Pfeile stellen die Verschiebung der DNA-bindenden Domäne dar. Die schmalen Pfeile markieren die Helizes 6 und 7. Im Fall des freien TetR^D sind der Anfangs- und Endpunkt der Helix 6 angegeben. Der gepunktete gekrümmte Pfeil symbolisiert das Umklappen der Peptidbindung. Die beiden diskutierten Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien eingezeichnet. unten: Stereodarstellung der Aufwindung des C-terminalen Turns der Helix 6 mit Bildung einer β -Schleife. Der Pfeil zeigt die Verschiebung des C _{α} -Atoms von Gly102.

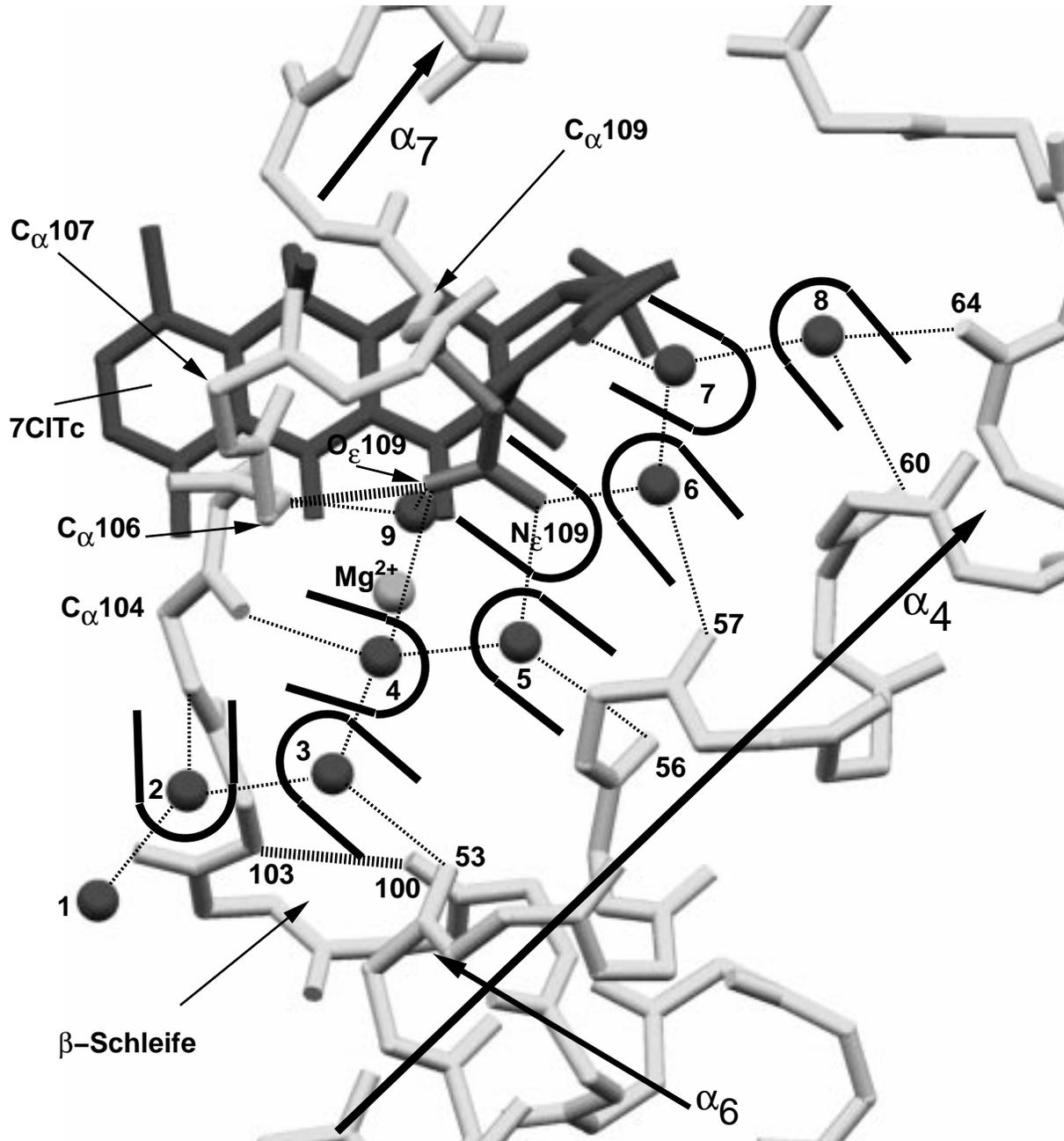


Abbildung 24: Stabilisierung der Lage von $\alpha 4$ durch einen "Reißverschluß" aus Wassermolekülen im Komplex TetR^D/[Mg 7CITc]₂

Die Bindung des Induktors bewirkt eine Stabilisierung des gesamten Repressors. An der Oberfläche des relativ fixierten Proteins werden dadurch mehr Wassermoleküle sichtbar, als in dem nicht-induzierten TetR. Eine Reihe von Wassermolekülen befindet sich zwischen den Helizes 4 und 6 und stabilisiert die relative Orientierung dieser Helizes zueinander. Die Wasserstoffbrücken zu Wassermolekülen sind als gepunktete Linien gezeichnet. Die Wasserstoffbrücke der β -Schleife zwischen dem Carbonylsauerstoff von His100 und dem Peptidstickstoff von Thr103 ist als dicke gestrichelte Linie dargestellt, ebenso wie die Wasserstoffbrücke zwischen dem Amidsauerstoff von Gln109 (dunkle Seitenkette) und dem Peptidstickstoff von Asp106. Dicke Pfeile zeigen den Verlauf der Helizes $\alpha 4$, $\alpha 6$ und $\alpha 7$.

die Knüpfung von zusätzlichen Wasserstoffbrücken, die die energetisch ungünstigere β -Schleife stabilisieren. Eine charakteristische Reihe von Wassermolekülen zwischen Helix 4 und Helix 6, die mittels Wasserstoffbrücken beide Helizes verbinden, wurde als "water-zipper" (Wasser-Reißverschluß) bezeichnet ¹¹⁸ (siehe Abb. 24). Für eine Bevorzugung der α -helikalen Struktur in dem freien TetR sprechen eher Entropieeffekte, da das Protein im Bereich 103 bis 110 sehr flexibel ist. Die Temperatur-Faktoren betragen für diese Aminosäuren 80.0 \AA^2 im Vergleich zu 28.4 \AA^2 bei 2TCT ⁷⁹. Es ist für die Funktion von TetR^D wichtig, daß die freie Struktur flexibel ist und somit den Induktor aufnehmen kann und daß der induzierte Repressor eine relativ starre Bindungstasche besitzt, um die Dissoziation des Komplexes zu verhindern.

Die entscheidende Strukturänderung bei der Induktion findet an der Peptidbindung zwischen Leu101 und Gly102 statt. Die planare Gruppe klappt um, so daß die Positionen des Carbonylsauerstoffs von Leu101 und der Amidstickstoff von Gly102 ihre Positionen wechseln. Dadurch verschiebt sich die Position des C _{α} von Gly102 und der nachfolgenden Hauptkette um ca. 3 Å, während die N-terminale Hauptkette bis zum C _{α} von Leu101 relativ unverändert bleibt. Dieser Flip ist nur an möglich, wenn die Aminosäure 102 ein Glycin ist. Mutationen zu anderen Aminosäuren verhindern die Induktion ¹¹², da bei einer

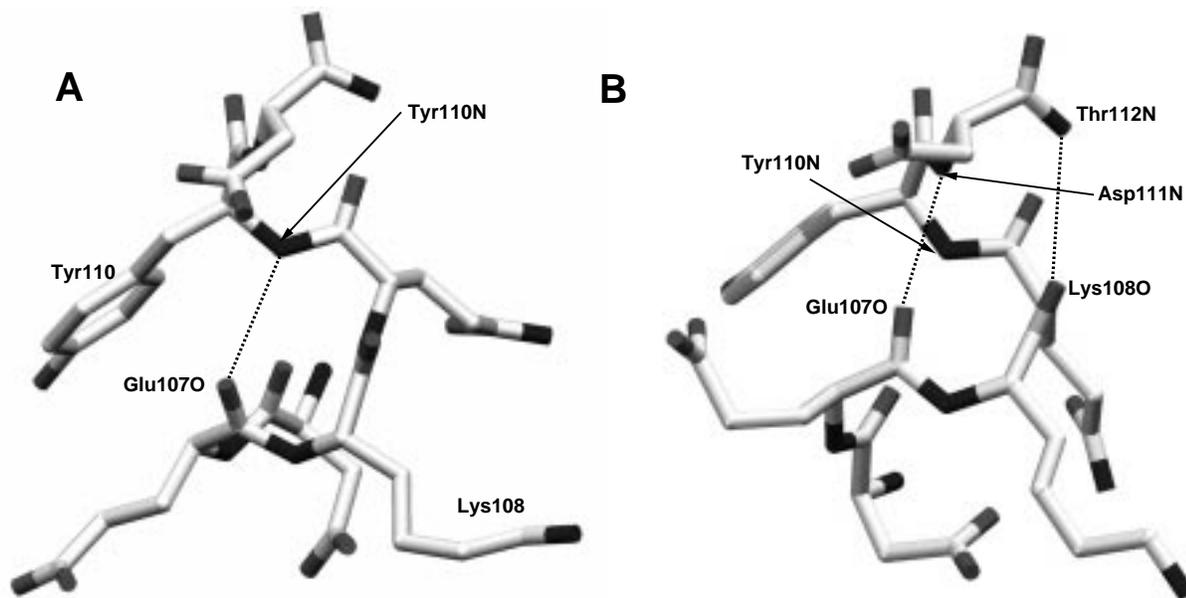


Abbildung 25: Wasserstoffbrücken in 3_{10} - und in α -Helizes

A: Die Wasserstoffbrücken werden in 3_{10} -Helizes zwischen dem Carbonylsauerstoff der Aminosäure "i" (Glu107) und dem Amidwasserstoff der Aminosäure "i+3" (Tyr110) gebildet.
 B: In α -Helizes besteht diese Brücke zwischen den Aminosäuren "i" (z.B. Glu107) und "i+4" (z. B. Asp111). Die gestrichelten Linien kennzeichnen die Wasserstoffbrücken. Die beiden Helixfragmente befinden sich am N-Terminus der Helix 7 des induzierten TetR^D (2TCT ⁷⁹) bzw. des freien TetR^D (Form 1).

Bewegung des C_α die gesamte Seitenkette der Aminosäure diese Translation ausführen müßte, was sterisch ausgeschlossen ist. Das würde zu Kollisionen führen.

Neben den sterischen Beschränkungen hinsichtlich der Aminosäure 102 ist Gly102 nach Induktion Teil der β -Schleife vom Type II von His100 bis Thr103. An der Position 3 dieser Schleifen ist Glycin bevorzugt ¹³⁴.

Weitere Sekundärstrukturänderungen finden am Beginn der Helix 7 und am Ende von Helix 8 statt. An der Helix 7, die sich im freien Zustand von Glu107 bis Thr121 erstreckt, wandelt sich bei Induktion die N-terminale Windung in eine 3_{10} -Helix um. Die Aminosäuren einer 3_{10} -Helix besitzen sehr ähnliche Hauptkettentorsionswinkel wie die Peptidkette einer regulären α -Helix, deshalb nehmen beide vergleichbare Positionen im Ramachandran-Diagramm ein. Der Unterschied besteht in der Form des Wasserstoffbrückenmusters (siehe Abb. 25). Während in der α -Helix zwischen dem Carbonylsauerstoff der i -ten Aminosäure und der NH-Gruppe der $i+4$ -ten Aminosäure eine Wasserstoffbrücke gebildet wird, wirkt als Wasserstoffbrückendonator in der 3_{10} -Helix die NH-Gruppe der $i+3$ -ten Aminosäure. Somit bilden drei Aminosäuren einen Ring aus 10 Atomen, der durch eine Wasserstoffbrücke geschlossen wird ³⁷. Diese Helixkonformation ist im Vergleich zur α -Helix energetisch

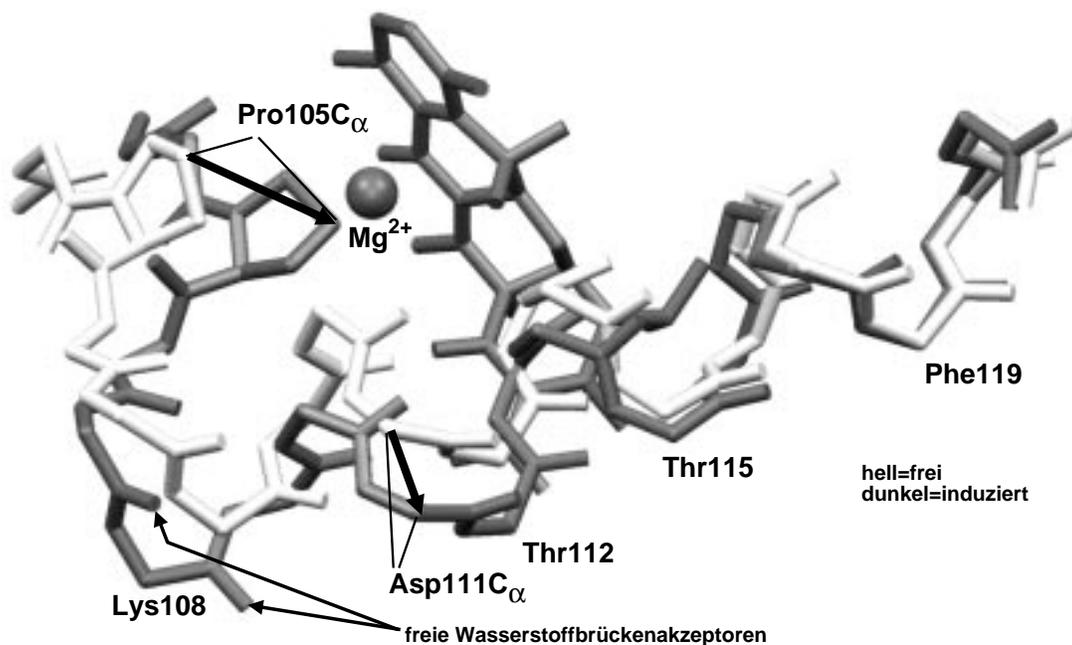
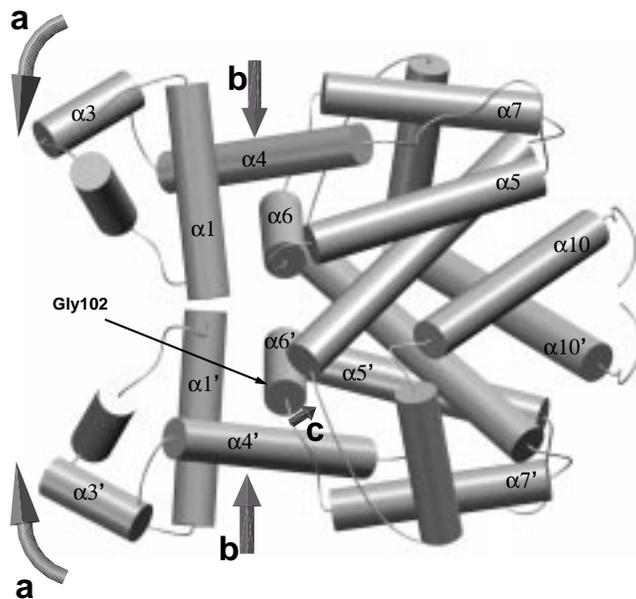


Abbildung 26: Entwindung der Helix 7

Überlagerung des freien (hell) und des induzierten (dunkel) TetR^D. Die Helix 7 wird deformiert, indem der mittlere Teil der Helix von der Bindungstasche weg zum Solvens gedrückt und die Schleife N-terminal zur Helix 7 zum Induktor gebogen wird. Dadurch verändert sich die erste Windung der Helix 7 und es bildet sich eine 3_{10} -Helix. Durch dicke Pfeile sind jeweils die Translation des Pro105 zum Tc und die Verschiebung des C_α von Asp111 von der Bindungstasche weg gekennzeichnet.

Abbildung 27: Verschiebung der DNA-bindenden Domänen bei Induktorbindung



Die ablaufenden Verschiebungen finden bei dem Übergang vom freien zum induzierten TetR^D statt. Die Pfeile, die mit 'a' markiert sind, stellen die Bewegung der DNA-bindenden Domänen dar. Mit den Pfeilen 'b' sind Verschiebungen der N-terminalen Bereiche der Helices 4 und 4' gezeigt. Die C-terminale Entwindung der Helix 6 und die damit zusammenhängende Verschiebung der Schleife zwischen Helix 6 und 7 ist mit dem Pfeil 'c' symbolisiert.

ungünstig, da die Dipole der Peptidbindung nicht wie in der Helix entlang einer Linie liegen und die Seitenketten entlang der Helix übereinander stehen, während sie in der α -Helix versetzt sind. Deshalb werden nur kurze 3_{10} -Helices bzw. -Bereiche in helikalen Strukturen beobachtet.

Diese Strukturänderung am N-terminus von Helix 7 (siehe Abb. 26) steht, wie auch die am C-Terminus von Helix 6, im direkten Zusammenhang mit der Tetrazyklinbindung (siehe Tab. 9). Während His100 und Thr103 in der Magnesiumkoordination teilnehmen, bestehen zwischen dem gebundenen Tc und dem N-Terminus von Helix 7 Kontakte über Pro105. Die Verschiebung des starren Prolinringes um 2.7 Å während der Induktion erzwingt die teilweise Aufwindung der Helix 7. Desweiteren sind die Seitenketten Val113 und Gln116 der Helix 7 an der Tc-Koordination beteiligt. Sie befinden sich in der Mitte der Helix 7.

Diese beide Strukturänderungen während der Induktion betreffen Entwindungen von α -helikalen Bereichen. Die Strukturänderung am C-Terminus von Helix 8 besteht dagegen in einer Verlängerung um 5 Aminosäurereste, die ich wegen des relativ großen Abstandes zwischen dem Tc und dem C-Terminus dieser Helix von ca. 13 Å als sekundären Effekt

der Induktorbindung betrachte. Aufgrund der größeren Flexibilität des freien TetR^D ist die nichtmodellerte (ungeordneten) Schleife zwischen den Helizes 8 und 9 in dem freien TetR^D um vier Aminosäuren länger als im induzierten TetR^D (2TCT⁷⁹) und erstreckt sich von Thr152 bis Glu164. Bei Induktorbindung wird der Repressor rigider, und das führt dazu, daß die Flexibilität dieser Schleife abnimmt und die Aminosäuren Thr152 bis Leu155 modelliert werden können; sie erscheinen als Verlängerung der Helix 8.

Bei den eben besprochenen Strukturänderungen sind jeweils bis zu 5 Aminosäuren betroffen. Es liegen aber auch Differenzen in den Atomkoordinaten für größere Proteinbereiche der beiden TetR^D-Formen vor, die vor allem die Unterschiede in der Position der DNA-bindenden Domäne und der Helix 9 betreffen. Die DNA-Bindungsdomäne ist um ca. 1 Å verschoben, wobei die Richtung der Translation parallel zur theoretisch am Repressor liegenden DNA orientiert ist (siehe Abb. 27). Diese Verschiebung wird durch ein Kippen der Helix 4 um ihren C-Terminus gewährleistet. Der N-Terminus der Helix 4 bewegt sich um 1.2 Å. Das entspricht einer Rotation um den fixierten C-Terminus von 3°. Die Translation des Drei-Helix-Bündels ist vom Proteinkern weggerichtet und bewirkt das relative Aufblähen des Repressors, das mit Kleinwinkelstreuung von Röntgenstrahlung festgestellt wurde⁸⁴.

Die Translation der Helix 9 während der Induktion verläuft parallel zur Proteinoberfläche und ist hin zur DNA-Bindungsdomäne orientiert. Der Unterschied in den jeweiligen Positionen der Helix 9 beträgt 2.4 Å. Das ist ungefähr der halbe Durchmesser einer α -Helix. In der Kristallstruktur des freien TetR^D ist die Helix 9 beweglicher, was die Qualität der Elektronendichte verschlechtert, die hier nur fragmentarisch ist. Insbesondere für die solvensexponierten Seitenketten von Aminosäuren 171 bis 177 ist keine Elektronendichte zu beobachten.

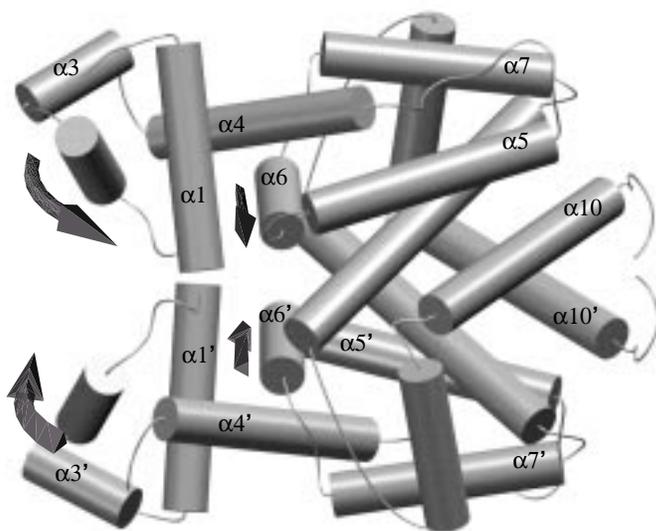
4.5 Strukturvergleich von freiem TetR und TetR^D/15mer-DNA

In diesem Kapitel werden die Strukturen des freien (Form 1) und des DNA-gebundenen TetR^D (Form 6) verglichen. Der größte Unterschied der beiden Formen liegt in den Positionen der DNA-bindenden Domänen. Die mittlere Abweichung zwischen beiden beträgt nach Überlagerung der Koordinaten aller Proteinhauptkettenatome für diese Domäne 2.3 Å. Die Translation der DNA-bindenden Domäne wird durch eine Rotation der Helix 4 um ihren C-Terminus von 4° gewährleistet. Die vier N-terminalen Helizes bilden dabei eine Einheit und lassen sich zwischen den beiden TetR^D-Formen mit einer rms Abweichung von 0.8 Å überlagern, wobei die Abweichung bei Vergleich der gesamten Repressordimere bei 1.2 Å liegt. Die Bewegungsrichtung des Drei-Helix-Bündels ist ungefähr parallel zu der Erkennungshelix, wobei diese in Richtung ihres N-Terminus verschoben wird. Gleichzeitig

ist die DNA-bindende Domäne um die Helix 4, mit der jeweils das Drei-Helix-Bündel verknüpft ist, um 13° rotiert. Nach diesen Translationen und Rotationen verringert sich der Abstand zwischen beiden Erkennungshelizes von 40.6 \AA auf 36.6 \AA und entspricht somit ungefähr dem Abstand zweier tiefer Furchen einer B-DNA, der etwa 34 \AA beträgt. Im Kapitel 4.12 wird gezeigt, daß sich die Struktur der DNA von der B-Form unterscheidet und der Abstand zweier tiefer Furchen 38 \AA beträgt. Die Orientierung des DNA-Bindungsmotive zur DNA wird im Kapitel 4.13 diskutiert.

Innerhalb des Drei-Helix-Bündels sind Strukturveränderungen bei den Helizes 1 und 3 zu beobachten. Die Helix 1 ist am N-Terminus des DNA-gebundenen TetR^D flexibler und fehlgeordnet, so daß die beiden N-terminalen Aminosäuren nicht modelliert werden konnten. Die Helix 3 wird durch DNA-Bindung deformiert. Dabei bildet sich aus der N-terminalen Schleife dieser Helix eine 3_{10} -Helix. Der Abstand zwischen dem Amidsauerstoff von Gln38 und dem Amidstickstoff von Tyr42 vergrößert sich auf 4.2 \AA , während der zum Amidsauerstoff von Leu41 sich von 3.0 auf 2.9 \AA verkürzt (vergleiche dazu Abb. 25. Die Erkennungshelix des DNA-gebundenen TetR^D läßt sich mit einer rms Abweichung von jeweils 0.8 \AA auf die des freien und des induzierten TetR^D überlagern, während die beiden letzten untereinander mit einer rms Abweichung von 0.13 \AA übereinstimmen (Hierbei werden nur die Hauptkettenatome betrachtet.). Dieser Unterschied zwischen dem DNA-gebunden und den -nichtgebundenen TetR^D ist die Folge des eben genannten Effektes, der eine relative Streckung der Helix in der DNA-gebundenen Form bewirkt. So vergrößert

Abbildung 28: Verschiebung der DNA-bindenden Domänen bei DNA-Bindung



Die ablaufenden Verschiebungen finden bei dem Übergang vom freien zum DNA-gebundenen TetR^D statt. Die DNA-bindenden Domänen bewegen sich so, daß die Erkennungshelizes sich parallel zur großen Furche verschieben. Die gekrümmten Pfeile markieren die Bewegung der DNA-bindenden Domänen, die geraden Pfeile kennzeichnen die Verschiebung der Helices $\alpha 6$ und $\alpha 6'$.

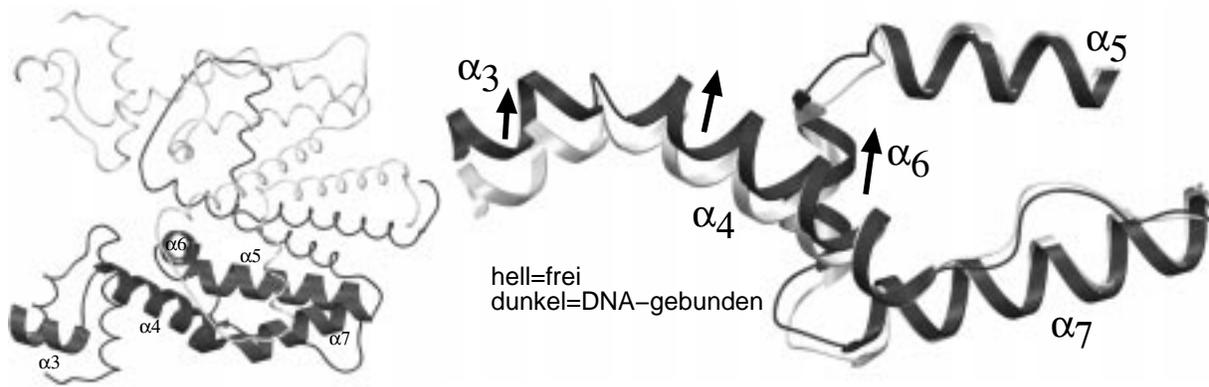


Abbildung 29: Strukturänderungen bei DNA-Bindung

In dem rechten Bild sind die Strukturen des freien (hell) und des DNA-gebundenen TetR^D (dunkel) überlagert. Die Bindung an die DNA bewirkt eine Veränderung der Position der DNA-bindenden Domäne. Die ablaufende Translation ist mit der Rotation der Helix 4 um ihren C-Terminus und mit der Translation der Helix 6 in Richtung ihres C-Terminus gekoppelt. Die Bewegungen sind durch Pfeile markiert. Außerdem verändern sich die Positionen der beiden Schleife von und zur Helix 6. Die Orientierung dieser Abbildung ist um 90° um eine horizontale Achse zur Gesamtdarstellung des TetR^D (linke Abbildung) gedreht. In der Gesamtdarstellung des TetR^D sind die fünf Helizes der rechten Abbildung dunkel hervorgehoben.

sich der Abstand zwischen den beiden C_α-Atomen der C- und N-terminalen Aminosäuren von 10.0 Å in dem induzierten TetR^D auf 11.0 Å in dem DNA-gebundenen TetR^D. Die deformierte α-Helix wird durch das Sekundärstrukturanalyseprogramm DSSP⁷⁴ nur noch teilweise erkannt (siehe Abb. 21 auf Seite 50)

Aufgrund der Verschiebung der DNA-bindenden Domäne und der Rotation der Helix 4 sind die Positionen der Helix 6 und der Schleifen von Helix 6 zu den Helices 5 und 7 verändert. Die Helix 6 wird dabei um 1.5 Å entlang der Helixachse bewegt (siehe Abb. 29). Die DNA-Bindungsdomäne und die Helix 6 sind auf diese Weise miteinander gekoppelt. Die Verknüpfung ist die Helix 4, über die das Induktionssignal vermittelt wird.

In den sieben bekannten TetR sind die Aminosäuren der Helix 6 bis auf die Austausch gegen homologe Aminosäuren an den Positionen 97 (A97G), 98 (K98R) und 99 (V99I oder V99L) konserviert. Insbesondere die erste Aminosäure der Helix 6, Gly96, und die beiden angrenzenden Aminosäuren Arg94 und Asp95 sind in allen TetR-Klassen identisch. Sie bilden mit der Aminosäure Tyr93 (bzw. His93) eine β-Schleife vom Typ II, bei dem an der dritten Position (hier Asp95) in den anderen Proteinen fast ausschließlich Glycin vorkommt¹³⁴. Diese Homologie innerhalb der TetR-Klassen läßt auf einen analogen Induktionsmechanismus in allen Klassen schließen.

In die gleiche Richtung wie die Helix 6 werden auch die beiden angrenzenden Schleifen bewegt. Dabei wird der C-Terminus von Helix 5 etwas verbogen und die Geometrie des N-Terminus der Helix 7 deformiert. Die Deformation des N-terminalen Bereiches der Helix 7

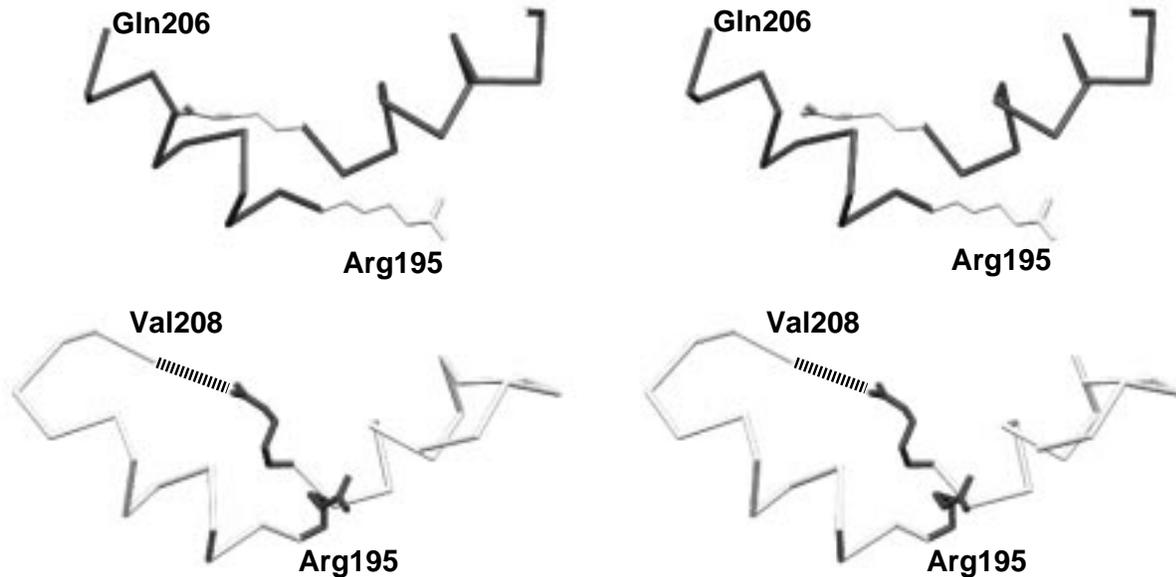


Abbildung 30: Struktur des C-Terminus von TetR^D

Stereodarstellung des C_α-Verlaufs der C-terminalen Peptide in den Strukturen mit (Form 6, oben) und ohne DNA (2TCT⁷⁹, unten). In den DNA-freien Strukturen bilden die Aminosäuren 204 bis 208 eine Schleife, die in der Salzbrücke der Guanidiniumgruppe Arg195' und der C-terminalen Carboxylatgruppe von Val208 endet. In dem DNA-gebundenen TetR^D verläuft die Helix 10 bis zum C-Terminus, wobei aber dieser Bereich zu beweglich ist und das charakteristische Wasserstoffbrückenmuster bei Leu201 endet. In der oberen Darstellung ist die Hauptkette dunkel und Arg195 (bzw. Arg195') hell dargestellt. Die letzten beiden Aminosäuren von TetR^D im DNA-gebundenen Zustand wurden nicht modelliert. In der unteren Abbildung sind die Hauptkette hell und Arg195 (bzw. Arg195') dunkel.

wird durch die Translation der Aminosäuren 103 bis 105 erzwungen. Diese Translation, die zur Deformation der Helix 7 führt, ist auch Ursache für die Entwindung in dem induzierten TetR^D; jedoch bewegen sich bei DNA-Bindung die C_α-Atome von Thr103, Arg104 und Pro105 nur um 45 % des Weges im Vergleich zur Tc-Induktion. Bei den Veränderungen am N-Terminus von Helix 7 im Verlauf der DNA-Bindung bleibt aber die α-helikale Struktur erhalten.

In der Struktur TetR^D/DNA reicht der erste Teil der modellierten Polypeptidkette bis Leu155, woran sich die flexible Schleife anschließt. In der Struktur des freien TetR^D beginnt die flexible Schleife schon bei Thr152. Die Länge an dieser Position des TetR^D im DNA-Komplex stimmt mit der des induzierten TetR^D (2TCT⁷⁹) überein. Im DNA-Komplex erstreckt sich die Helix 8 aber nur bis Thr152, während sie in dem induzierten TetR^D (Form 9) bis Leu155 läuft. Aufgrund von Kristallkontakten ist das Tripeptid, das sich an die Helix 8 der DNA-gebundenen Form anschließt, geordnet und hat keine α-helikale-Struktur.

Die nachfolgende Helix 9 des TetR^D/DNA liegt bei der Überlagerung der Moleküle

mit ihrer Position neben der des freien TetR^D. Diese Helix wird also verschoben, wobei der Translationsweg der gleiche ist wie zwischen dem freien und dem induzierten TetR^D. Die Verschiebung erfolgt um etwa die Hälfte der Länge der Translationsbewegung, die bei der Induktion des freien TetR^D abläuft. Sie ist durch die andere Kristallpackung bedingt, bei der die Position der Helix 9 durch den Kontakt zwischen Pro168 und dem β -turn der Aminosäuren 70 bis 73 stabilisiert wird. Obwohl die Helix 9 zum Eingang der Bindungstasche hin bewegt wird, bleibt die Öffnung im Protein ausreichend groß, um die Induktorbindung zu ermöglichen.

Ein weiterer Unterschied zwischen den Strukturen von TetR^D im freien und im DNA-gebundenen Zustand besteht in den Positionen der C-Termini der Polypeptidketten. Im freien wie auch im induzierten Zustand bildet die terminale Aminosäure Val208 mit der Carboxylatgruppe eine Salzbrücke zu Arg195'. Ich nehme an, daß aufgrund dieser Salzbrücke TetR^D nur mit Val208 in C-terminaler Position (siehe Kapitel 3.1) kristallisieren kann. In der DNA-gebundenen Form fehlt dagegen diese Salzbrücke. Die Helix 10 verläuft entsprechend dem Sekundärstrukturanalyseprogramm DSSP nur bis Leu201, bildet aber eine ungeordnete Helixstruktur bis zum C-Terminus und dadurch fehlt die C-terminale Schleife zum Arg195'. Der C-Terminus, von Aminosäure 207 bis 208, ist nicht modellierbar. Es ist aber anzunehmen, daß der flexible C-Terminus von Helix 10 diese beiden Aminosäuren mit einschließt. In der freien Struktur beginnt mit Leu204 die C-terminale Schleife, die in der Salzbrücke zum anderen Monomer endet. Eine Faltung in Form einer Helix wie in der DNA-gebundenen Form ist nicht möglich, da in der Kristallpackung der freien und induzierten TetR^D die Moleküle kollidieren würden.

4.6 Beweglichkeit entlang der Dimerisierungsfläche

Müller und Mitarbeiter¹¹² konnten anhand ihre molekularbiologischen Arbeiten zeigen, daß die Induktion durch Mutationen an der Dimerkontaktfläche beeinflusst wird und vermuten eine Intradomänenbewegung, die bei Induktorbindung ausgelöst wird (siehe Abb 10 auf der Seite 11). Entsprechend diesem Modell müßten die beiden antiparallelen Helizes 8 und 10 gegen die symmetrieäquivalenten Helizes 8' und 10' entlang der planaren Dimerisierungsfläche rotieren, die sich hauptsächlich aus hydrophoben Kontakten zusammensetzt.

In Abb. 22 auf Seite 51 sind die Differenzen zwischen den Atomkoordinaten der drei TetR^D-Strukturen (frei, induziert, DNA-gebunden) dargestellt. Für die Überlagerung wurden alle gemeinsamen Hauptkettenatome der Repressordimere verwendet. Obwohl sich die DNA-Bindungsdomänen während der Induktion bewegen, wurden sie ebenfalls für den Strukturvergleich mit herangezogen, da ihr Anteil nur 25 % vom Gesamtprotein beträgt

und die Ergebnisse nicht verfälscht werden. Entsprechend dieser Abb. zeigen die Helizes 5, 8 und 10, die mit den symmetrieäquivalenten Helizes den hydrophoben Proteinkern bilden, in den drei Strukturen die geringsten Abweichungen voneinander. Der Proteinkern der großen Domäne ist damit der rigideste Teil des Repressors, was den Schlußfolgerungen der Publikation von Müller *et al.* ¹¹² widerspricht.

Die experimentelle Grundlage dieser Arbeit ¹¹² waren induktionsdefiziente Repressoren, deren Mutationsstellen in 4 Kategorien eingeordnet wurden. 23 dieser Punktmutanten sind entlang der Dimerisierungsfläche lokalisiert. Bei genauerer Analyse zeigt sich, daß bis auf G196S alle Punktmutationen die Tc-Bindungstasche beeinflussen. Diese Mutationen reduzieren die Tc-Bindung und verhindern nicht die angenommene Intermonomerbewegung. Die Mutationen der Aminosäuren His151, Glu157, Arg158, Pro167, Ala173 Leu176 betreffen Aminosäuren am Tc-Eingang, während Gly143, Cys144 die Mg-Koordination und Leu101, Tyr110, Glu114 über eine zweite Aminosäure die Induktorbindung beeinflussen. Ser135 kontaktiert direkt den Induktor, und Leu146 die Helix 6. Die zuletzt genannte Mutation wird im Kapitel 5.4 diskutiert.

4.7 Die Induktorbindungstasche

Das homodimere Repressormolekül besitzt wegen seiner zweifachen Rotationssymmetrie zwei identische Induktorbindungstaschen. Sie werden durch die Helizes 5 bis 8 sowie 8' und 9' begrenzt. Die Bindungstasche gliedert sich entsprechend dem Aufbau des Tc in einen hydrophoben und einen hydrophilen Bereich. In Abb. 31 sind die beiden Bereiche und die dazu gehörigen Aminosäuren dargestellt. Das Gesamtvolumen der Bindungstasche beträgt in 2TRT ⁶⁷ 450 \AA^3 und hat damit 20 % mehr Volumen als der Induktor [MgTc]. In den Strukturen 2TRT ⁶⁷ und 2TCT ⁷⁹ haben die Bindungstaschen eine tunnelförmige Gestalt mit zwei schmalen Öffnungen von jeweils ca. 44 \AA^2 , von denen nur eine beschrieben wurde ⁷⁸, und einer Verdickung im Zentrum. In beiden Strukturen sind die Tetrazykline vollständig in dem Tunnel gebunden. Die Abstände vom Tc zum Solvens betragen von Ring A 7 \AA und von Ring D 11 \AA . Aufgrund des kürzeren Abstands zum Solvens und der Lokalisation neben der für die Induktion wichtigen Helix 4 wurde zunächst die Öffnung nahe des Tc-Rings A als Eingang postuliert ⁷⁹. Anhand der Struktur des freien TetR^D konnte jedoch gezeigt werden, daß die andere Öffnung des Tunnels für die Bindung des Induktors verantwortlich ist (siehe Kapitel. 4.7.2).

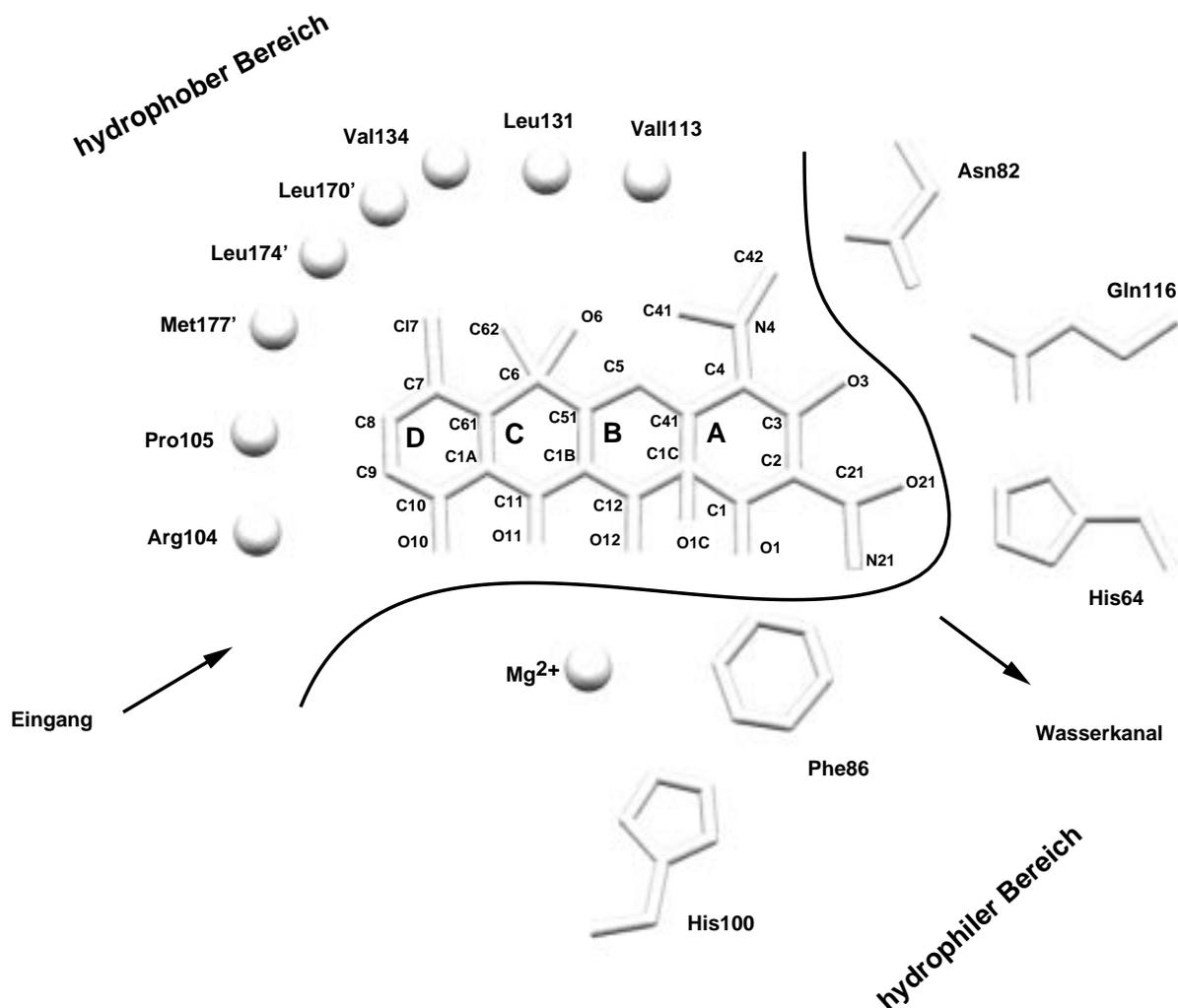


Abbildung 31: Zweiteilung des Bindungskanals

Das 7-Chlor-Tetrazyklin und die Aminosäuren, die Wasserstoffbrücken zum 7ClTc ausbilden, sind als Strichmodelle dargestellt. Aminosäuren mit hydrophoben Kontakten zum Tc sind als Kugeln symbolisiert. Die Atomnummerierung des Antibiotikums ist angegeben. Die Atome O10, O11, O12, O1C, O1, N21, O21, O3 und N4 sind über Wasserstoffbrücken an das Protein gebunden.

4.7.1 Vergleich der TetR^D[MTc]₂-Komplexe

TetR^D wurde im Komplex mit fünf Tetrazyklinanaloga kristallisiert. Die Komplexe mit [Ni-7ClTc] (Form 9), [Mg-9glyTc] (Form 10)¹²⁰ und [Mg-9NO₂Tc] (Form 11) sind isomorph zu den Strukturen 2TRT⁶⁷ und 2TCT⁷⁹. Bei den Komplexen mit [4epiTc] (Form 14) und [2nitriloTc] (Form 15) fehlt das zweiwertige Kation in der Bindungstasche, so daß sich diese beiden Komplexe von den anderen unterscheiden. Sie werden in Kapitel 4.10 analysiert. Die Strukturen der Tc-Analoga sind auf Seite 28 abgebildet. Die ersten drei Kristallstrukturen zeigen für die Induktoren den gleichen Bindungsmodus wie in den Strukturen 2TRT⁶⁷ und 2TCT⁷⁹. Das Tc bindet mit seinen funktionellen Gruppen an

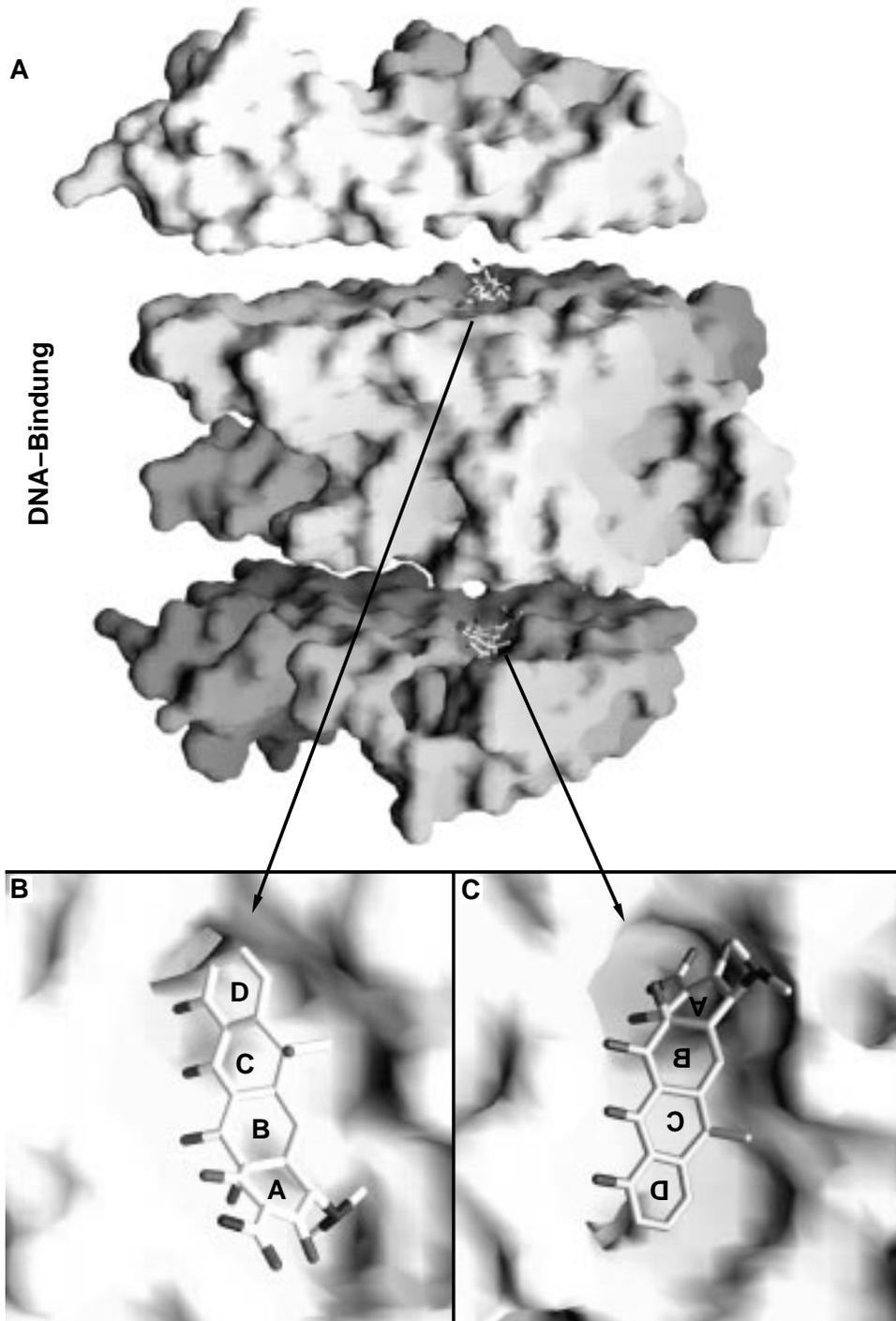


Abbildung 32: Position der Tetrazykline im TetR^D

Dargestellt ist die molekulare Oberfläche des induzierten TetR^D (A), deren oberer Teil um 10 Å nach oben und deren unterer Teil um 10 Å nach unten verschoben wurden. Die beiden Tc sind als Stabmodelle gezeigt. In den unteren Abbildungen sind die beiden Tc vergrößert dargestellt, wobei die Ansichten um 75° um die Horizontale zur Abb. A rotiert wurden. Die relative Orientierung der Tc in den beiden Taschen ist symmetrisch und wird durch die Bezeichnung der Tc-Ringe symbolisiert.

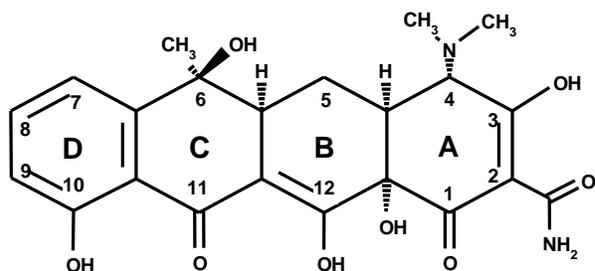


Abbildung 33: Aufbau des Tetrazyklins

die Seitenketten der Aminosäuren His64, Asn82, Phe86 und Gln116. Das Kation (Mg^{2+} bzw. Ni^{2+}) wird über His100 und drei Wassermoleküle koordiniert, die gleichzeitig Wasserstoffbrücken zu den Aminosäuren Thr103 und Glu147' ausbilden. Die Kontakte zwischen Induktor und TetR^D sind in Tabelle 9 auf Seite 72 aufgeführt. Neben den hydrophilen Kontakten bilden die Tc ebenfalls hydrophobe Kontakte in der Induktorbindungstasche aus. Diese Kontakte wurden für 2TCT beschrieben ⁷⁹.

In den Induktor-gebundenen Komplexen mit 9NO₂Tc bzw. 9glyTc wirken sich die Modifizierungen am Tc auf die Kontakte in der Bindungstasche aus. Beide Tc besitzen als Substituenten an Position 6 Wasserstoffatome (siehe Abb. 33) statt der Methyl- und Hydroxylgruppe (vgl. Seite 28). Diese Modifikation verbessert die Induktorbindung an den Repressor (siehe Tab. 3), wie am Beispiel des Tc-Analogons 6-deoxy-6-demethyl-Tc (6dodmTc) gezeigt werden konnte ⁹⁵. Die Substitution der Hydroxylgruppe durch ein Wasserstoffatom ermöglicht einen günstigeren Kontakt zur hydrophoben Seitenkette Val113. Die Bindungskonstante erhöht sich um den Faktor 2.4 im Vergleich zum 7HTc.

Die Nitrogruppe an Position 9 bildet eine Wasserstoffbrücke zum Nε der Guanidiniumgruppe von Arg104 aus und verändert geringfügig die Position dieser Seitenkette, was sich aber nicht auf die Salzbrücke zwischen Arg104 und Asp178' auswirkt.

Im Gegensatz zum 9NO₂Tc bestehen zwischen dem 9glyTc und TetR^D zusätzliche Kontakte. Der Substituent an Position 9 des 9glyTc koordiniert über ein Wassermolekül an das Atom Nε der Seitenkette His139 (siehe Abb. 35). Die Position des 9'-Substituenten wird mit Van-der-Waals-Kontakten am Bindungstascheneingang fixiert. Diese Kontakte wirken sich auf die Bindungskonstante von [Mg-9glyTc] an TetR aus, die im Vergleich zu 7HTc und 6dodmTc fünf- bzw. zwölfmal kleiner ist. Diese Schwächung der Induktorbindung beruht auf 2 Effekten:

1. Der Substituent an Position 9 steht in Van-der-Waals-Kontakt mit der hydrophoben Seitenkette Leu174' der Helix 9' (siehe Abb. 36, unten). Um Kollisionen zu vermeiden, ist das 9glyTc im Vergleich zu 9NO₂Tc um 8° gedreht (siehe Abb. 34). Die Achse dieser Rotation liegt in der Nähe des Tc-Ringes A, der mit Wasserstoffbrücken am Repressor fixiert ist. Das rotierende Element ist die Fläche aus den Tc-Ringen B, C

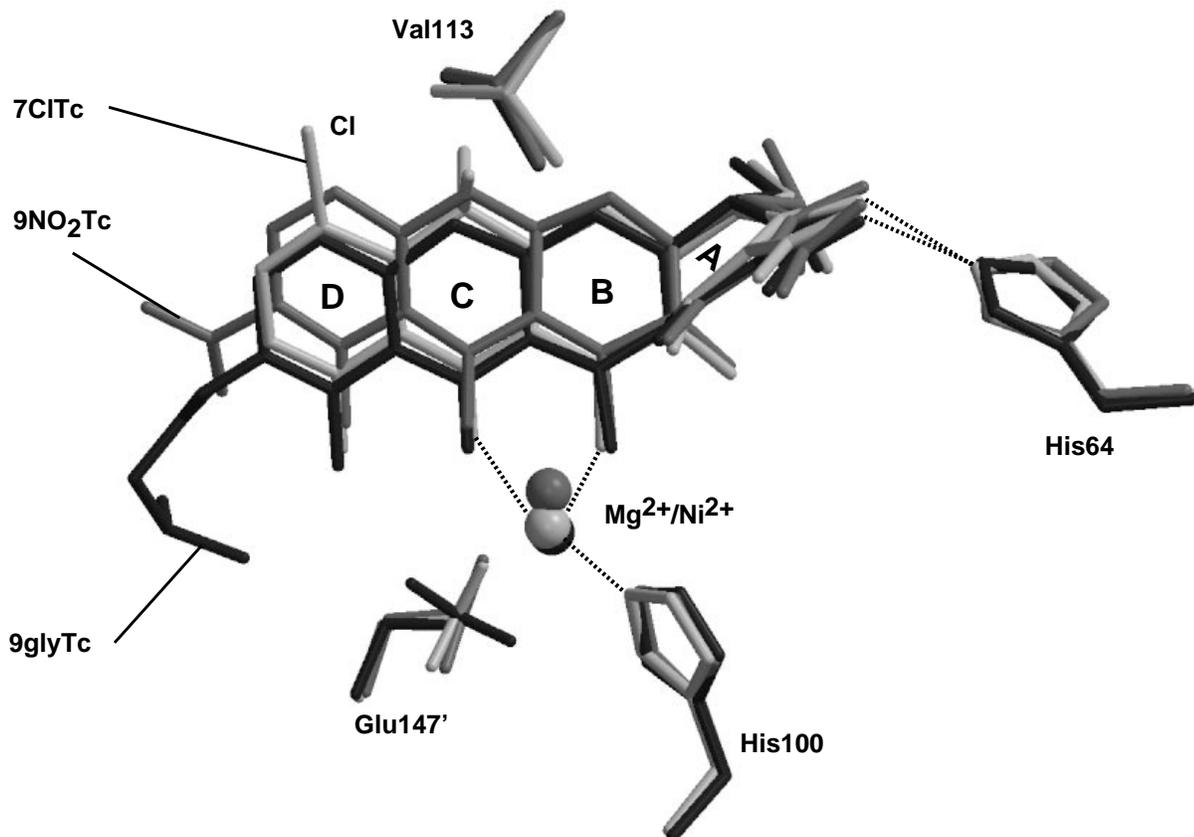


Abbildung 34: Position der Tc-Analoga in der Bindungstasche

Die Induktorkomplexe $[\text{Ni-7ClTc}]$, $[\text{Mg-9NO}_2\text{Tc}]$ und $[\text{Mg-9glyTc}]$ sind jeweils in hellgrau, dunkelgrau bzw. schwarz dargestellt. Ihre relativen Positionen wurden nach Überlagerung der Hauptkettenatome der Repressordimere ermittelt. Alle drei Tc-Analoga sind über Wasserstoffbrücken mit Ring A an TetR^D gebunden (in der Abb. sind nur die Wasserstoffbrücken zum His64 gezeigt). Hier stimmen die Positionen der drei Tetrazykline am besten überein. Das zweiwertige Kation wird an His100 und an Tc koordiniert. Die anderen drei Liganden der Kationenbindungsstelle (drei Wassermoleküle) sind hier nicht gezeigt. Zwei dieser Wassermoleküle werden durch Glu147' gebunden. Die Seitenkette dieser Aminosäure hat in den Kristallstrukturen mit $[\text{Ni-7ClTc}]$ und $[\text{Mg-9NO}_2\text{Tc}]$ dieselbe Orientierung wie in 2TCT. Dagegen ist die Seitenkette von Glu147' in TetR^D/ $[\text{Mg-9glyTc}]_2$ um 90° rotiert und stimmt mit ihrer Orientierung in dem freien TetR überein. Diese Rotation ist die Folge der unvollständigen Bindung dieses Tc-Analogons. Aufgrund sterischer Interaktionen von TetR-Seitenketten mit Substituenten an Tc-Position 6 und dem Chloratom in Position 7 ist das 7ClTc relativ zum 9NO₂Tc rotiert. Im Fall des 9glyTc ist ebenfalls eine solche Rotation zu beobachten. Die Ursache dafür ist in Abb. 36 gezeigt.

und D, die sich relativ zur Magnesiumkoordinationstelle bewegt. Diese Bewegung verursacht eine Verbiegung der oktaedrischen Kationenbindungsstelle, so daß die Seitenkette von Glu147' um 90° rotiert. Dabei gehen die Wasserstoffbrücken jeweils von dem Peptidamid Gly102 und einem Wassermolekül des Mg²⁺-Oktaeders zum Glu147' verloren. Dieser Effekt verringert die Bindungseffizienz des $[\text{Mg-9glyTc}]$, da die starre Induktorbinding nicht vollständig erreicht wird.

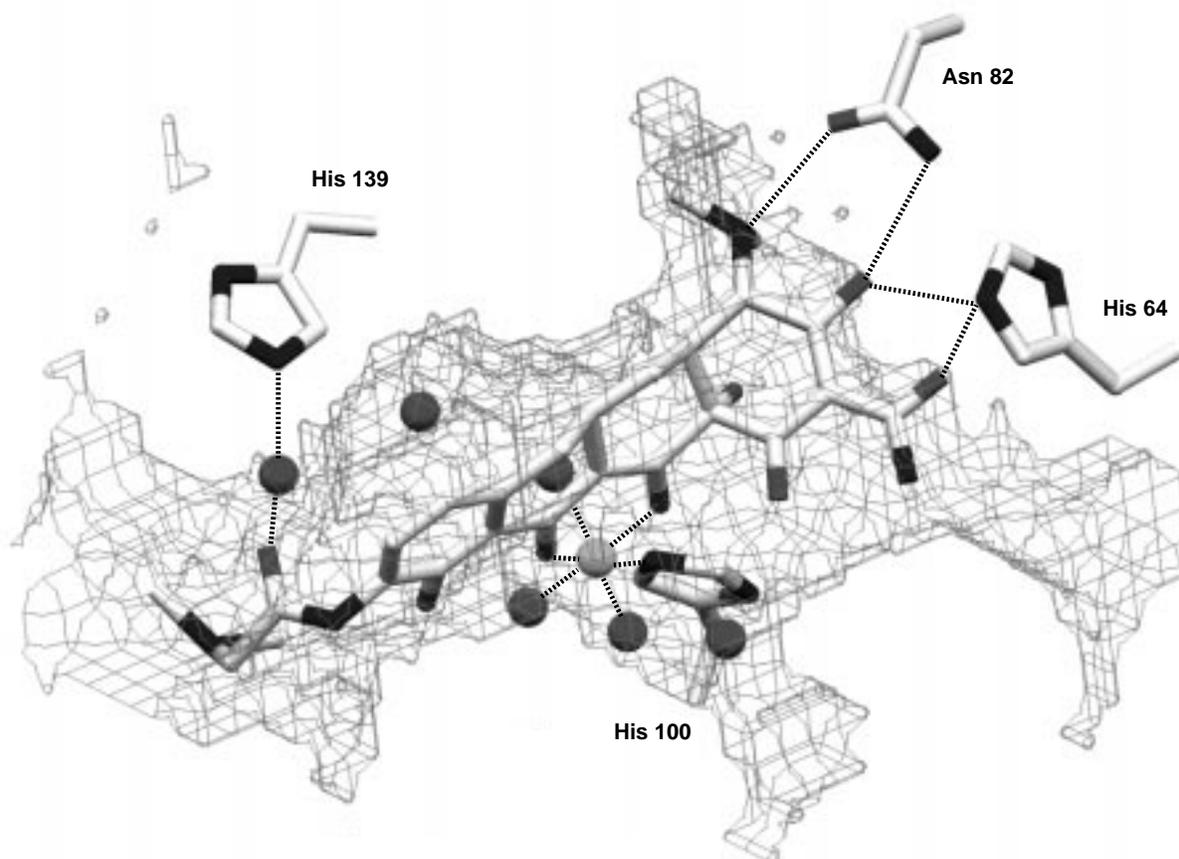


Abbildung 35: Der Induktorbindungskanal des TetR^D[Mg-9glyTc]₂

Das Volumen des Bindungskanals, in dem sich das Tc-Analogon mit dem sperrigen Substituenten an Position 9 befindet, wurde mit dem Programm VOIDOO⁸³ berechnet. Die Oberfläche der Bindungstasche ist hier als Netz dargestellt. Die Bindungstasche wird durch den Induktor und sechs Wassermoleküle vollständig ausgefüllt. Ihr Volumen beträgt 600 Å³, 33 % mehr als die Bindungstasche von 2TCT, wo ein [Mg-7ClTc]⁺ gebunden ist. Die dunklen Kugeln stellen Wassermoleküle dar, das sechsfach-koordinierte Mg²⁺ ist als helle Kugel präsentiert. Gestrichelte Linien symbolisieren Wasserstoffbrücken bzw. Ligandenkoordination des Mg²⁺.

- Die terminale Dimethylaminogruppe in Position 9 ist nach Protonierung positiv geladen. Sie interagiert mit der Guanidiniumgruppe von Arg104 und verschiebt sie so, so daß die Salzbrücke zwischen Arg104 und Asp178' geschwächt ist (siehe Abb. 36, oben). Ein wichtiger Schritt des Induktionsmechanismus, der Schließvorgang der

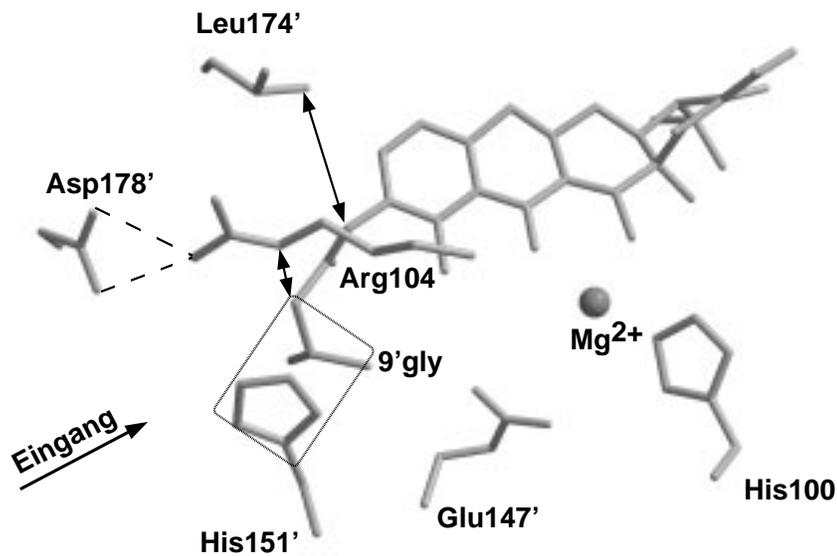
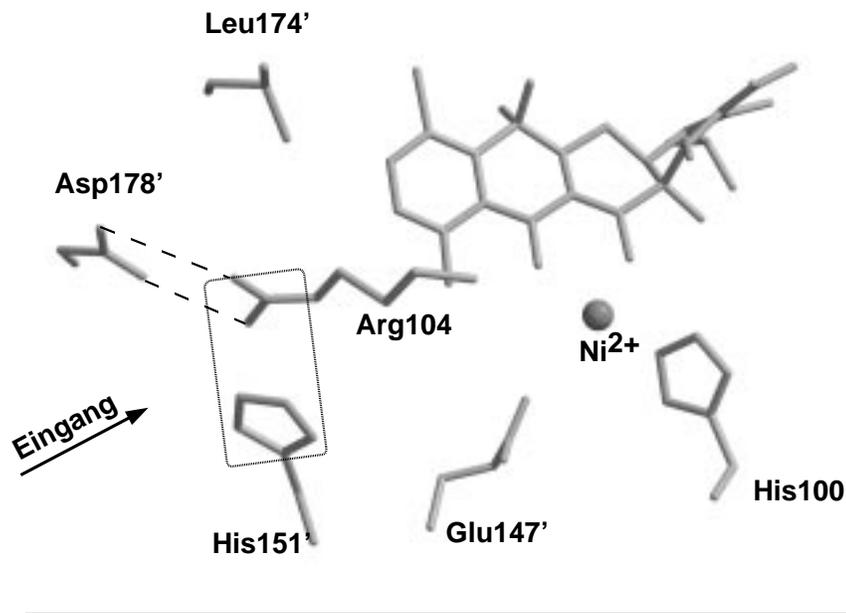


Abbildung 36: Einfluß des Substituenten in Position 9 von 9glyTc auf die Lage des Tc
 Dargestellt sind die Bereiche der Bindungstasche der TetR^D Kristallstrukturen mit [Ni-7ClTc]
 (oben) und [Mg-9glyTc] (unten). Die 9-(N,N-dimethyl-glycyl-amido)-Gruppe des 9glyTc ist in
 Van-der-Waals-Kontakt mit den Seitenketten von Arg104 und Leu174', die von dem Substituen-
 ten verschoben werden (als Doppelpfeile gekennzeichnet). Dadurch wird einerseits die Salzbrücke
 zwischen Arg104 und Asp178' gestört und andererseits wird durch die Verschiebung der hydro-
 phoben Seitenkette von Leu 174' der Eingang zur Bindungstasche geöffnet. Die Dimethylami-
 nogruppe ist halbseitig Solvens-exponiert und bildet eine Wasserstoffbrücke zum Imidazol-Ring
 des His151', der im Fall von 2TCT mit der Guanidiniumgruppe des Arg104 stapelt. Beide Wech-
 selwirkungen mit His151' sind eingerahmt.

Induktorbindungstasche, wird damit gestört. Im Gegensatz zur 2TCT⁷⁹ Struktur kann die Bindungstasche nicht vollständig geschlossen werden, da die terminalen Dimethylaminogruppen teilweise aus der Tasche herausragen und Solvens-exponiert sind. Der unvollständige Verschluß der Bindungstasche verringert ebenfalls die Bindungskonstante.

4.7.2 Eingang der Tetrazyklin-Bindungstasche

Der Eingang des Bindungskanals in dem freien TetR^D ist 81 Å² groß. Die Öffnung am anderen Ende des Tunnels ist mit 45 Å² deutlich kleiner. Nach Induktion wird die große Öffnung geschlossen, so daß der Eingang nur noch 44 Å² groß ist. Die Verengung des Einganges wird durch strukturelle Veränderungen des Repressors ermöglicht. Die Helix 9 und die Schleife zwischen den Helizes 6 und 7 bewegen sich zu der Eintrittsstelle um jeweils 2.4 und 2.9 Å. Dabei wird eine Salzbrücke zwischen Arg104 und Asp178' gebildet (siehe Kapitel 4.9.2).

In dem freien TetR^D bleibt die Position der Seitenkette von Asp178' relativ zur Helix 9' unverändert und kann in der Elektronendichte lokalisiert werden, dagegen ist die Seitenkette von Arg104 fehlgeordnet und wird erst durch Induktion und Bildung der Salzbrücke stabilisiert. Die Aminosäure Arg104 befindet sich in einer hydrophoben Umgebung. Da sich keine anderen Wasserstoffbrückenakzeptoren in der Nähe befinden, wird die Affinität zu der sauren Aminosäure Asp178' erhöht, um die positive Ladung der Guanidiniumgruppe zu kompensieren.

Vor dem Schließen des Einganges des Bindungskanals ist der Bereich um den Eingang flexibler als in 2TCT⁷⁹. Die Flexibilität ist insbesondere für die Helix 9 und für den Schleifenbereich vor Helix 7 und den N-Terminus dieser Helix zu beobachten (siehe Abb. 18). Die Temperaturfaktoren für diese Aminosäuren liegen im Bereich von 90 bis 110 Å², während sie im induzierten Zustand nur 30 bis 70 Å² betragen. Dies entspricht für die jeweiligen Atome einer relativen Auslenkung von bis zu 1.2 Å im freien TetR^D und 0.9 Å im induzierten TetR^D.

4.7.3 Der Kanal für verdrängtes Wasser

Die Bindungstasche hat im induzierten Zustand (2TCT⁷⁹) eine Größe von 450 Å³ (berechnet mit VOIDOO⁸³). Das Volumen wird von dem Induktor und 6 Wassermolekülen ausgefüllt. In der freien Struktur ist die Bindungstasche mit 720 Å³ 1.6 mal so groß. Dieses Volumen kann mit ca. 64 Wassermolekülen ausgefüllt werden (berechnet mit FLOOD⁸³). Diese Menge an Wasser muß während der Induktion effektiv und schnell aus der Bindungstasche gelangen. Der Weg durch den Eingang ist sehr unwahrscheinlich, da die

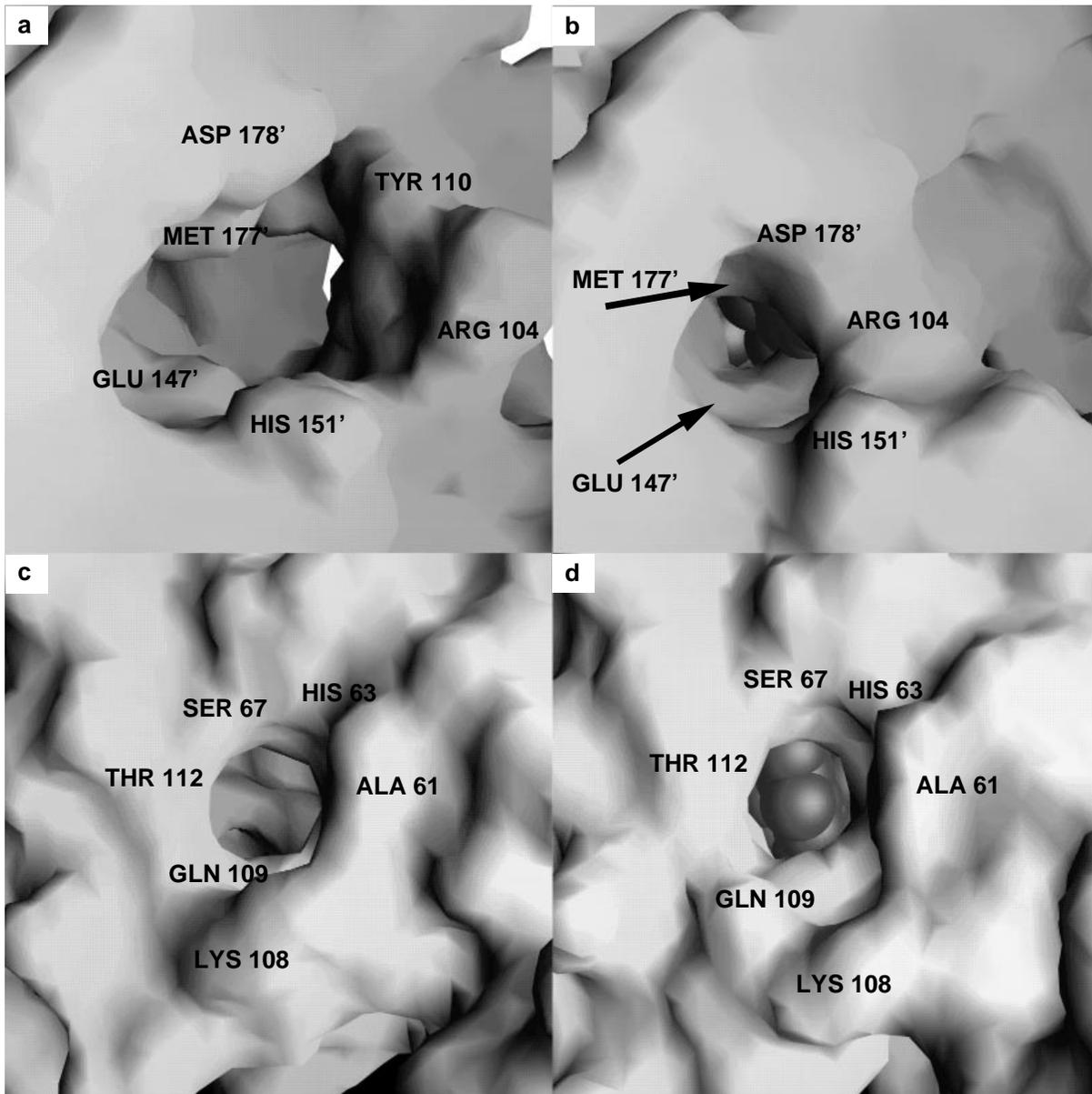


Abbildung 37: Eingänge des Bindungskanals

Die Größe des Einganges zur Bindungstasche verringert sich nach dem Übergang von der freien (a) zur induzierten Form (b). Der Kanal, durch den das Solvens die Bindungstasche während der Induktion verläßt, ändert sich nicht bei Induktorbindung (c und d). Der Bereich um die Öffnungen wurde als van-der-Waals Oberfläche mit dem Programm GRASP¹¹⁵ dargestellt. Die Positionen der Aminosäuren um die beiden Öffnungen sind angedeutet.

Öffnung ungefähr dem Querschnitt des Induktors entspricht und bei Tc-Insertion vermutlich keinen Freiraum läßt. Daher kommt nur die zweite, kleinere Öffnung am anderen Ende des Tunnels in Frage (siehe Abb. 37). Diese Öffnung verändert sich während der Induktion nicht. Sowohl ihr Durchmesser, als auch die thermalen Parameter der umliegenden Aminosäureatome bleiben nach Bindung des Tc identisch bzw. vergrößern sich nur unwesentlich. Die Öffnung befindet sich in einem Bereich, in dem die Schleife anschließend

an Helix 4 durch die mittleren Bereiche der Helizes 5 und 7 eingefasst wird. Die Öffnung selbst wird von den der Schleife C-terminal zu Helix 4 und dem mittleren Teil von Helix 7 eingeschlossen. Dieser Bereich des Proteins ist relativ unbeweglich. Es erscheint demnach sehr wahrscheinlich, daß durch diesen fixierten Kanal das Wasser freigesetzt wird.

4.7.4 Strukturänderung bei Induktorbindung

In diesem Kapitel werden nur die Aminosäuren in dem Bindungskanal besprochen, die von der Bindung des Induktors betroffen sind.

Vergleicht man nach Überlagerung der Atomkoordinaten von freiem und induziertem TetR^D die Induktorbindungstaschen, so sind Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu beobachten (siehe Tabelle 9). Schematisch lassen sich diese Veränderungen so erklären, daß diejenigen Seitenketten, die direkte Wasserstoffbrücken zum Induktor [Tc/Mg] ausbilden, relativ fixiert sind. Seitenketten, die Wasserstoffbrücken zum Induktor über Wassermoleküle aufbauen, sind beweglich; insbesondere Thr 103 führt als erste Aminosäure hinter der sich entwindenden Helix 6 die größte Bewegung aus. Die Aminosäuren der hydrophoben Seite, insbesondere die der Helix 9, bewegen sich ebenfalls während der Induktion.

Für die Funktion des TetR^D sind insbesondere die drei Aminosäuren zur Koordination des Tc wichtig (His64, Asn82, Gln116). In allen TetR-Strukturen sind die Seitenketten dieser drei Aminosäuren diejenigen, die sich am wenigsten verändern. Sie stellen die Verankerungspunkte für den Induktor dar, wenn das Antibiotikum in die Bindungstasche gelangt. Die drei Aminosäuren sind weniger für die Übertragung des Induktionssignales als für die korrekte Bindung des Induktors verantwortlich.

Neben dieser Gruppe von Aminosäuren lassen sich die hydrophoben Aminosäuren und diejenigen, die das Mg²⁺ koordinieren, in zwei weitere separate Gruppen fassen. Die Funktion der einzelnen Gruppen wird im Kapitel 4.8.2 genauer analysiert.

4.8 Die Magnesiumkoordinationsstelle

Beim Induktionsprozeß werden zwei Komplexe [MgTc]⁺ an den Repressor gebunden. Auf Grund der Konzentrationsverhältnisse in der bakteriellen Zelle wird angenommen, daß die Rolle des Kations von einem Magnesiumion übernommen wird. Der Induktor [MgTc]⁺ besitzt eine einfach positive Ladung und wird auch in dieser Form von dem membranständigen Effluxprotein TetA erkannt und aus der Zelle ausgeschleust¹⁷⁹. Takahashi und Mitarbeiter konnten zeigen, daß der Repressor Tc nur im Komplex mit dem zweiwertigen Metallkation bindet¹⁶¹. In der Abwesenheit von zweiwertigen Metallionen wird der Repressor durch Tc weder gebunden noch induziert.

Das zweiwertige Kationen (Mg^{2+} bzw. Ni^{2+}) koordiniert oktaedrisch. Im Zentrum befindet sich das Metallion und an den sechs Eckpunkten der Imidazolring von His100, 3 Wassermoleküle und die beiden Sauerstoffatome O11 und O12 vom Tetrazyklin (siehe Abb. 38). In der Struktur 2TCT ⁷⁹ betragen die Abstände der Ligandenatome zum

Tabelle 9: Induktor-Repressor-Kontakte

Übersicht über die Aminosäuren der Induktorbindungstasche. Für die Berechnung der Abweichung zwischen dem induziertem und dem nichtinduzierten TetR^D wurden die Atompositionen der jeweiligen Aminosäuren der Strukturen 2TCT und des freien TetR^D verglichen. (Abstände in Ångström)

Aminosäure	Position	Kontakt	rms. in Å
His64	$\alpha 4$	3-Zentrum-Wasserstoffbrücke zum Carbonylsauerstoff in Pos. 2 und zur Enolgruppe in Pos. 3	0.6
Asn82	$\alpha 5$	Zwei Wasserstoffbrücken zur Enolgruppe in Pos. 3 und zur Dimethylaminogruppe in Pos. 4	0.3
Phe86	$\alpha 5$	Wasserstoffbrücke zwischen dem π -System des Phenylringes und der Hydroxylgruppe in Pos. 1C	0.2
His100	$\alpha 6$	Koordination des Mg^{2+} durch N ϵ	0.5
Thr103	$\alpha 6$ - $\alpha 7$	Wasserstoffbrücke zum Wasser W3 des Mg^{2+} -Oktaeders	2.8
Arg104	$\alpha 6$ - $\alpha 7$	Wasserstoffbrücke zur Hydroxylgruppe in Pos. 10	3.4
Pro105	$\alpha 6$ - $\alpha 7$	Hydrophober Kontakt zu den Ringen C und D	2.6
Val113	$\alpha 7$	Van-der-Waals-Kontakt zur Hydroxylgruppe in Pos. 6	0.8
Gln116	$\alpha 7$	3-Zentrum-Wasserstoffbrücke zum Carbonylsauerstoff in Pos. 2 und zur Enolgruppe in Pos. 3	0.3
Leu117	$\alpha 7$	Hydrophober Kontakt zum Ring C und D	0.3
Leu131	$\alpha 8$	Hydrophober Kontakt zum Ring D	0.3
Ile134	$\alpha 8$	Hydrophober Kontakt zum Ring B und C	0.2
Ser138	$\alpha 8$	Van-der-Waals-Kontakt zur Dimethylaminogruppe in Pos. 4	0.2
Glu147'	$\alpha 8'$	Zwei Wasserstoffbrücken zu den Wassern W1 und W2 des Mg^{2+} -Oktaeders	0.5
Leu170'	$\alpha 9'$	Hydrophober Kontakt zum Ring D	2.1
Leu174'	$\alpha 9'$	Hydrophober Kontakt zum Ring D	2.1
Met177'	$\alpha 9'$	Hydrophober Kontakt zum Ring D	1.7

Magnesium zwischen 1.7 und 2.2 Å (siehe Tab. 10). Es handelt sich also um einen leicht unregelmäßigen Oktaeder. Hierbei muß aber berücksichtigt werden, daß sich die Liganden hinsichtlich Partiaalladung und Atomradius unterscheiden und daher ein regulärer Oktaeder gar nicht gebildet werden kann.

Der Austausch von Mg^{2+} gegen Ni^{2+} wurde aus zwei Gründen vorgenommen. Zum einen wählte C. Krafft für seine spektroskopischen Arbeiten^{86, 87} aus technischen Gründen NiCl_2 anstelle des MgCl_2 . Außerdem sollten eventuelle Unterschiede zu der Struktur mit Magnesium untersucht werden. Ni^{2+} kommt in einigen Enzymen¹⁶⁸ als Teil des aktiven Zentrums vor, und ist in diesen Strukturen in unterschiedlicher Weise koordiniert. In dem Enzym Methyl-Coenzym M Reduktase besitzt das Ni^{2+} eine optimale oktaedrische Koordination⁴⁴. In dem Enzym Urease bilden die Liganden der beiden Nickelionen des binuklearen Zentrums jeweils eine pseudotetragonale bzw. eine unregelmäßige trigonale bipyramidale Koordination^{70, 127}. Im Fall des Proteins Azurin wurde ein unregelmäßiger Tetraeder beobachtet¹⁷. In der Ni-Fe-haltigen Hydrogenase aus *Desulfovibrio gigas* wird von den Autoren eine quadratisch-pyramidale Koordination vorgeschlagen¹⁶⁹.

Das Mg^{2+} läßt sich sehr leicht gegen Ni^{2+} austauschen, da Ni^{2+} eine höhere Bindungskonstante zum Tc und $[\text{Ni-7HTc}]$ eine höhere Affinität zu TetR besitzt¹¹⁹. Die Vollständigkeit des $\text{Mg}^{2+}/\text{Ni}^{2+}$ -Austauschs läßt sich röntgenographisch anhand der Elektronendichte zeigen. In der Struktur mit Mg^{2+} (10 Elektronen pro Kation) befindet sich an der Kationbindestelle eine Dichte von 5.5 Standardabweichungen über dem mittleren Dichteniveau, während in der Struktur mit Ni^{2+} (24 Elektronen pro Kation) der Wert 12.0 beträgt. Das bedeutet, daß 83 % der Magnesiumionen ausgetauscht wurden. Der

Tabelle 10: Abstände der Ligandenatome vom Zentralatom in 2TCT im $\text{TetR}^D/[\text{Ni-7ClTc}]_2$

Das Mg^{2+} wurde mittels Inkubation der Kristalle von $\text{TetR}^D/[\text{Mg-7ClTc}]_2$ in einer NiCl_2 -haltigen Mutterlauge gegen Ni^{2+} substituiert. (Abstände in Ångström)

Ligand	$\text{TetR}^D/[\text{Mg-7ClTc}]_2$	$\text{TetR}^D/[\text{Ni-7ClTc}]_2$
N ϵ His100	2.2	2.0
O11	2.0	2.2
O12	1.7	1.9
W1	1.9	2.0
W2	2.1	1.7
W3	1.9	1.7

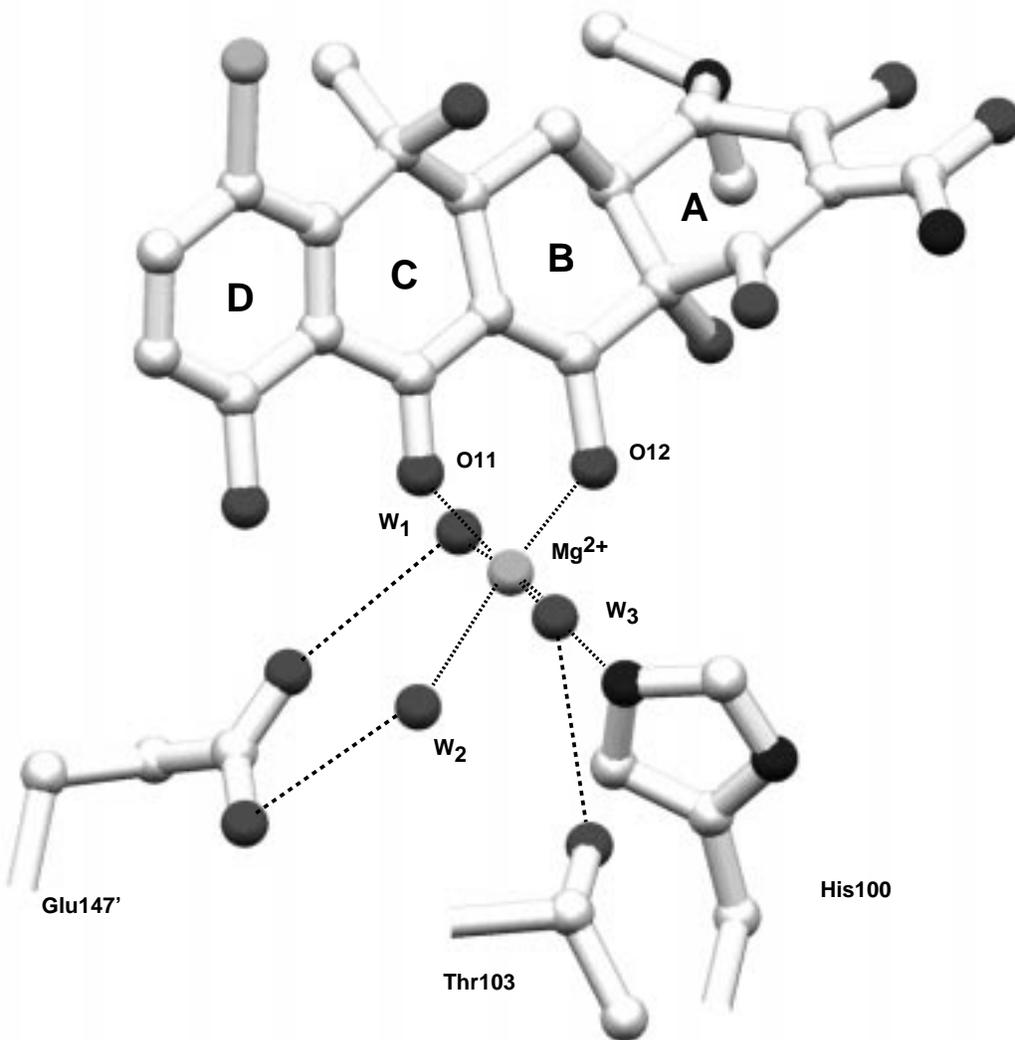


Abbildung 38: Koordination des Magnesiums im induzierten TetR^D.
Abgebildet sind: das Tc (oben), 3 Wassermoleküle (dunkle Kugeln), das Mg²⁺ (helle Kugel) und drei Aminosäuren des TetR^D. Das Magnesiumion befindet sich in einer oktaedrischen Koordinationssphäre, die durch His100N ϵ , O11 und O12 des Tc sowie durch drei Wassermoleküle gebildet wird.

Mg²⁺/Ni²⁺ Austausch des Kations im induzierten TetR^D wirkt sich nicht auf die Koordination des Kations aus. Bei der vorliegenden Auflösung liegen die Unterschiede zwischen den beiden Kationenbindungsstellen unterhalb des experimentellen Fehlers (0.25 Å, nach Luzatti¹⁰⁴ berechnet).

Das Magnesiumion läßt sich auch durch andere zweiwertige Kationen substituieren⁶⁷. Hierbei sind solche Kationen besonders effektiv, die den mittelstarken Lewis-Säuren

angehören⁹⁴. Diese Metalle sind meistens Übergangsmetallen, welche eher dazu neigen, oktaedrische Komplexe zu bilden als Magnesium. Um zu untersuchen, wie wichtig die oktaedrische Anordnung in TetR ist, wurde das Magnesiumion aus dem induzierten Repressor TetR^D[Mg-7ClTc]₂ mit dem Chelator EDTA entfernt und die Positionen der ehemaligen Liganden untersucht.

4.8.1 Der Magnesium-freie Repressor

Kristalle des induzierten Repressors TetR^D[Mg7ClTc]₂ wurden eine Woche in Reservoirlösung gewaschen, die zusätzlich 25 mM EDTA enthielt. Höhere Chelatorkonzentrationen führen zur vollständigen Zerstörung der Kristalle⁶⁶. Die Qualität der Kristalle leidet unter der Magnesium-Abtrennung, wie die Statistik der Diffraktionsdaten widerspiegelt (siehe Tab. 6). So verschlechterte sich die Auflösung von 2.1 auf 2.4 Å und der Wilson-B-Faktor erhöhte sich von 30 auf 60 Å².

Die Atomkoordinaten der Hauptkette des Dimers lassen sich mit einer rms Abweichung von 1.0 Å auf den induzierten Repressor (2TCT⁷⁹) und von 0.5 Å auf den freien Repressor (TetR^D) überlagern. Der Abstand der Erkennungshelizes beträgt 40.6 Å. Das entspricht, wie die gesamte Struktur, den Ergebnissen mit nichtinduziertem TetR^D. Die Sekundärstrukturänderungen, die bei der Induktion stattfinden, sind nicht mehr zu beobachten. Die Helizes 6 und 7 haben, wie in der freien Struktur, die volle Länge von Gly96 bis Gly102 und von Glu107 bis Glu122. Der Bereich anschließend an His 151, der in den nicht-induzierten Strukturen nicht modelliert werden konnte, zeigt auch hier keine interpretierbare Elektronendichte.

Die Entfernung des Kations aus der Bindungstasche überführt also den induzierten TetR^D in den nichtinduzierten Zustand. Es finden dabei dieselben Strukturänderungen statt, die zwischen freiem und induziertem TetR^D beobachtet wurden, d. h. die Helizes 1 bis 4 und 9 bewegen sich. Dies führt zur Auflösung und Neubildung einiger Kristallkontakten, was sich in der Verschlechterung der Kristallqualität widerspiegelt.

4.8.2 Die Tetryklinposition

Das 7ClTc befindet sich in der Mg²⁺-freien Struktur in der Bindungstasche und wird durch die Seitenketten His64, Asn82, Gln116 am Tc-Ring A koordiniert. Aufgrund des fehlenden Kations bestehen zwischen TetR^D und den 7ClTc-Ringen B, C und D nur Van-der-Waals Kontakte zur hydrophoben Seite, die dazu führen, daß das 7ClTc im Vergleich zu seiner Position in 2TCT⁷⁹ gedreht ist, wie in Abb. 39 mit einem Pfeil angedeutet. In Gegenwart von Mg²⁺ wird das 7ClTc gegen die hydrophoben Kontakte "gedrückt". Da aber das Mg²⁺ fehlt, bewegt sich das 7ClTc zur Kationenbindungsstelle hin. Diese Bewegung wurde

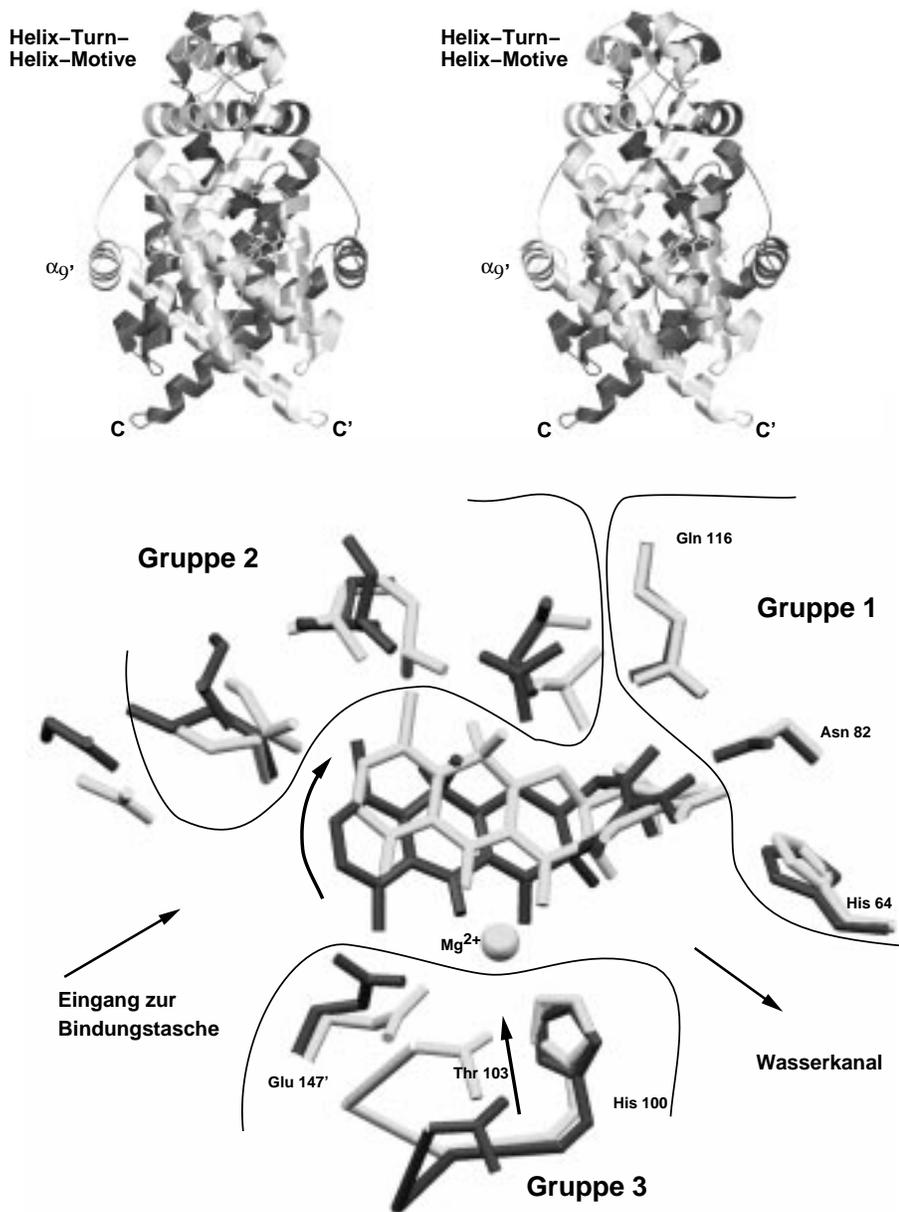


Abbildung 39: Rotation des Tc-Moleküls in Abwesenheit des Kations

In der oberen Stereodarstellung ist der induzierte Repressor entsprechend der unteren Darstellung orientiert. Die nach links zeigende Helix α_9' ist Bestandteil der Gruppe 2 in der unteren Darstellung.

Die Strukturen 2TCT⁷⁹ (grau) und die Form 12 (mit 7Cltc, aber ohne Mg^{2+} ; schwarz) sind überlagert und die für die Induktorbindung wichtigen Aminosäuren dargestellt. Sie lassen sich in drei Gruppen zusammenfassen. Die erste Gruppe ist für die Tc-Bindung verantwortlich, die zweite für die Ausbildung der hydrophoben Tasche und die dritte für die Erkennung des zweiwertigen Kations. Die Ausbildung des oktaedrischen Kationkomplexes ist für die Induktion essentiell, da die beiden Aminosäuren His100 und Thr103 durch Komplexbildung die Struktur der Helix 6 verändern.

auch in der Struktur des TetR^D mit dem Tc-Analogon 9glyTc beobachtet, das wegen der Sperrigkeit des Substituenten an Position 9 in der Bindungstasche eine Position einnimmt, die nicht der optimalen Induktorposition entspricht.

Die Strukturen des 7CITc-gebundenen TetR^D mit und ohne Magnesiumion in der Bindungstasche erlauben Spekulationen über den Bindungsmodus des Induktors. Ein solches Modell ist deshalb notwendig, da auf dessen Grundlage ein Induktionsmechanismus des DNA-gebundenen TetR entwickelt werden kann, der die im Kapitel 4.5 beschriebene Translation der Helix 6 mit der Mg²⁺-koordinierenden Aminosäure His100 1.5 Å erklärt. Diese Verschiebung tritt nur bei der Induktion des DNA-gebundenen TetR auf und wird durch den koordinierten [MgTc]⁺-Komplex erzwungen.

In dem Mg²⁺-freien TetR^D ist das 7CITc so orientiert, daß die lange Achse des Tc-Gerüsts zur Öffnung des Kanals gerichtet ist. Wenn es also vom Repressor dissoziiert, ist es sehr wahrscheinlich, daß es durch eine Translation entlang der langen Tc-Achse aus der Bindungstasche gelangt. Die Induktorbindung verläuft höchstwahrscheinlich entgegengesetzt der Dissoziation des 7CITc vom TetR[7CITc]₂. Die Induktorbindung gliedert sich demzufolge in zwei Schritte. Zuerst translatiert der Induktor [MTc]⁺ in die Bindungstasche, wird dort durch die Wasserstoffbrücken verankert und rotiert (siehe Abb. 39) im zweiten Schritt um diese Verankerung, wobei das Tc mit den Seitenkette der Helix 9 die hydrophobe Tasche ausbildet.

4.8.3 Der halbinduzierte Repressor

Wie sich aus Kapitel 4.8.1 ergibt, führt ein großer Überschuß an EDTA zur vollständigen Dissoziation des Magnesiumions aus dem Komplex des induzierten TetR^D. Äquimolare Verhältnisse zwischen dem TetR-gebundenen Kation und dem Chelator sollten dagegen einen bestimmten Anteil des Magnesiums in der Bindungstasche belassen. Darum wurde TetR^D nach Inkubation mit einem 5-fachen Überschuß des Induktors Mg-7CITc beim Kristallisationsansatz mit einer Reservoirlösung gemischt, die zusätzlich EDTA enthielt. Im Kristallisationstropfen betrug der molare Überschuß von EDTA gegenüber Mg²⁺ 4.3 mol. Diese Kristallisationsbedingungen unterscheiden sich von denen des Mg²⁺-freien TetR/7CITc-Komplexes, da der kristallisierende Komplex bereits gegen EDTA-Lösung equilibriert war und nicht erst die Kristalle mit EDTA-Lösung behandelt wurden.

Die resultierenden Kristalle zeigen ein anderes Beugungsmuster als die freien und induzierten Repressoren. TetR^D kristallisiert unter den eben beschriebenen Bedingungen in der Raumgruppe P4₃2₁2. Die beiden Monomere unterscheiden sich in der Besetzung der Induktorbindungstaschen. In beiden ist 7CITc zu 100 % vorhanden. Aber nur ein Monomer ist induziert, mit einer 50 %-igen Besetzung der Mg²⁺-Position, das andere

Monomer ist nicht induziert.

Die Strukturen der beiden Monomere lassen sich jeweils mit der Struktur des induzierten (2TCT⁷⁹) bzw. mit der des Mg²⁺-freien TetR^D (Form 12) überlagern, wobei die Helizes 9 von der Überlagerung ausgeschlossen wurden, da sie im TetR-Dimer von dem entsprechenden Monomer räumlich getrennt sind (siehe Stereoabbildung in Abb 39). Die Hauptkettenatome der entsprechenden Monomere stimmen mit einer rms Abweichung von 0.3 Å (induziertes Monomer) bzw. 0.5 Å (nicht-induziertes Monomer) überein.

Bei der Entfernung des Mg²⁺ aus dem induzierten TetR^D wird das Kation bevorzugt aus einer Bindungstasche des symmetrischen Homodimers isoliert. Es wäre auch möglich, daß das Kation aus beiden Bindungstaschen zu gleichen Teilen dissoziiert und die Kristallstruktur ein Mittel zwischen der Mg²⁺-freien und 2TCT⁷⁹ darstellt; die beide Monomere wären dann identisch. Die Tatsache, daß jedoch bevorzugt ein halb-induzierter TetR^D vorliegt, deutet darauf hin, daß der Induktionsprozeß schrittweise und nicht kooperativ verläuft.

4.9 Strukturanalyse von Punktmutanten

Der Induktionsmechanismus sollte auch anhand von Kristallstrukturen einiger Punktmutanten analysiert werden. Dazu wurden die Mutanten G102R, P105T, L146F und D178G kristallisiert, deren Induktionsdefizienzen verschiedenen Bereichen der möglichen Signaltransduktion zugeordnet werden können. Die Kristallisation war für G102R, P105T und D178G erfolgreich; die Strukturen von P105T und D178G konnten mit und ohne Induktor analysiert werden. Von L146F konnten nur Mikrokristalle erhalten werden. Das Kristallisationsexperiment von L146F wird im Kapitel 5.4 analysiert. Eine Kristallstrukturanalyse von G102R wurde nicht vorgenommen, da der Induktionsdefekt dieser Mutation schon mit Hilfe des Strukturvergleichs von freiem und induziertem TetR^D interpretiert werden konnte (siehe dazu Kapitel 4.4)

4.9.1 Die Struktur von Pro105Thr

Die Aminosäure Prolin führt als Bestandteil einer Oligopeptidkette wegen ihres aliphatischen Ringsystems zu einer eingeschränkten Beweglichkeit und kann mit dem Peptidstickstoff keine Wasserstoffbrücken ausbilden. Im Gegensatz zu den anderen Aminosäuren sind bei Prolinen die erlaubten Bereiche im Ramachandran-Diagramm¹¹¹ auf ca. 25 % reduziert. Pro105 ist Teil der Tetrazyklinbindungstasche. Nach der Induktion stehen die Methylengruppen des Prolinringes im Van-der-Waals-Kontakt mit den Tc-Ringen C und D. Dabei wird das Tc senkrecht zum Tetracengerüst fixiert. Während der Induktion trans-

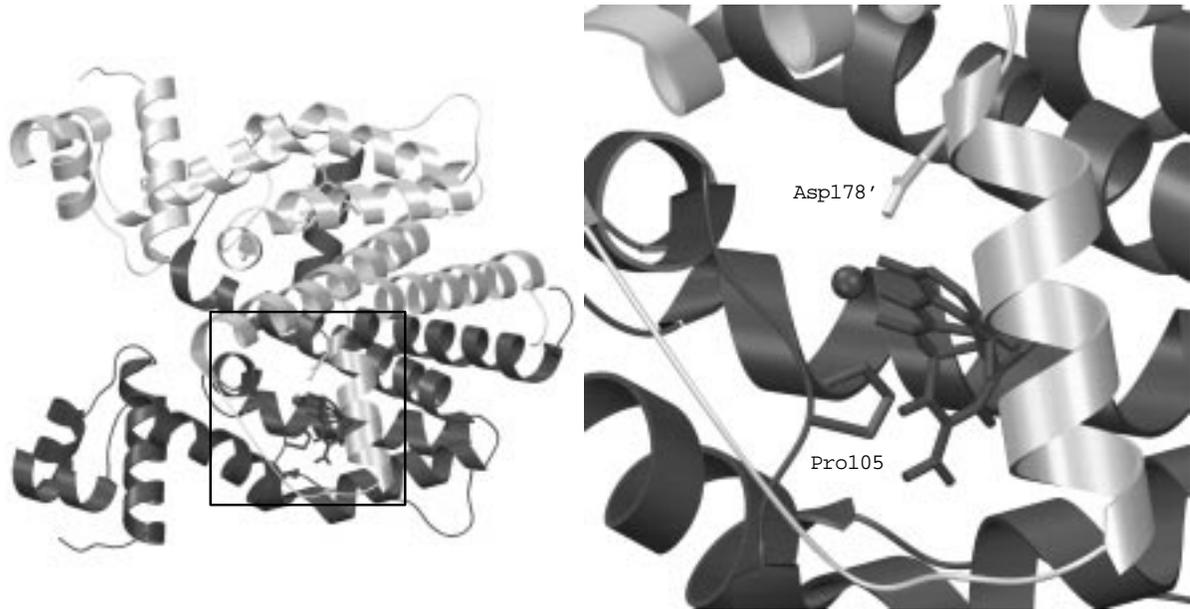


Abbildung 40: Lokalisierung der mutierten Aminosäuren Pro105 und Asp178
 Die Aminosäuren Pro105 und Asp178' sind Teil einer Induktorbindungstasche. Pro105 bildet hydrophobe Kontakte zum Tc und Asp178' befindet sich am Eingang zur Bindungstasche. Dieser Bereich ist in der rechten Abbildung gezeigt. In der linken Abbildung ist der Ausschnitt der rechten Abbildung mit einem schwarzen Viereck gekennzeichnet.

latiert Pro105 um 2.6 \AA . Es ist eines der Verknüpfungspunkte zwischen Helix 6, die durch Induktion partiell entwunden wird, und Helix 7, deren N-terminale Windung sich von einer regulären α -Helix in eine 3_{10} Helix umwandelt (siehe Kapitel 4.4). Die eingeschränkte Induzierbarkeit der Mutante P105T kann zwei Ursachen haben. Zum einen können nach Tc-Bindung keine ausreichenden hydrophoben Kontakte zum Tc etabliert werden, zum anderen kann die Induktionsinformation nicht mehr von Helix 6 zu 7 oder in umgekehrter Richtung geleitet werden.

In dem Induktor-freien TetR^D(P105T) ist der Bereich um die Position 105 sehr flexibel und lässt sich nicht modellieren. Bei Induktorbindung bildet das Thr105 hydrophobe Kontakte zum 7CITc. Der Induktor wird aber weniger fixiert als in dem induzierten Wildtyp TetR^D, so daß das 7CITc beweglich bleibt und sich das Kation (Mg^{2+}) wegen Dissoziation vom Komplex nicht mehr in der Induktorbindungstasche befindet. Aus diesem Grund ist die Helix 6 nicht entwunden und der Repressor nicht induziert. Die Struktur stimmt mit der des Mg^{2+} -freien Tc-gebundenen TetR^D (Form 12) überein.

Außer der Entwindung der Helix 6 findet bei der Induktion des Wildtyp TetR auch die teilweise Umwandlung der α -Helix 7 in eine 3_{10} -Helix (die erste helikale Windung) statt. Bei dem 7CITc-gebundenen TetR^D(P105T) ist am N-Terminus von Helix 7 eine Strukturänderung zu beobachten. Es bildet sich zwar nicht die 3_{10} -Helix wie bei der In-

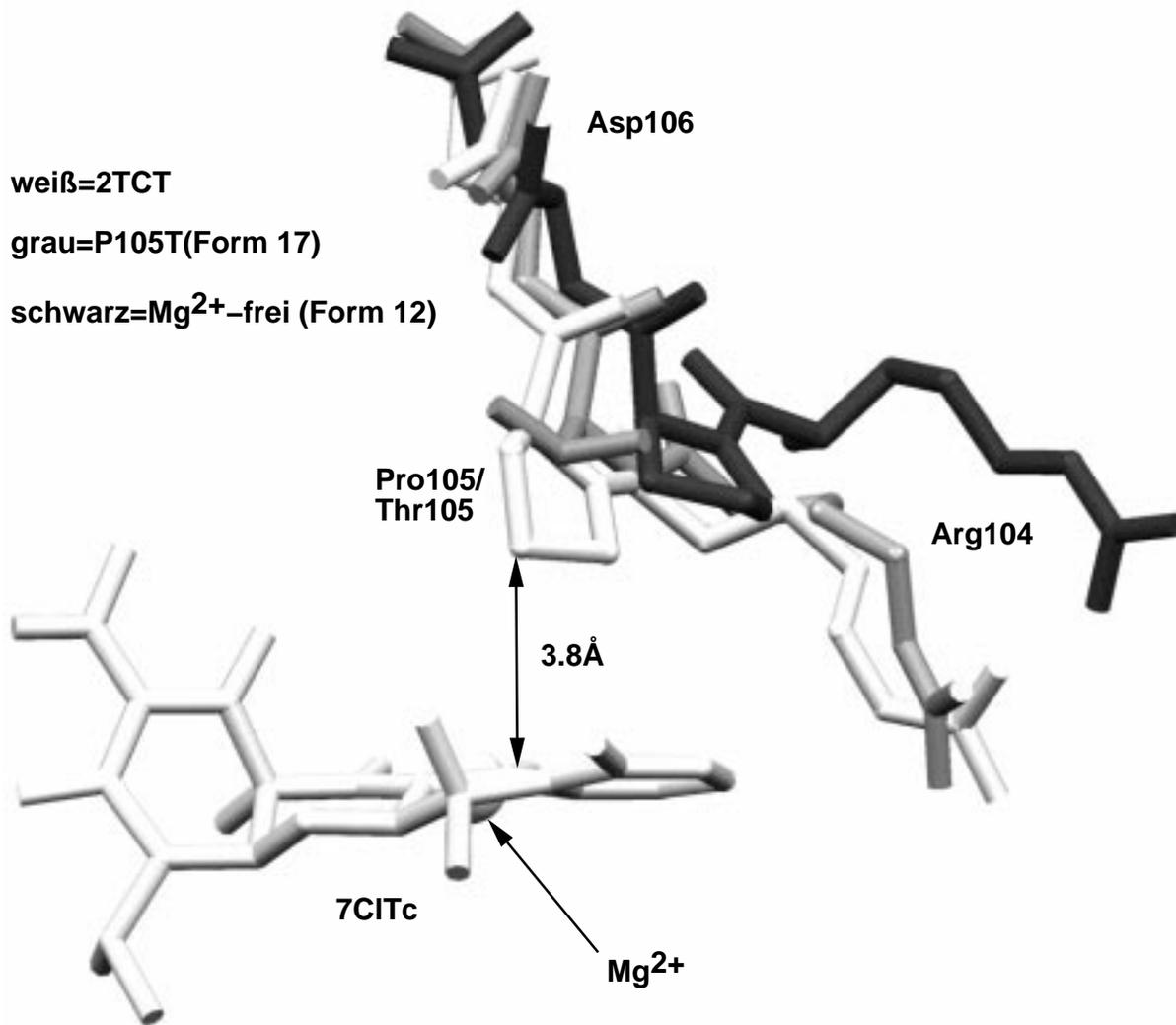


Abbildung 41: Position von Thr105

Die Mutation TetR(P105T) führt zum Induktionsdefekt. Die Ursache dafür liegt im Fehlen der hydrophoben Kontakte zwischen den Tc-Ringen C und D und der Seitenkette von Thr105 (grau). Das flexiblere Tc kann das Mg²⁺ nicht fixieren, so daß letzteres aus der Bindungstasche diffundiert. Schwarz und weiß sind jeweils die Strukturen von TetR^D im Komplex mit [Mg-7ClTc]⁺ und 7ClTc dargestellt.

duktion des Wildtyp-Proteins, doch wird die Helix deformiert. Die Hauptkettenatome von Thr105 bewegen sich zum Tc um 1.1 Å. Das sind ca. 40 % des Translationsweges, der bei Induktion stattfindet. Zwischen Val113 und Leu117 sowie den Tc-Ringen C und D bilden sich die hydrophobe Kontakte, die denen in 2TCT⁷⁹ ähneln.

Die Ursache des Induktionsdefektes des Mutantenproteins P105T liegt demzufolge im Fehlen der hydrophoben Kontakte zwischen den Methylengruppen des Pro105 und den Tc-Ringen C und D, wodurch das Tc zu flexibel positioniert ist und das Mg²⁺ dissoziieren kann. Aufgrund der höheren Flexibilität des Proteins insbesondere am Bindungstaschen-

eingang konnten nur wenige Wassermoleküle lokalisiert werden. Das Fehlen der anderen Wasserstoffbrücken ist damit die Folge des nichtinduzierten Zustandes.

4.9.2 Die Struktur von Asp178Gly

Asp178 ist die C-terminale Aminosäure der Helix 9. Die Funktion dieser Helix im Schließmechanismus am Tc-Bindungstascheneingang wurde im Kapitel 4.7.2 angesprochen. Asp178 ist am letzten Schritt der Induktorbindung beteiligt, indem es mit Arg104 des anderen Monomers eine Salzbrücke ausbildet und so den Verschluß des Tc-Eingangs verstärkt. Die Mutation D178G führt im Fall von TetR^B zum vollständigen Induktionsverlust¹¹². Weitergehende Experimente bezüglich dieses Induktionsdefektes von D178G an TetR^B und TetR^D zeigten einen geringeren Induktionsdefekt, als von Müller *et al.*¹¹² beschrieben¹⁴³.

TetR^D(D178G) wurde (a) ohne Induktor (Form 18), (b) mit fünffachem Überschuß an Induktor [Mg-7ClTc] (Form 19) und (c) fünffachem Überschuß an 7ClTc und 50-fachem Überschuß an Mg²⁺ (Form 20) kristallisiert. Die Formen a und b entsprechen strukturell der des freien TetR^D. Die Helix 6 erstreckt sich bis Gly102, die Helix 9 ist verschoben, und die Bindungstasche bleibt geöffnet. In der Form b ist das Tc in der Bindungstasche lokalisiert, aber die Magnesiumposition ist unbesetzt. Diese beiden Strukturen wurden nicht zu Ende verfeinert, da die Mutationsstelle D178G in beiden Fällen fehlgeordnet vorlag und keine zusätzlichen Informationen gewonnen werden konnten.

Die Form c kristallisiert im Gegensatz zu den beiden ersten in der primitiven Raumgruppe P4₃2₁2 mit einem TetR^D-Dimer in der asymmetrischen Einheit. Die Kristallpackung gleicht den beiden anderen Formen, aber die höhere Symmetrie der Raumgruppe I4₁2 2 geht verloren, da sich die beiden Monomere in der Art des gebundenen Induktors unterscheiden. Während ein Monomer [Mg-7ClTc]⁺ gebunden hat, enthält die andere Induktorbindungstasche nur 7ClTc. Analog zur Struktur des halbinduzierten Repressors (Form 13, siehe Kapitel 4.8.3), ist ein Monomer induziert und das andere nicht. Beide Strukturen lassen sich mit einer rms Abweichung von 0.3 Å überlagern, stimmen aber mit 2TCT⁷⁹ nur bis zu einer rms Abweichung von jeweils 0.6 Å übereinstimmen. Das halb-induzierte Wildtyp-Protein (Form 13) wurde bei der Behandlung des induzierten TetR^D mit dem Chelator EDTA erhalten (Kapitel 4.8.3). Aus einem Monomer wurde Mg²⁺ zu 100 % und aus dem anderen zu 50 % entfernt. Im Gegensatz dazu komplexiert Mg²⁺ unter Standardbedingungen (siehe Seite 17) nicht an das Tc-gebundenen Mutantenprotein D178G. Erst ein Überschuß von MgCl₂ führt dazu, daß das Kation in der Bindungstasche koordiniert.

In der Bindungstasche des nichtinduzierten Monomers ist Restdichte für die Magne-

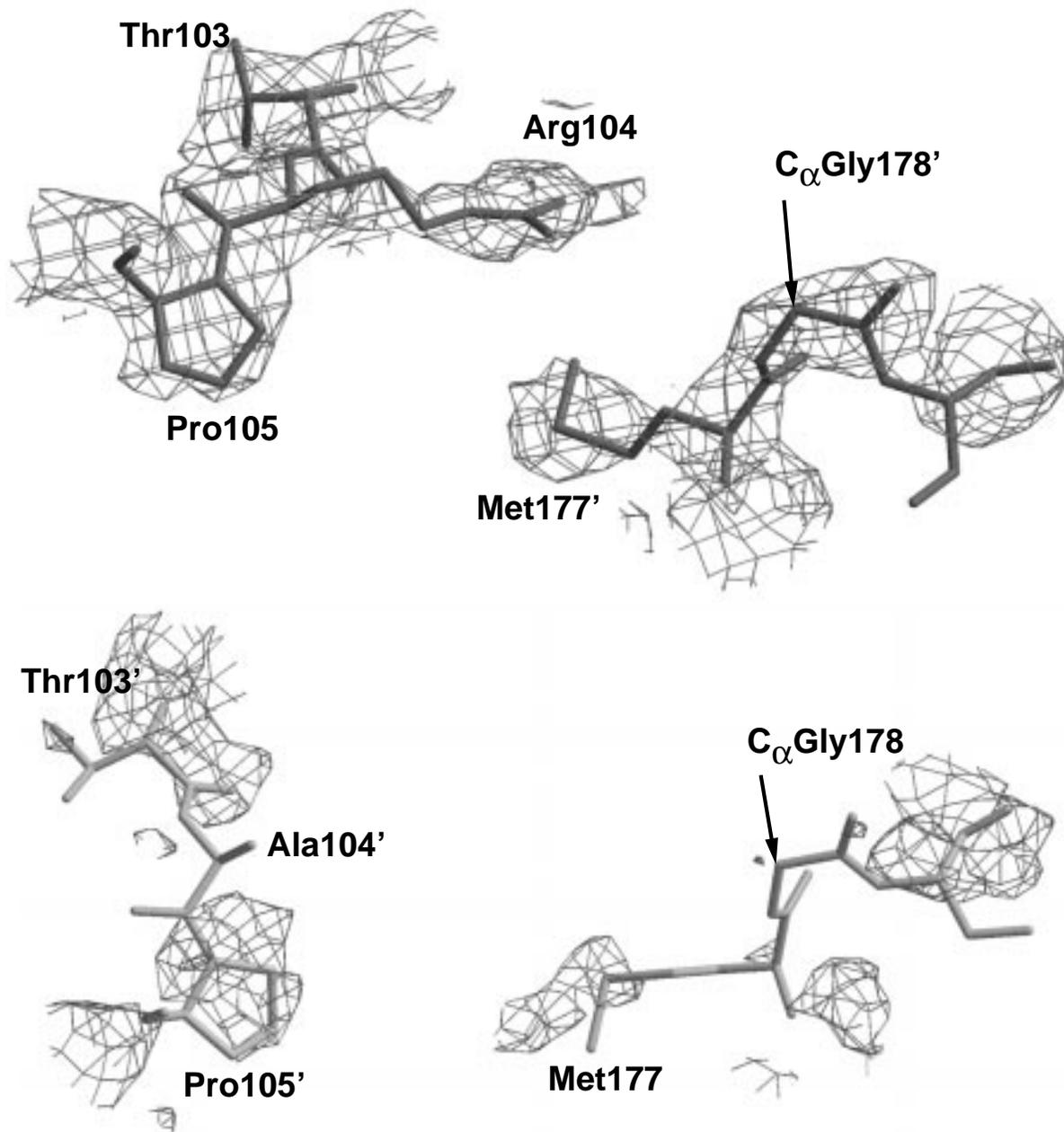


Abbildung 42: Elektronendichtevertellung an beiden Bindungstascheneingängen des halbinduzierten TetR^D(D178G)

Die Dichte wurde mit den Koeffizienten $2F_o - F_c$ berechnet und bei einer Standardabweichung über dem mittleren Dichteniveau konturiert. Oben ist der Eingang zur induzierten Bindungstasche dargestellt. In diesem Bereich ist das Protein rigider als an dem anderen Eingang (unten). Das Arg104 an der Öffnung zur nichtinduzierten Bindungstasche wurde als Alanin modelliert, da für die Argininseitenkette keine Elektronendichte vorhanden war.

siumposition vorhanden, die einer Besetzung von 40 % entspricht. Die Helix 6 erstreckt sich wie im freien TetR^D von Gly96 bis Gly102. Äquivalent zur Restdichte für das Ma-

gnesium ist ebenfalls Restelextronendichte neben dem Gly102 zu beobachten. In diese Elektronendichte läßt sich eine Peptidhauptkette modellieren, die der induzierten Repressorkonformation entspräche. Das bedeutet, daß von dem Repressordimer ein Monomer vollständig und das zweite zu 40 % induziert ist.

Die beiden Monomere unterscheiden sich signifikant voneinander hinsichtlich ihrer Struktur am Eingang der Bindungstasche. Während in dem nichtinduzierten Monomer Gly178' und Arg104 so flexibel sind, daß Arg104 nicht modelliert werden konnte, sind für die gleichen Aminosäuren an der Bindungstasche des induzierten Monomers Elektronendichten zu beobachten. Sowohl die Seitenkette von Arg104', der aber keine entsprechend negativ geladene Seitenkette analog zu Asp178 gegenübersteht, als auch Gly178 sind relativ gut fixiert. Die rms Abweichung der Position von Arg104' zur der überlagerten Struktur des induzierten Wildtyp TetR^D beträgt 1 Å, die Aminosäure besitzt aber dieselbe Orientierung und bildet mit der planaren Guanidiniumgruppe eine Stapelung zum Imidazolring des His151 des anderen Monomers. Zusätzlich werden hydrophobe Kontakte zwischen der Trimethylenkette des Arg104 und dem 7ClTc-Ring D gebildet.

Als Charakteristikum für den Zustand des Eingangs der Bindungstasche läßt sich der Abstand der C- α -Atome der Aminosäuren 104 und 178' verwenden. In dem induzierten Wildtyp-TetR^D beträgt dieser Abstand 11.5 Å, am Eingang der korrekt induzierten Bindungstasche 12.2 Å und am anderen Eingang 13.6 Å. Das bedeutet, daß in dem induzierten Monomer die Größe der Öffnung eher dem in 2TCT entspricht als dem im zweiten, nicht-induzierten Monomer.

Anhand der Struktur des halbinduzierten Mutantenproteins D178G (c, Form 20) konnte gezeigt werden, daß Asp178 nicht essentiell für die Induzierbarkeit ist, seine Mutation zu Gly die Effizienz der Induktion aber verringert. Durch die Erhöhung der Mg²⁺ Konzentration läßt sich jedoch die Induktion von TetR^D(D178G) erzwingen.

4.10 TetR^D im Komplex mit 4epiTc und 2nitriloTc

4epiTc und 2nitriloTc unterscheiden sich von den anderen in dieser Arbeit verwendeten Tc (siehe Seite 65), durch die Modifikationen der Substituenten am Tc-Ring A. Diese Modifikationen (siehe Abb. 43) beeinflussen das Wasserstoffbrückenmuster vom Tc zu TetR^D, das Tc wird weniger fest gebunden, und das Magnesiumion des Induktorkomplexes kann leichter aus der Bindungstasche diffundieren.

Im TetR^D[MgTc]-Komplex geht die Dimethylammoniumgruppe des Tc mit dem Amidsauerstoff der Seitenkette Asn82 eine Wasserstoffbrücke ein. Mutationen dieser Aminosäure führen zu einer Reduzierung der Tc-Bindungskonstante⁹⁵. Die Beseitigung dieser Wasserstoffbrücke durch Substitution der Dimethylaminogruppe am Tc gegen ein Proton

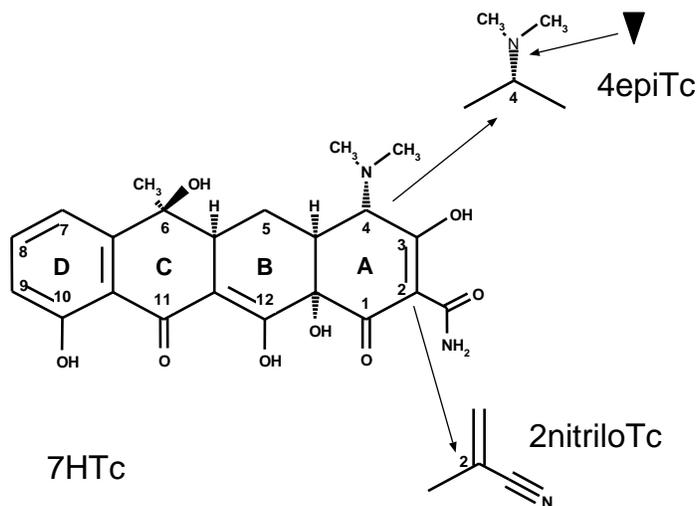


Abbildung 43: Modifikationen am Tetrazyklin

Die beiden Modifikationen betreffen die Tc-Positionen 2 und 4 des 7HTc, das hier als vollständiges Molekül dargestellt ist. Die modifizierten Gruppe sind jeweils in separaten Fragmenten dargestellt. Beide Tc besitzen an Position 7 ein Chloratom, daß hier nicht gezeigt ist.

verhindert die Bindung des Induktors⁹⁵. Die Ursache dafür liegt im Fehlen der positiven Ladung am Tc-Molekül, das im Komplex mit dem Magnesiumion in diesem Fall nicht geladen ist. Der Wechsel der Konfiguration am Kohlenstoff C4 im 4epiTc sollte sich ebenfalls auf die Bindung des Tc und das Induktionsvermögen auswirken. Es wurde gezeigt^{36, 95}, daß 4epiTc, dessen Kohlenstoff an Position 4 eine R-Konfiguration einnimmt, 300 mal schwächer an TetR bindet und 80 mal schlechter induziert als 7HTc.

Die bis zu einer Auflösung von 2.7 Å verfeinerte Struktur zeigt, daß nur das magnesiumfreie 4epiTc gebunden wird; die Position für das Magnesiumion zeigt keine Differenzelektronendichte. Die Helix 6 hat dieselbe Länge wie im freien TetR^D, die Kationenbindungstelle ist somit nicht ausgebildet. Die Ursache hierfür liegt in der Koordination des 4epiTc, das Wasserstoffbrücken wie das 7HTc zu den Seitenketten His64, Asn82 und Gln116 ausbildet. Da aber der Tc-Kohlenstoff C4 eine andere Konfiguration besitzt, ist das Tc-Molekül verschoben, wobei das Stickstoffatom N4 ungefähr die Position wie in der 2TCT⁷⁹ Struktur einnimmt. Wegen dieser Verschiebung sind die Positionen der Sauerstoffatome O11 und O12 um jeweils 0.2 Å versetzt. Damit sind zwei der sechs Liganden der oktaedrischen Koordinationssphäre des Kations verschoben; das Magnesiumion wird zu schwach fixiert und kann aus der Bindungstasche heraus diffundieren nachdem es als [Mg-2nitriloTc] gebunden wurde.

Im Molekül des 2nitriloTc (Chloratom in Position 7) ist die Amidgruppe an Position 2 durch eine Nitrilgruppe ersetzt (siehe Abb. 43). Im 7ClTc bildet das Sauerstoffatom (O21) der Amidgruppe eine Wasserstoffbrücke zum N δ von His64 aus und das Stickstoffatom N21 ist in keine Wasserstoffbrücke zum Protein eingebunden. In der 2TCT-Struktur⁷⁹ ist die Amidgruppe zum Wasserkanal ausgerichtet und bildet Kontakte zum Solvens. In der 2TCT-Struktur⁷⁹ ist im Solvenskanal ein Wassermolekül modelliert, das 3.2 Å von N21 entfernt ist und außerdem noch Kontakte zu drei anderen Wassermolekülen besitzt (siehe

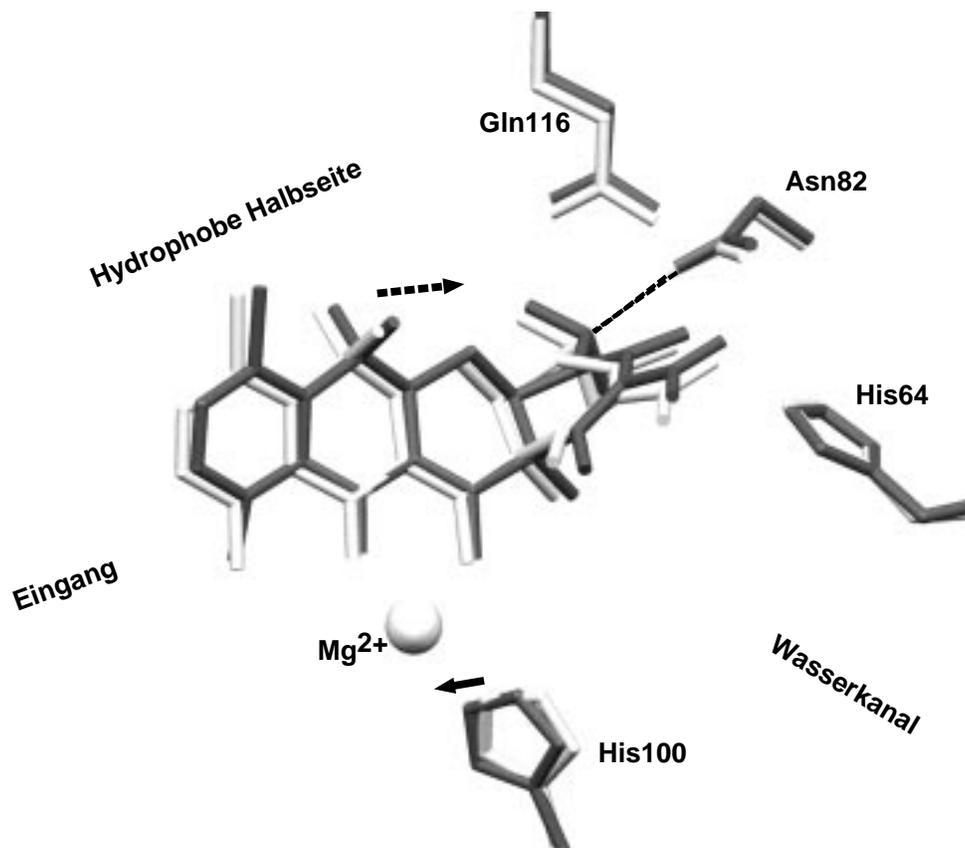


Abbildung 44: Unterschiedliche Positionen der Tetracycline 7ClTc (hell) und 4epiTc (dunkel) in der Bindungstasche

Wegen der Konfigurationsänderung am Tc-Kohlenstoff 4 erhält die Dimethylammoniumgruppe in dem TetR^D mit 4epiTc eine andere Position als in 7ClTc, in beiden Strukturen wird jedoch eine Wasserstoffbrücke zu Asn82 ausgebildet (gestrichelte Linie). Da das Wasserstoffbrückenmuster zur Bindung des Tc nicht verändert ist, hat sich die Lage des gesamten 4epiTc geändert. Das 4epiTc ist um ca. 0,3 Å zu den Aminosäuren verschoben, die Wasserstoffbrücken zum Tc ausbilden (gestrichelter Pfeil). Die Kationbindestelle wird modifiziert, da His100 eine entgegengesetzte Verschiebung zum Tc ausführt (durchgezogener Pfeil), die oktaedrische Konformation für das Kation ist nun nicht mehr gewährleistet. Das Kation, in dem Fall Mg²⁺, ist schwächer gebunden und diffundiert aus der Bindungstasche.

Abb. 24 auf der S. 53). In TetR^D[Mg2nitriloTc]₂ fehlen die Wasserstoffbrücken vom O21 zum His64 und zum Gln116, die nun nur noch das O3 koordinieren. Der Imidazolring des His64 ist um ca. 100° rotiert, wodurch das Wasserstoffbrückenmuster der Tc-Erkennung deformiert wird (siehe Abb. 45). Analog zur Struktur des 4epiTc zeigt die fehlende Differenzelektronendichte (max. Auflösung 2,65 Å) an, daß die Kationbindestelle leer ist, und, die Helix 6 sich bis Gly102 erstreckt. An der Position des Kations befinden sich Solvens. Dies steht zunächst im Widerspruch zu der Bindungskonstante dieses Tc-Derivats an TetR^B und zu seinem Induktionsvermögen (siehe dazu Tab 3). Es erscheint möglich, daß das 2nitriloTc zwar ein guter Induktor ist, aber durch das Fehlen der beiden Wasser-

stoffbrücken das Tc schlechter fixiert und das Mg^{2+} im Laufe der Kristallisation aus der Bindungstasche diffundieren kann.

Obwohl die Datenqualität der TetR^D-Komplexe mit 4epiTc und 2nitriloTc signifikant schlechter ist die der korrekt induzierten Repressorkomplexe (z.B. mit [Ni-7ClTc]), zeigen "Simulated annealing omit-maps" (siehe Abb. 46) in den beiden Strukturen eindeutig die Position des Gly102. Im Fall des 7ClTc ändert sich die Orientierung der Peptidbindung zwischen Leu101 und Gly102 sowie die relative Position des C_α-Kohlenstoffs von Gly102

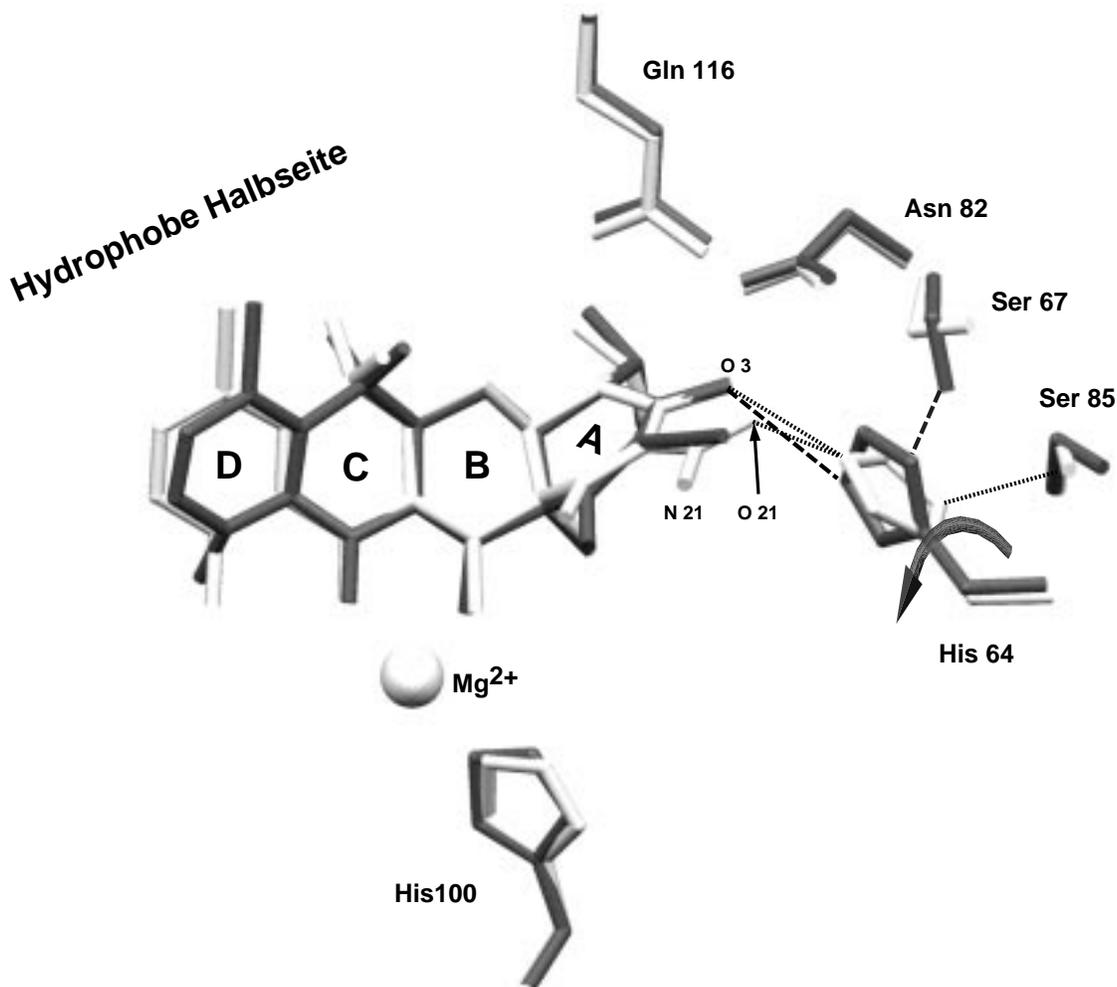


Abbildung 45: Veränderungen in der Bindungstasche im Fall des 2-nitriloTc

Das 7ClTc ist hell und das 2-nitriloTc dunkel dargestellt. Das Fehlen einer der drei Gruppen des Tc für die Koordinierung am Ende der Bindungstasche (bei 2-nitriloTc fehlt das O21 vom Tc) führt zu Veränderungen des Wasserstoffbrückenmusters in diesem Bereich. Die Wasserstoffbrücken mit 7ClTc sind als gepunktete Linie dargestellt. Die Wasserstoffbrücken bei 2-nitriloTc sind gestrichelt. Der Imidazolring von His64 wird gedreht, wobei sich die Wasserstoffbrücke zum Ser85 löst und die zum Ser67 gebildet wird. Wassermoleküle in der Bindungstasche und die Wasserstoffbrücken zu den Aminosäuren Asn82, His100 und Gln116 wurden der Übersichtlichkeit halber weggelassen.

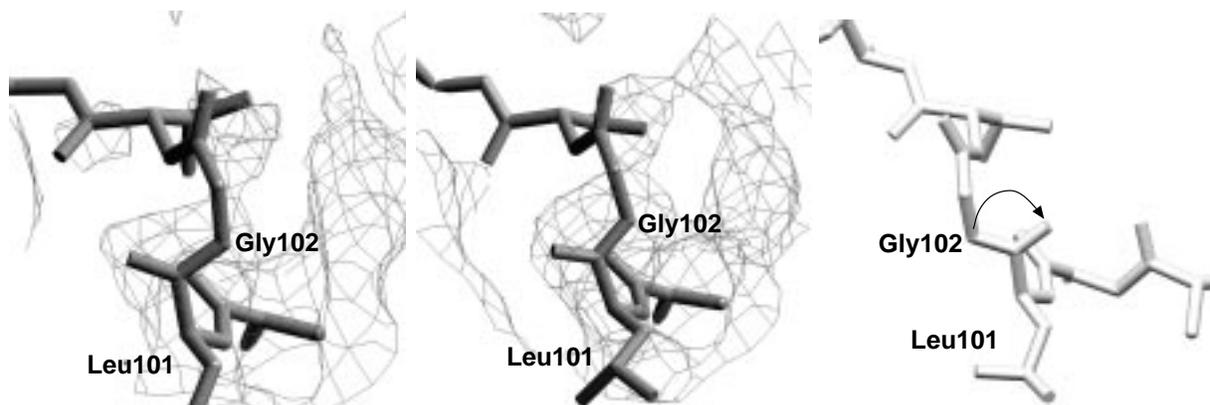


Abbildung 46: Differenzelektronendichte für die Aminosäure 102 in den TetR^D-Komplexen mit 4epiTc und 2nitriloTc

Zur Berechnung der Differenzelektronendichte wurden Gly102 und alle Atome in einem Radius von 6 Å um diese Aminosäure entfernt und das Modell nach einem "simulated-annealing" Protokoll (1000 K) verfeinert⁶⁸. Die Elektronendichte wurde mit den Koeffizienten $2F_o - F_c$ berechnet und bei einer Standardabweichung über dem mittleren Dichteniveau konturiert. links: TetR^D[4epiTc]; mitte: TetR^D[2nitriloTc]; rechts: Segment des induzierten TetR^D; in der Struktur 2TCT⁷⁹ ist mit einem Pfeil das Umklappen der Peptidbindung durch Induktion markiert.

bei der Induktion. Die Peptidbindung dreht sich um 180° und C_α von 102 bewegt sich um 3.9 Å. In Abwesenheit des zweiwertigen Kations bilden die Aminosäuren Leu101 und Gly102 den C-Terminus der Helix 6; wenn dagegen der Induktor [MTc] mit dem zweiwertigen Kation gebunden ist, lösen sich die Aminosäuren His100 bis Thr103 von der Helix 6 ab und bilden eine β-Schleife. Im Komplex mit 2nitriloTc und 4epiTc erstreckt sich die Helix bis Gly102, so daß TetR^D in beiden Strukturen im nicht-induzierten Zustand vorliegt.

4.11 Repressor/Operator-Kontakte

Entsprechend Methylierungsschutz- und Ethylierungsinterferenzuntersuchungen^{62, 57} sowie Mutageneseexperimenten^{11, 176} bindet TetR mit den beiden α-Helix-Turn-α-Helix-Motiven (HTH) in zwei aufeinanderfolgende tiefe Furchen der DNA-Doppelhelix. Dabei werden sequenzspezifische Kontakte zwischen Repressor und Operator ausgebildet. Die Analyse dieser Wechselwirkungen wird in diesem Kapitel anhand der Kristallstruktur des aus TetR^D und dem nichtsymmetrischen 15mer-Operator (Form 6) bestehenden Komplexes durchgeführt, da die betreffenden Daten die höchste Auflösung (2.5 Å) hatten. Die Numerierung der Basensequenz wurde entsprechend der üblichen Nomenklatur gewählt, so daß die Nummern vom 5'-Ende zum 3'-Ende zunehmen. Das zentrale Basenpaar erhält

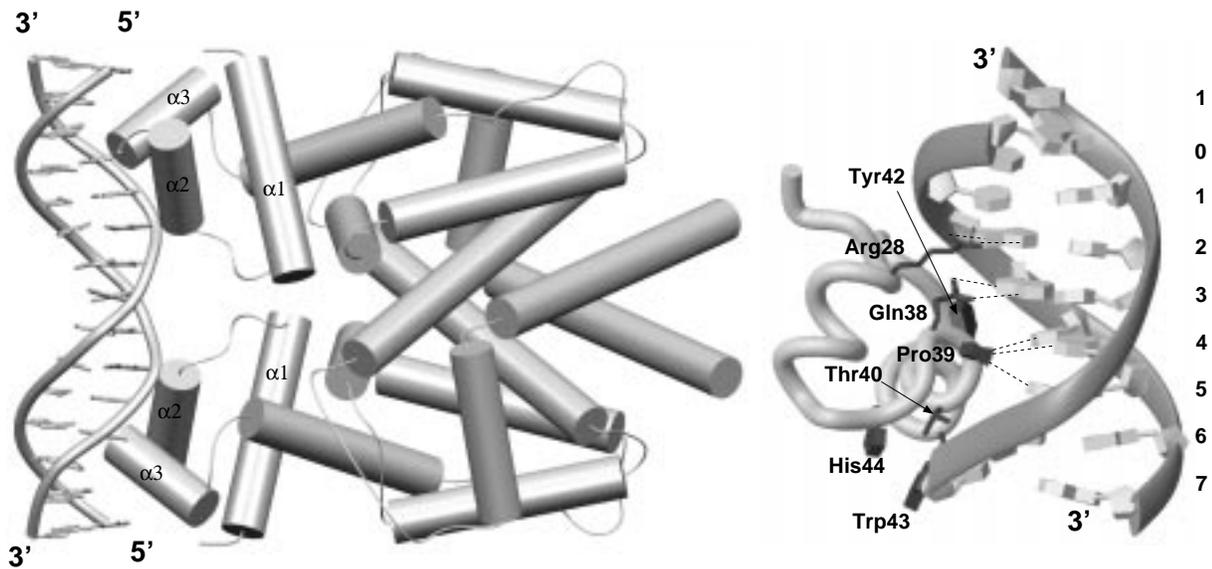


Abbildung 47: TetR^D/Operator-Wechselwirkungen

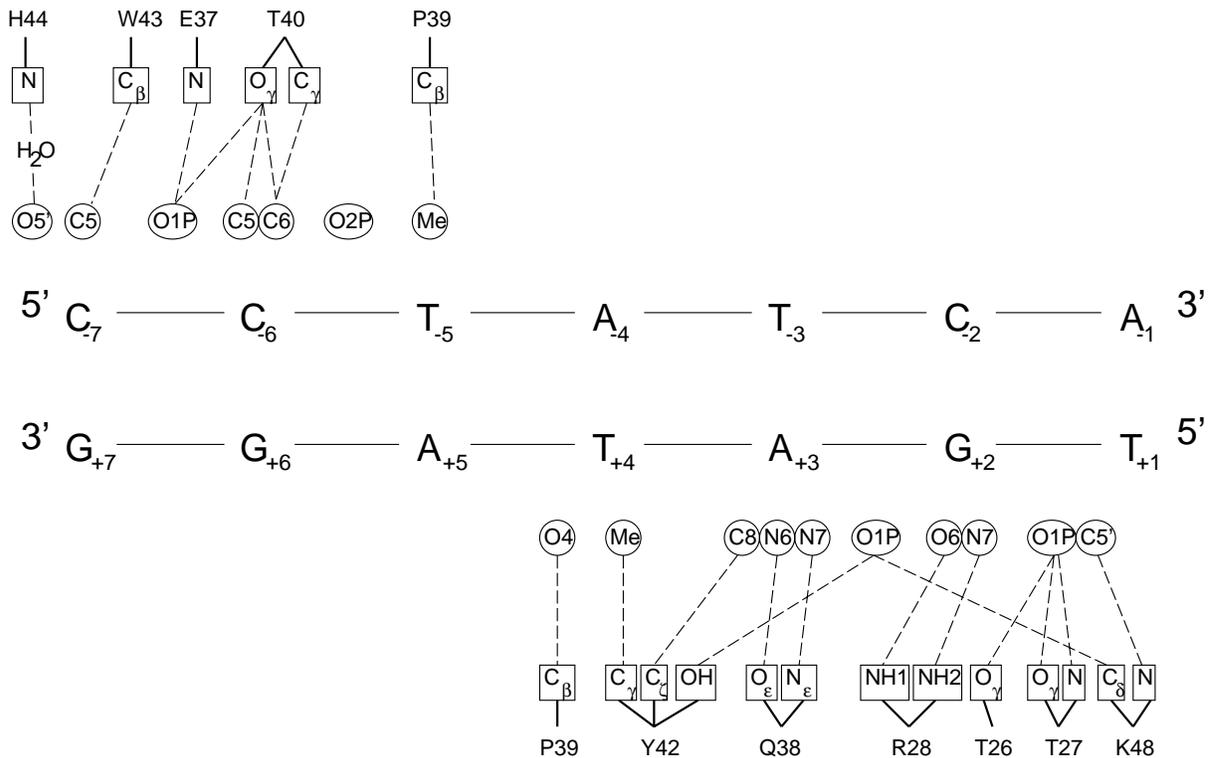
Dargestellt ist rechts das Helix-Turn-Helix-Motiv mit der Proteinhauptkette als Schlauch und den markierten Aminosäureseitenketten. Die Nummerierung der Basenpaare ist neben dem DNA-Doppelstrang angegeben. Die DNA-Enden sind gekennzeichnet mit jeweils den 3'-Enden. Ein Auswahl von Repressor-DNA-Kontakten ist mit gestrichelte Linien symbolisiert. Die Abbildung wurde aus Kraft et al.⁸⁷ entnommen.

Links ist der TetR^D/15mer-DNA Komplex dargestellt. Das Protein wird durch die 20 Helizes und die DNA als Doppelstrang symbolisiert. Die Ansicht ist zur linken Darstellung um 180° um eine vertikale Achse gedreht. Diese Abbildung zeigt die relative Größe von TetR^D zu seinem Operator.

die Nummer "0". In Richtung 5'-Ende sind die folgenden Basen -1, -2, -3 usw.; in Richtung 3'-Ende ist die Nummerierung +1, +2, +3 usw.

TetR^D bindet mit einem HTH-Motiv jeweils beiden Einzelstränge der DNA-Doppelhelix. Die Abstände der Kontakte zwischen Protein und DNA sind in Tabelle 11 verzeichnet und in Abb. 48 schematisch dargestellt. Einige Kontakte wurden bereits durch molekularbiologische⁵⁹ und spektroskopische Arbeiten^{86, 87} ermittelt und konnten mit Hilfe der Kristallstruktur bestätigt werden. Auf der Grundlage von Methylierungsschutzexperimenten wurde zwei 19 bp lange Operatoren *tetO*₁ und *tetO*₂ als DNA-Bindungsstellen identifiziert¹⁷⁸. In der Kristallstrukturanalyse des TetR^D/Operator-Komplexes wurde dagegen ein um 2 bp an beiden Enden gekürzter DNA-Doppelstrang verwendet. Aus diesem Grund fehlt auch z. B. die Wasserstoffbrücke von His44 zu der Phosphatgruppe zwischen den Basen -7 und -8. Diese Aminosäure ist aber an der DNA-Bindung beteiligt, wie mit Mutageneseexperimente gezeigt werden konnte^{60, 61}. Die in der Struktur mit der 15mer-DNA fehlende Wasserstoffbrücke wird anhand der Kristallstruktur mit dem 17 bp langen Operator diskutiert, deren maximale Auflösung bei 3.9 Å liegt (siehe Kapitel 4.12.3).

Mit der DNA-Bindung verändert sich die Umgebung der Aminosäuren des HTH-

Abbildung 48: Kontakte in dem TetR^D/15merDNA-Komplex (Form 6)

Übersicht über Wasserstoffbrücken und hydrophobe Kontakte zwischen einer DNA-bindenden Domäne und der Hälfte des *tet*-Operators. In der Mitte befinden sich die Basenpaare, deren Atome eingekreist sind. Die Kontakte zu den entsprechenden Aminosäurenatomen (mit Vierecken eingerahmt) sind gestrichelt dargestellt. Die Aminosäuren stehen in der Abb. jeweils oben bzw. unten und sind mit ihren Atomen über einen durchgehenden Strich verknüpft.

Motivs im Vergleich zu den Strukturen des DNA-freien TetR. Bei der Kristallisation des induzierten und des freien TetR^D ist das Drei-Helix-Bündel des Repressors aufgrund der Kristallpackung neben Proteinbereichen anderer TetR-Moleküle positioniert. Die Kontakte, die sich aus deren Kristallpackung ergeben, sind für die Funktion des Repressors irrelevant; und die mit Wasserstoffbrücken stabilisierten Aminosäuren sind im isolierten Repressor möglicherweise flexibel. Im weiteren Teil des Kapitels werden diejenigen Aminosäuren beschrieben, deren Seitenketten bei DNA-Bindung ihre Konformation ändern.

Die Aminosäuren Arg28 und Gln38 besitzen in dem freien TetR^D keine direkten Wasserstoffbrückenpartner (siehe Kapitel 4.1). Mit der Bindung an den Operator werden beide Seitenkette jeweils in zwei Wasserstoffbrücken zum Operator eingebunden und erkennen die Purinbasen an Position +2 und +3. Aus den bisher bestimmten Protein/DNA-Komplexen ist bekannt, daß Arginine und Glutamine die beiden häufigsten Aminosäuren sind, die in HTH-Motiven Wasserstoffbrücken zu den Basen ausbilden¹⁰⁵. Die Seitenkette Tyr42 verändert ihren Chi-Winkel um 106.4° und liegt mit der Hydroxyphenylgruppe

parallel zur DNA-Helix (siehe Abb 49). Dabei bildet Tyr42 hydrophobe Kontakte (mit dem Aromat) und eine Wasserstoffbrücke (mit der Hydroxylgruppe) zur Phosphatgruppe zwischen den Basen +2 und +3. Die anderen Aminosäureseitenketten, die Kontakte zum Operator ausbilden, ändern sich nicht in ihrer Position. Die möglichen Salzbrücken von Lys29 und Lys46 zu den Phosphatgruppen des DNA-Hauptstranges liegen nicht vor. Die kürzesten Abstände der terminalen Aminogruppen zur DNA betragen 5.0 bzw. 7.9 Å, obwohl eine geringe Änderung der Torsionswinkel die Seitenketten näher an die DNA positionieren könnte. Die übrigen basischen Aminosäuren des Drei-Helix-Bündels Arg6,

Tabelle 11: Kontakte zwischen TetR^D und 15mer-DNA (Form 6)

Übersicht über Wasserstoffbrücken und hydrophobe Kontakte zwischen DNA-bindender Domäne und 15mer *tet*-Operator. Die Phosphatgruppe, die in dem 17mer *tet*-Operator durch His44 erkannt wird, ist in dem verkürzten Operator durch ein Wassermolekül ersetzt. Der angegebene Abstand für die Wasserstoffbrücke des Imidazolrings von His44 ist der zum Wassermolekül.

Aminosäure	Nukleotid	Abstand	Kontakt
Thr26 O γ	G+2 PO ₁	2.5	Wasserstoffbrücke
THR27 O γ	G+2 PO ₁	2.8	Wasserstoffbrücke
THR27 N	G+2 PO ₁	3.0	Wasserstoffbrücke
Arg28 NH1	G+2 O6	2.6	Wasserstoffbrücke
Arg28 NH2	G+2 N7	2.7	Wasserstoffbrücke
Asp37 N	C-6/T-6 PO ₁	3.5	Wasserstoffbrücke
Gln38 O ϵ	A+3 N6	2.8	Wasserstoffbrücke
Gln38 N ϵ	A+3 N7	2.7	Wasserstoffbrücke
Pro39 C β	T+4 O4	4.2	hydrophober Kontakt
Pro39 C γ	T-5 Me	3.3	hydrophober Kontakt
Thr40 O γ	C-6/T-6 PO ₁	2.5	Wasserstoffbrücke
Thr40 C γ	C-6/T-6 C6	3.6	hydrophober Kontakt
Tyr42 C γ	T+4 Me	3.6	hydrophober Kontakt
Tyr42 C ζ	A+3 C8	3.7	hydrophober Kontakt
Tyr42 OH	A+3 PO ₁	2.6	Wasserstoffbrücke
Trp43 C δ 1	C-7 C5	2.8	hydrophober Kontakt
His44 N ϵ	C-8 "PO ₁ "	2.8	Wasserstoffbrücke
Lys48 N	A+3 PO ₁	3.1	Wasserstoffbrücke
Lys48 N ζ	G+2 PO ₂	3.8	Salzbrücke

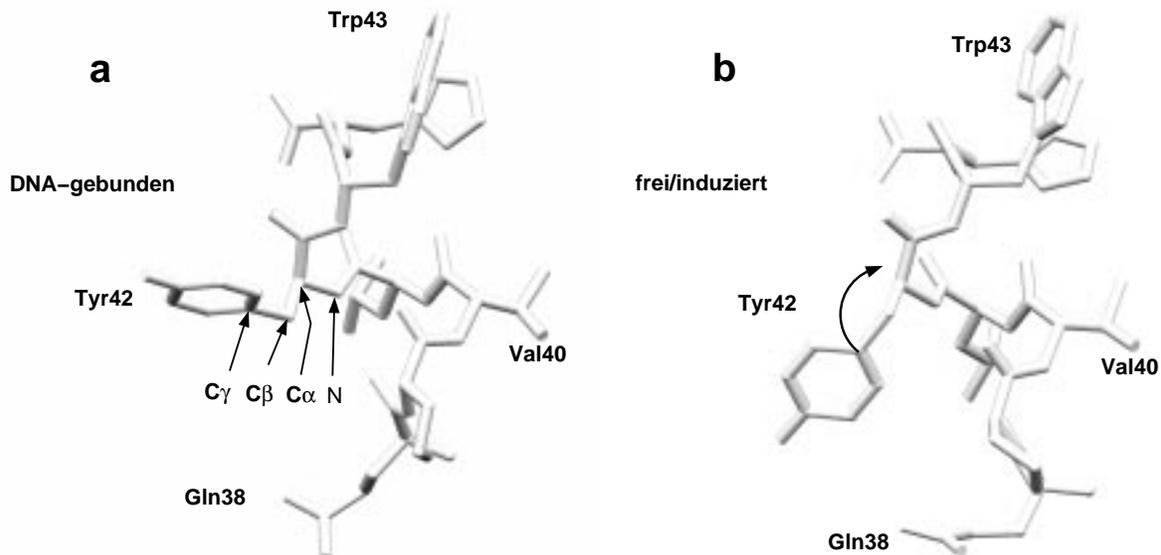


Abbildung 49: Rotation der Seitenkette Tyr42

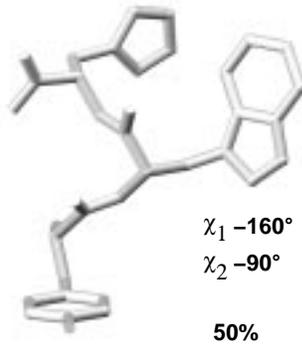
Dargestellt sind die sieben Aminosäuren der Erkennungshelix im DNA-gebundenen (a, links) und im induzierten Zustand (b, rechts). Die Seitenkette von Tyr42 rotiert um die Bindung C α -C β . Dabei ändert sich der Torsionswinkel χ_1 (Atome N, C α , C β , C γ) von 175.7° zu -77.9°. Die Rotation beträgt dabei 106.4°.

Lys33 und Arg49 sind mit ihren Seitenketten von der DNA weggerichtet.

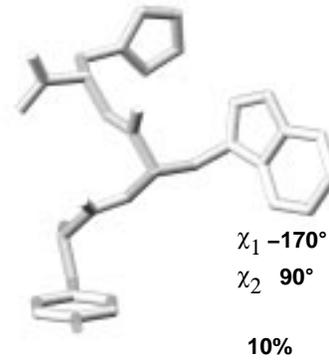
Die Konformationsänderung einzelner Seitenketten bei DNA-Bindung läßt sich in Lösung durch NMR-spektroskopische Methoden leider nicht bestimmen, da das TetR^D-Dimer mit einem Molekulargewicht von 46 kDa zu groß ist. Darum können nur solche spektroskopischen Experimente verwendet werden, die Charakteristika einzelner Aminosäuren ausnutzen. Antonini und Mitarbeiter haben die beiden konservierten Tryptophane Trp43 und Trp75 von TetR im Komplex des TetR^B mit AnhydroTc und im freien Zustand analysiert⁴. Trp75 ist am Rand des hydrophoben Kerns der großen Domäne lokalisiert und relativ unbeweglich, Trp43 ist dagegen solvensexponiert und zeigt im DNA-gebundenen Zustand in die große Furche der Operator-DNA (siehe Abb. 62 auf Seite 108). Für die Seitenkette von Trp43 wurden mit Fluoreszenzmessungen vier Positionen gefunden (siehe Abb 50), bei denen die Torsionswinkel χ_1 und χ_2 der beiden meistbesetzten Konformationen -160° und -90° (Häufigkeit 50%) bzw. -70° und 150° (Häufigkeit 40%) betragen⁴.

In den DNA-freien Kristallstrukturen betragen diese Winkel ca -170° und -80°, was der ersten von Antonini beschriebenen Form entspricht. Im Komplex aus TetR^D und 15mer-DNA (Form 6) sind die Werte 174° und -72°. Der χ_2 -Winkel stimmt ungefähr mit der im freien TetR und der Form 1 von Antonini überein. Die Abweichung beträgt 8 bzw. 18°.

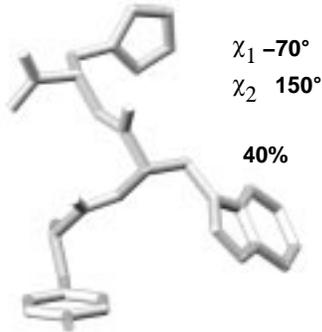
Rotamer 1



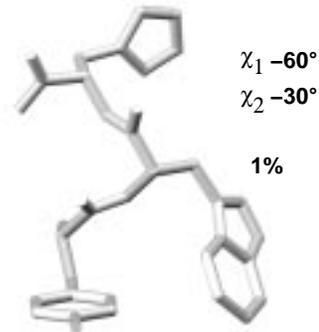
Rotamer 2



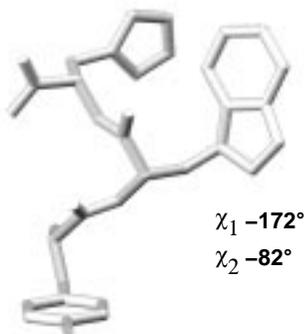
Rotamer 3



Rotamer 4



DNA-frei (Form 9)



DNA-Komplex (Form 6)

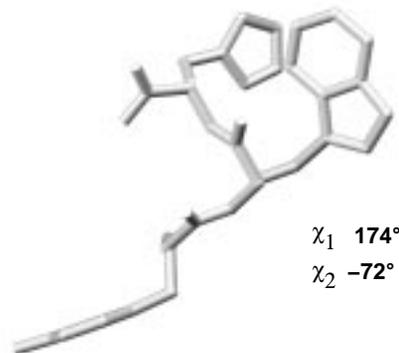


Abbildung 50: Position der Trp43-Seitenkette

Dargestellt sind die letzten drei Aminosäuren der TetR-Erkennungshelix (Tyr42, Trp43, His44). In den oberen vier Modellen sind die Konformationen der Trp-Seitenkette dargestellt, die Antonini et al.⁴ mit Fluoreszenzmessungen bestimmt haben. Die Winkel der Trp-Seitenkette und ihr Häufigkeit sind jeweils angegeben. Die Orientierung der Trp-Seitenkette im DNA-freien und im DNA-gebundenen Zustand sind in den beiden unteren Modelle präsentiert. Entsprechend diesen Daten besitzt die Trp-Seitenkette in beiden Kristallstrukturen die gleiche Orientierung wie in Lösung.

Der χ_1 -Winkel weicht dagegen um 16 bzw. 26 ° jeweils dem DNA-freien und dem ersten Modell von Antonini *et al.* ab.

Die bevorzugte Konformation der Trp43-Seitenkette in Lösung scheint also mit den in den Kristallstrukturen gefundenen Konformationen übereinzustimmen.

4.12 Die Struktur der Operator-DNA

4.12.1 Experimentelle Vorarbeiten

Lederer und Mitarbeiter⁹³ konnten mit Neutronen-Streuungsexperimenten zeigen, daß die Operator-DNA im Komplex mit TetR^B wenig oder gar nicht gekrümmt vorliegt. Aus den experimentellen Daten konnte der Abstand der beiden Repressoren an den Operatoren O1 und O2 der Tn10 Regulationseinheit zueinander bestimmt werden. Ausgehend von diesem Abstand wurden die Ellipsoide der beiden TetR-Dimere verschieden zueinander orientiert und der DNA-Doppelstrang so positioniert, daß die beiden Dimer Kontakt zu dem jeweiligen Operator hatten. Dabei wurden mehrere Modelle für die DNA-Trajektorien vorgeschlagen. Nach diesen Modellen ist die DNA entweder geradlinig oder gekrümmt. Aufgrund der hohen Anzahl von Freiheitsgraden bei dieser Modellierung konnte keine eindeutige Lösung ermittelt werden. Entsprechend dem Modell mit der gekrümmten DNA liegt eine Biegung der DNA von $52 \pm 9^\circ$ pro Operator vor, wobei die Operatortenden vom Repressor weggebogen sind.

Es muß bemerkt werden, daß in der Arbeit von Lederer *et al.*⁹³ der TetR^B/DNA-Komplex falsch modelliert wurde. TetR^B besitzt nach den Daten der Kleinwinkelstreuung eine ellipsoidale Form mit den Ausdehnungen 110, 50 und 20 Å. Senkrecht zur längsten Ausdehnung findet die DNA-Bindung statt (siehe Abb. 68 auf Seite 114). In dem Modell von Lederer *et al.* wird die Bindung von TetR^B an den Operator allerdings mit der Fläche vorgeschlagen, die senkrecht zur mittleren Achse des Ellipsoids steht. Die experimentellen Werte dieser Arbeit werden aber dennoch im Kapitel 4.14 zur Modellierung der gesamten Promotor/Operator-Region verwendet.

Die Biegung von Operator-DNA an TetR^B wurde anhand von Gelelektrophoreseexperimenten mit zyklischen DNA-Fragmenten, die eine *tet*-Operatorsequenz enthielten¹⁶⁴, untermauert. Die Biegung der DNA beträgt nach diesem Experiment $48 \pm 7^\circ$.

In den Strukturen anderer DNA-bindender Proteine wird DNA-Biegung vom bzw. zum Protein beobachtet. So z.B. biegt der LacI¹⁰⁰ in der gleichen Weise wie TetR seinen spezifischen Operator vom Repressor weg. Bei den DNA-bindenden Proteinen FIS⁴⁷ und CAP¹⁴⁴ wird die DNA an den Operatortenden dagegen zum Protein hin gebogen. Die Deformationen in der DNA werden durch eine Reihe von Wasserstoffbrücken stabilisiert,

wie das auch bei anderen Protein/DNA-Komplexen beobachtet wurde ⁴⁸.

Mit CD-spektroskopischen Untersuchungen ² wurde eine Deformation der *tet*-Operators festgestellt. Wagenhöfer ¹⁷¹ berichtete über eine Entwindung des Operators von $-22 \pm 3.6^\circ$. Experimente mit zyklischen DNA-Fragmenten, die 12 Operatoren enthielten und sich in ihrer Superhelizität unterschieden, zeigten, daß eine optimale Bindung bei einer superhelikalen Dichte von $\sigma -0.06$ vorliegt. Die negative Superhelizität deutet darauf hin, daß der DNA-Doppelstrang aufgewunden wird. Daraus wurde geschlossen, daß der Tet-Repressor bei DNA-Bindung an *tetO*₁ oder *tetO*₂ diese DNA deformiert und so eine günstigere Bindung erreicht wird.

4.12.2 Theoretische Vorhersagen zur DNA-Biegung der Operator-DNA

im Komplex mit TetR. Die DNA liegt in den Nucleosomen gebogen vor. Diese Biegung wird durch eine Kompression der großen Furche ermöglicht. Die mittlere Biegung zweier Windungen einer DNA in den Nucleosomen (21 Basenpaare) beträgt nach Travers ca. 47° ¹⁶⁵. Anhand der Sequenz der DNA läßt sich für drei beliebige aufeinanderfolgende Basenpaare die Häufigkeit bestimmen, mit der das Triplet mit seiner großen Furche zum Biegungszentrum hin orientiert ist. Diese Daten wurden von Satchwell und Mitarbeitern bestimmt ¹³⁷. Dabei haben die Autoren den jeweiligen Basenpaar-Triplets einen positiven Wert gegeben, wenn an dieser Stelle die DNA mit der großen Furche zu den Histonen zeigt (z. B. GGC besitzt +45 %). Triplets, die mit ihrer großen Furche eher von den Histonen wegzeigen, erhielten einen negativen Wert (z. B. AAA besitzt -36 %). Aufgrund der helikalen Struktur der DNA wiederholen sich die Bereiche ca. alle 5 bp, bei denen die DNA jeweils gekrümmt bzw. nicht gekrümmt vorliegt. Bevorzugt krümmen sich C/G reiche DNA-Fragmente, T/A-reiche Bereiche sind dagegen wenig gebogen.

Unter Verwendung der Werte von Satchwell und Mitarbeitern ¹³⁷ läßt sich entsprechend Abb. 51 für die zentralen 5 bp eine Biegung des *tet*-Operators vorhersagen, wenn TetR^D an den Operator gebunden ist, während dies für die angrenzenden 5 bp eher unwahrscheinlich ist. Da die zentralen 5 bp mit ihrer großen Furche vom Repressor wegzeigen und die angrenzenden 5 bp mit ihrer großen Furche zu TetR orientiert sind, folgt daraus, daß der Operator im TetR/DNA-Komplex vom Repressor wegzeigt. Inwieweit die Operator-DNA jedoch tatsächlich gebogen ist, ließ sich erst durch die Kristallstrukturanalyse des Repressor/Operator-Komplexes bestimmen.

Freie Operator-DNA. Mit Hilfe theoretischer Modelle ⁵⁴ läßt sich für die beiden freien, 19 Basenpaare langen Operatoren *tetO*₁ und *tetO*₂ eine Krümmung von 11° berechnen. Der 11 bp lange Linker zwischen beiden Operatoren ist dagegen um 17° gebogen. Diese

Vorhersagen basieren auf den Parametern zwischen Basenpaaren, die experimentell aus den Biegungen langer DNA-Fragmente¹⁹ gewonnen wurden, bei denen ausgenutzt wurde, daß DNase I gekrümmte DNA-Fragmente eher schneidet. Die Krümmung eines 250 bp langen Fragmentes von *tetb* wurde mit den Programmen BEND⁵⁴ und BEND.IT⁵⁰ berechnet. Die Ergebnisse sind in der Abb. 52 präsentiert.

Mit dem Programm BEND⁵⁴ wird die DNA-Krümmung bei Verwendung der Oligonukleotidparameter für "ROLL", "TILT" und "TWIST" von Satchwell *et al.*¹³⁷ ermittelt. Die berechneten Ergebnisse sind in der Abb. 52 auf der linken Seite dargestellt. Die durchgehende Linie in diesem Schema stellt die DNA-Krümmung an der jeweiligen Basen-

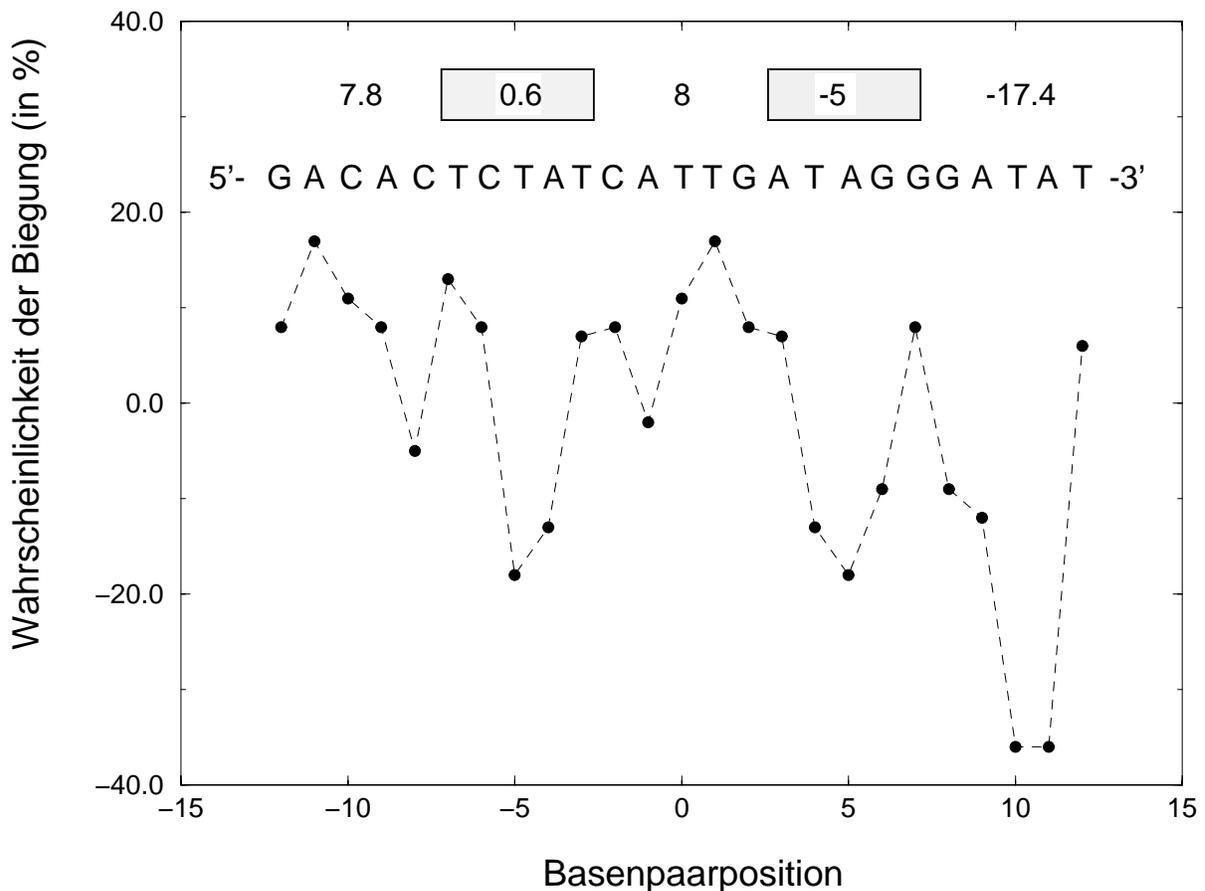


Abbildung 51: Wahrscheinlichkeit der Biegung des *tet*-Operators im Komplex mit Tet. Die Wahrscheinlichkeit, daß sich ein Basenpaar-Triplett mit der großen Furche im Inneren eines gebogenen B-DNA-Ringstückes befindet, wird mit einem positiven Wert angegeben¹³⁷. Kommt es häufiger in Bereichen vor, die nicht gekrümmt sind, so wird diesem Triplett ein negativer Wert zugeordnet. Der Mittelwert von fünf aufeinanderfolgenden Basenpaaren ist über der Kurve notiert. Die beiden gestrichelten Boxen entsprechen den 5 Basenpaaren von *tetO1*, die die meisten Kontakte zu TetR bilden, da sie mit der großen Furche zu TetR zeigen. Anhand dieser Daten läßt sich erkennen, daß die große Furche im zentralen Bereich komprimiert (weil gebogen) und an den Bindestellen leicht aufgeweitet sein könnte. Das führt dazu, daß die DNA vom TetR an den Enden weggebogen wird.

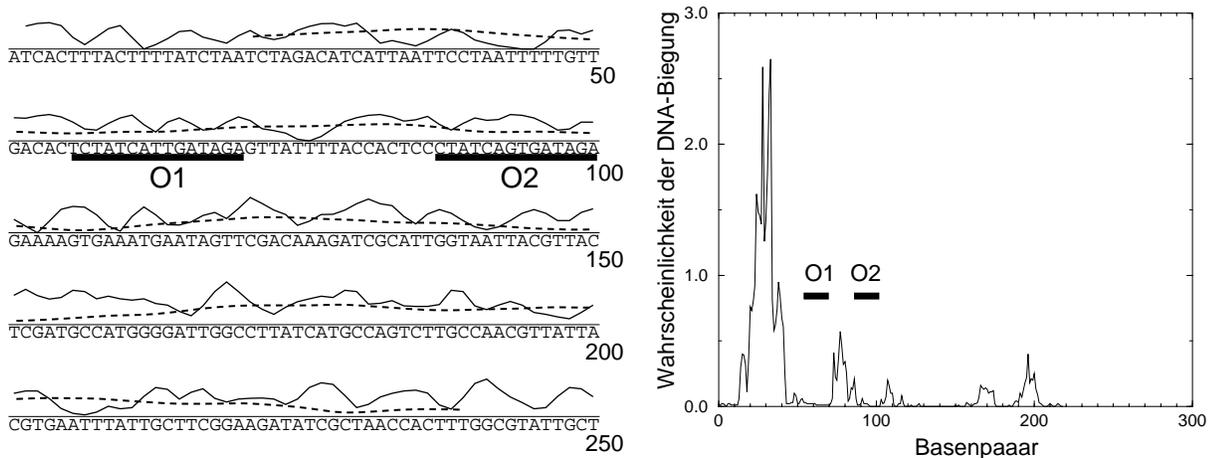


Abbildung 52: Die Wahrscheinlichkeit der DNA-Biegung der freien Operator/Promotor-Region der Resistenzklasse $TetR^B$

Die Ergebnisse basieren auf Berechnungen mit den Programmen `BEND`⁵⁴ (links) und `BEND.IT`⁵⁰ (rechts) und sind im Text näher erläutert. Die Operatoren sind jeweils mit schwarzen Balken gekennzeichnet.

paarposition dar. Der Wert dieser Krümmung berechnet sich aus den Parametern dieses Basenpaares und der beiden benachbarten Basenpaare. Die Biegung der DNA an einer bestimmten Basenpaarposition berechnet sich dagegen innerhalb einer 21 bp großen Rasterung, in deren Mittelpunkt sich das jeweilige Basenpaar befindet. Der maximale Wert für die DNA-Krümmung befindet sich an dem Basenpaar an Position 169 der dargestellten Sequenz, für das 32.1° berechnet wurden. Dieses Basenpaar liegt 82 bp stromabwärts vom Transkriptionsstart des Gens *tetA*. An den Basenpositionen 178 und 179 wurde für den DNA-Duplex eine maximale DNA-Biegung von 21.3° ermittelt. Diese Positionen sind von der Operatorregion relativ weit entfernt.

Mit dem Programm `BEND.IT`⁵⁰ läßt sich die Wahrscheinlichkeit berechnen, mit der eine freies DNA-Fragment gebogen ist. Hierbei wird eine 30 bp lange Rasterung verwendet und der "TWIST"-Winkel mit 36° festgelegt. Das entspricht einer B-DNA. Die übrigen Parameter sind Brukner *et al.*¹⁹ entnommen. Die DNA-Sequenz der beiden Operatoren *tetO*₁ und *tetO*₂ sind in der rechten Graphik der Abb. 52 mit schwarzen Balken gekennzeichnet. An diesen Positionen besteht eine geringe Wahrscheinlichkeit, daß die freie DNA gebogen ist. Die Linkersequenz, die sich zwischen den beiden Operatoren befindet, neigt dagegen zu einer Biegung.

Aus diesen Daten folgt, daß die freie DNA relativ gerade ist (siehe Abb. 52) und im Komplex mit TetR gekrümmt vorliegen kann (siehe Abb. 51). In Übereinstimmung

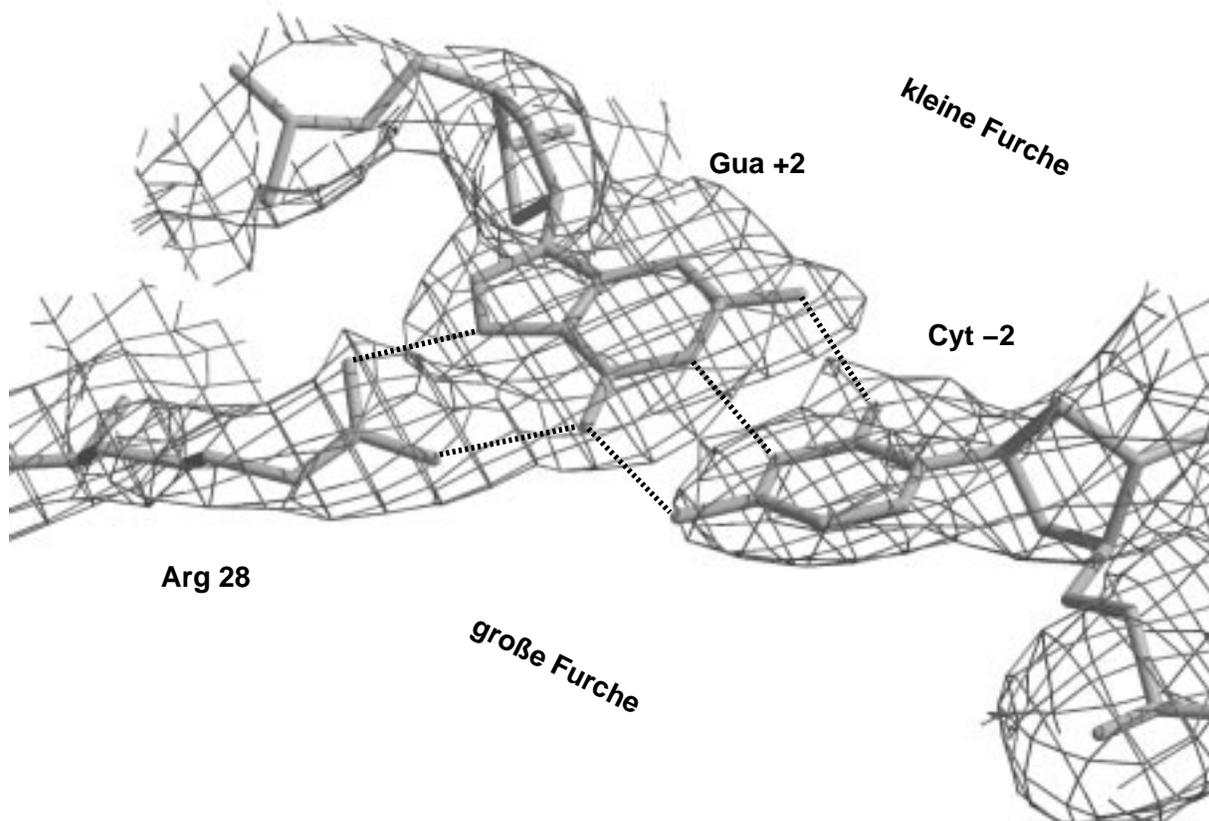


Abbildung 53: Ausschnitt aus der Elektronendichte von TetR^D/15mer-DNA (Form 6). Die Dichte wurde mit den Koeffizienten $2F_o - F_c$ berechnet und bei einer Standardabweichung über dem mittleren Dichteniveau konturiert. Dargestellt ist das zweite Basenpaar in der palindromischen Operatorsequenz und die Aminosäureseitenkette Arg28, die mit dem Guanin in Position +2 zwei Wasserstoffbrücken bildet. Die Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien symbolisiert.

mit den experimentellen Daten (siehe Kapitel 4.12.1) sollte eine Krümmung der DNA gefunden werden; es ist zu erwarten, daß diese DNA-Biegung durch den Tet-Repressor induziert wird.

4.12.3 Struktur der Operator-DNA im Kristall

In der Kristallstruktur des TetR^D/15merDNA-Komplexes sind signifikante Deformationen der DNA zu beobachten, obwohl der DNA-Strang relativ kurz ist. Die Genauigkeit, mit der die DNA-Struktur bestimmt werden konnte, läßt sich aus der ermittelten Elektronendichte ableiten, die für das zweite Basenpaar in Abb. 53 gezeigt ist. Anhand der Elektronendichte ist eine Unterscheidung zwischen den vier Basen Ade, Cyt, Gua und Thy möglich. Eine Ausnahme bilden das zentrale und die beiden terminalen Basenpaare, die nicht palindromisch sind.

Insgesamt entspricht die Struktur der DNA am ehesten der B-Form (ermittelt mit SCHNAaP ¹⁰²), in der die Winkel von einem Basenpaar zum nächsten entlang der Doppelhelix 36° und der Abstand zwischen zwei Basenpaaren entlang der Helixachse ca 3.38 \AA ⁷ (siehe Abb. 54) betragen. In der Kristallstruktur TetR^D/15mer betragen diese Werte 31.5° und 3.41 \AA ; sie unterscheiden sich von den Werten der B-DNA-Form. Beide Werte haben für die A-DNA die Werte 32.7° und 2.56 \AA ⁷. Der Abstand zwischen zwei Basenpaaren entlang der Helixachse im TetR^D/15mer ist demnach ähnlicher der B-DNA, aber die Helixwindung entlang der DNA-Achse stimmt eher mit der A-Form überein. Die Charakteristika der DNA-Geometrie sind in Abb. 55 und in der Tabelle 12 dargestellt. Die Bedeutung der einzelnen Parameter ist in Abb 54 erläutert.

Die Anzahl der Basenpaare für eine Helixwindung beträgt 11.4 (B-DNA 10.5, A-DNA 11). Dieser Wert resultiert aus einer partiellen Aufwindung der Duplex-DNA in dem

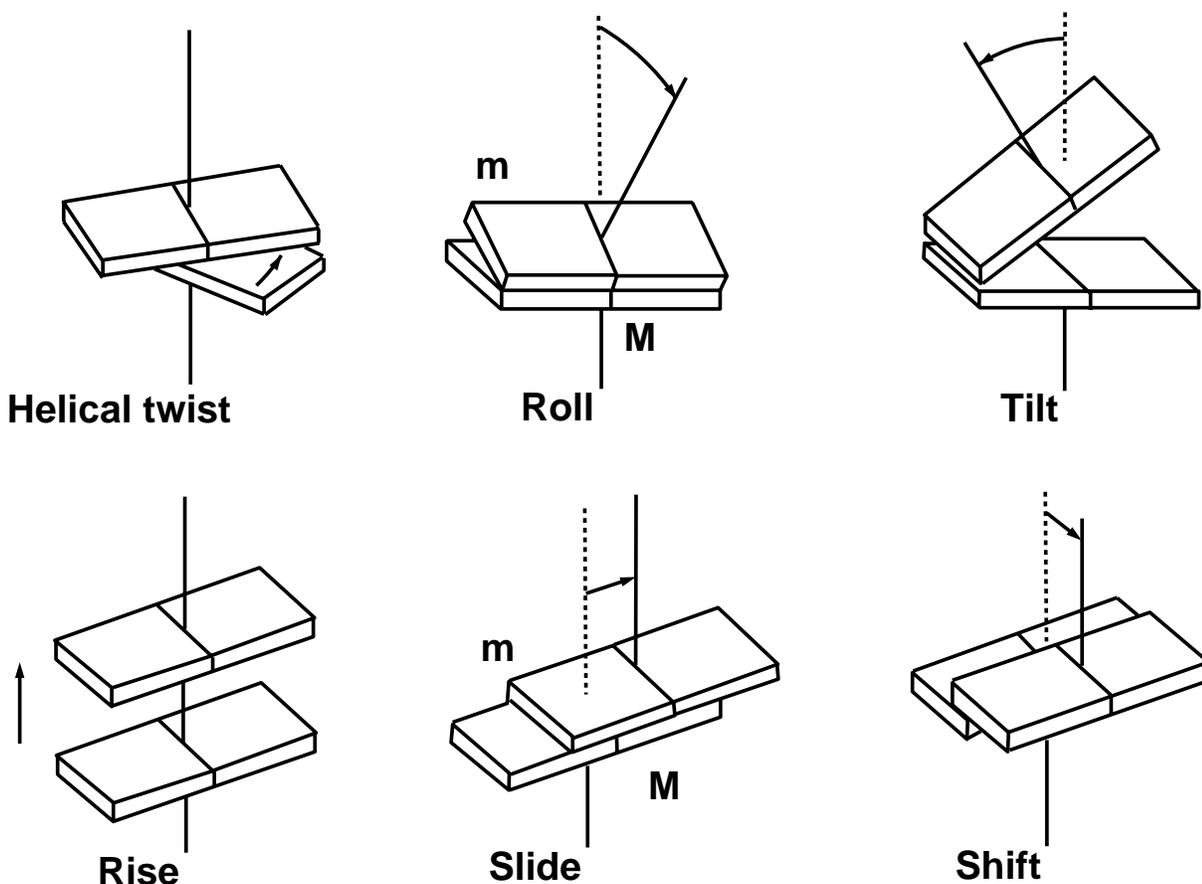
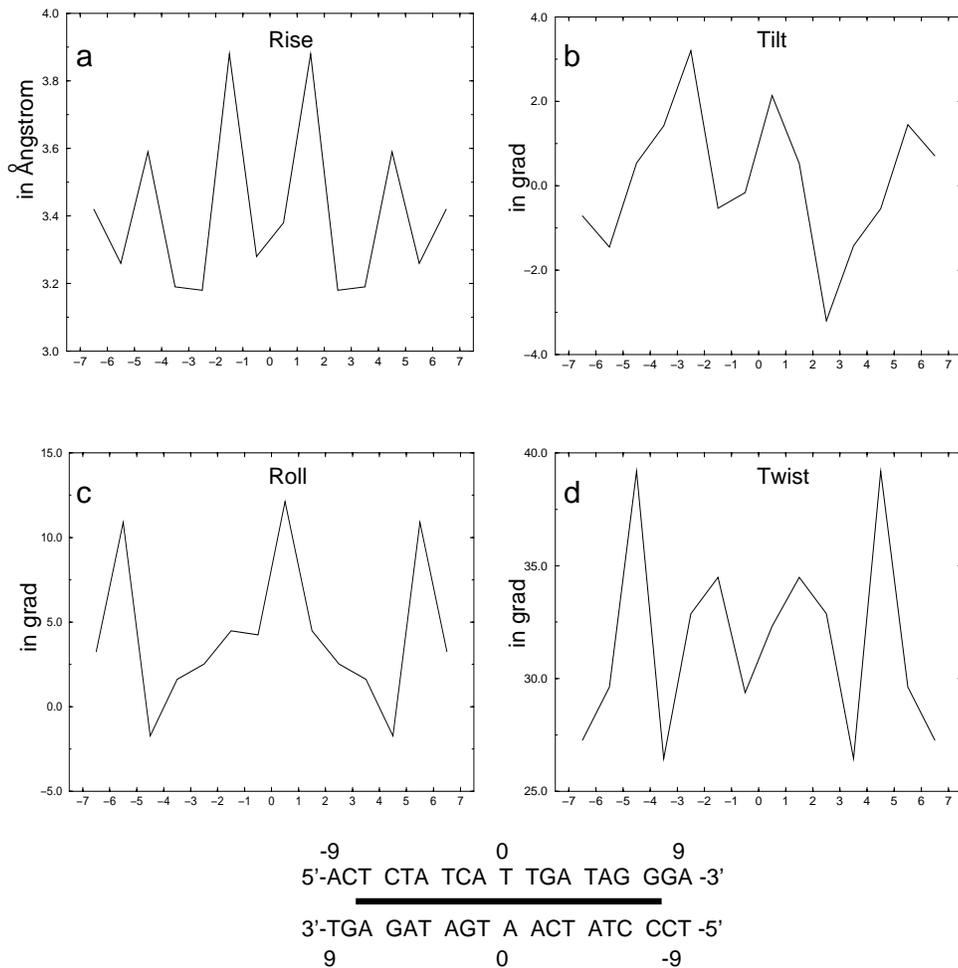


Abbildung 54: Geometrische Parameter zur Beschreibung der Basenpaarschritte
 Das untere Basenpaar ist fixiert, das obere wird in die Richtung mit positivem Vorzeichen bewegt. Die Helixachse ist als senkrechte Linie dargestellt, die gestrichelte Linie entspricht der Helixachse vor der geometrischen Änderung. Alle Ansichten sind von der großen Furche aus gesehen. "M" bedeutet große Furche, "m" bedeutet kleine Furche. Die Abb. wurde von Suzuki und Yagi ¹⁵⁹ übernommen.

Abbildung 55: Geometrie der Basenstapelung im TetR^D/15mer

Zur Analyse der Geometrie wurde das Programm *Curves* ^{91, 92, 133} verwendet. Der Verlauf der DNA ist gebogen, darum wurde in der Analyse erst eine optimale Helixachse bestimmt und, an ihr orientiert, die Basenpaar-Basenpaar-Parameter berechnet. Die Bedeutung der Parameter ist in Abb. 54 dargestellt. In den Graphiken sind die jeweiligen Werte an der Ordinate die Numerierung der Basen an der Abszisse gezeigt. Das zentrale Basenpaar des palindromischen Operators befindet sich an Position "0". Die Sequenz entspricht der des Operators *tetO1*. Die Mittelwerte der vier Parameter sind in der untenstehenden Tabelle im Vergleich zur A- und B-DNA ^{7, 97} aufgelistet.

Meßgröße	A-DNA	B-DNA	TetR ^D /15mer
Rise (a)	2.56 Å	3.38 Å	3.41 Å
Tilt (b)	20°	-5.9°	0.14°
Roll ^{56, 182} (c)	1.6°	1.2°	4.17°
Twist (d)	32.7°	36°	31.53°

Kontaktbereich zum HTH-Motiv. Diese Aufwindung wirkt destabilisierend für den DNA-Duplex, wie anhand der Kristallstruktur mit dem 18mer DNA-Strang in der Raumgruppe

P2₁ (Form 5) gezeigt werden kann. In dieser Kristallstruktur ist die DNA an den Enden aufgewunden; nur die zentralen 11 Basenpaare der palindromischen Sequenz bilden eine reguläre Doppelhelix.

Ein Unterscheidungsmerkmal zwischen A- und B-DNA ist die Konformation der Desoxyribofuranosen der DNA-Hauptkette. In der A-Form liegt der Furanosering in C_{3'}-endo-Konformation vor, in der B-DNA dagegen hat die Desoxyribose eine C_{3'}-exo bzw. C_{2'}-endo Konformation. Die Konformation der Desoxyribose bestimmt den Abstand der Phosphatgruppen, der in der A-DNA 5.9 Å und in der B-DNA 7.0 Å beträgt¹⁵⁶. Die Werte für die 15mer-DNA sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Die Breite der tiefen Furche beträgt unter Berücksichtigung der Van-der-Waals Radien in der regulären B-DNA 11.7 Å³⁵. Bei dem 15mer Duplex beträgt dieser Wert an der Protein/DNA-Kontaktstelle, also dort, wo die Erkennungshelix in die tiefe Furche zeigt, 14.4 Å und im zentralen Teil, der vom Protein wegzeigt, 9.5 Å. Das bedeutet, daß die große Furche im mittleren Teil des Operators komprimiert und an den Repressor/Operator-

Tabelle 12: Geometrie der DNA-Doppelhelix im TetR^D/15mer

Der Phosphat-Phosphat-Abstand wird jeweils als Abstand der Phosphoratome zwischen dem i-ten und dem i-1-ten Nukleotid angegeben. Cyt-7 hat an Position 5' keine Phosphatgruppe.

Die übrigen Werte wurden mit dem Programm *Curves*^{91, 92, 133} ermittelt.

Basenpaar	Desoxyribose	Phosphat- abstände in Å	Helix-Durch- messer in Å	Anstiege der Furchen in °	
				große	kleine
CYT -7	C2'-endo	-	-	-	
CYT -6	C1'-exo	-	19.7	-	
THY -5	C2'-endo	7.1	18.8	-	48
ADE -4	C3'-exo	6.3	19.6	39	29
THY -3	C2'-endo	7.1	20.4	39	31
CYT -2	C4'-endo	5.8	19.1	26	35
ADE -1	C2'-endo	6.3	19.2	56	34
THY 0	C2'-endo	6.8	19.5	37	44
THY +1	C2'-endo	6.7	19.1	55	32
GUA +2	C2'-endo	6.3	19.1	24	37
ADE +3	C1'-exo	7.0	20.4	39	30
THY +4	C2'-endo	6.5	19.6	38	32
ADE +5	C2'-endo	6.7	18.8	-	47
GUA +6	C2'-endo	7.1	19.7	-	
ADE +7	C1'-exo	5.7	-	-	

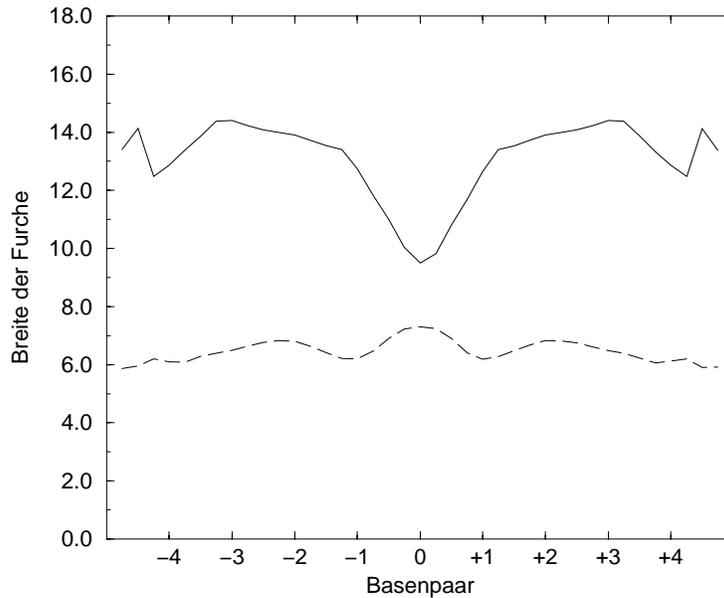


Abbildung 56: Breite der DNA-Furchen

Die Breite der Furchen wurde mit dem Programm `Curves`^{91, 92, 133} berechnet. Die durchgehende Linie präsentiert die Breite der großen Furche, die gestrichelte Linie die der kleinen Furche. Die Maxima für die große Furche entsprechen dem Teil der DNA, an dem die Erkennungshelizes die DNA kontaktieren, und das Minimum entspricht dem Operatorbereich, wo die große Furche auf der Repressor-abgekehrten Seite liegt.

Erkennungstellen aufgeweitet ist (siehe dazu Abb. 56). Die Folge dieser Deformation ist eine Biegung der DNA. Das Zentrum dieser Krümmung befindet sich in der zentralen Position "0" und die Basenpaare in Position 3 werden vom TetR^D weggebogen. Die gesamte Biegung beträgt über die zentralen 7 bp verteilt ca. 36°. Ab dem vierten Basenpaar biegt sich die DNA zum TetR^D. Diese Biegung verläuft in die entgegengesetzte Richtung im Vergleich zur Biegung im zentralen Teil des Operators. Diese Form der Biegung kommt in Protein/DNA-Komplexen häufig vor, da das DNA-Bindungsmotiv in der großen Furche die negativen Ladungen der DNA-phosphate durch positiv geladene Aminosäuren kompensiert. Die Abstoßungskräfte der Phosphatgruppen auf der Protein-abgekehrten Seite bewirken dadurch die Krümmung.

Die terminalen Basenpaare werden durch Kristallpackungseffekte deformiert und ihre Geometrie kann demzufolge von dem Zustand abweichen, in dem der TetR^D/DNA-Komplex in Lösung vorliegt¹⁵¹.

Die Biegung der DNA im zentralen Teil ist nicht gleichmäßig, sondern der Operator wird bei der Krümmung an den beiden Basenpaaren -2 und +2 geknickt (siehe Abb 59). Diese Form der Deformation wurde auch in anderen Protein/DNA-Komplexen wie zum

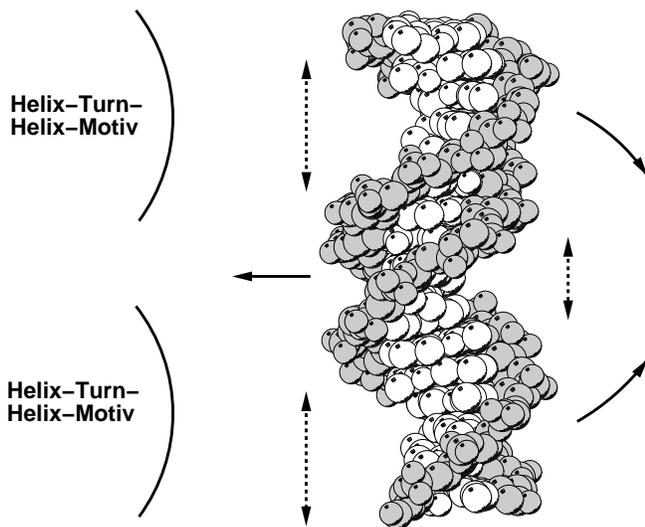


Abbildung 57: Biegung der DNA durch Änderung der Breite der tiefen Furche

Bei Verkleinerung der großen Furche auf der dem Repressor abgewandten Seite und bei Vergrößerung derselben an den beiden Bindungsstellen krümmt sich die DNA von Repressor weg. Die Größe der tiefen Furche ist jeweils als gestrichelter Doppelpfeil gezeigt. Die anderen drei Pfeile symbolisieren die Biegungsrichtungen des DNA-Doppelstranges. In dieser Abbildung befindet sich der Repressor auf der linken Seite. Die hellen Kugel stellen die Basen im Inneren der DNA-Helix dar. Die dunklen Kugeln präsentieren die beiden Hauptketten.

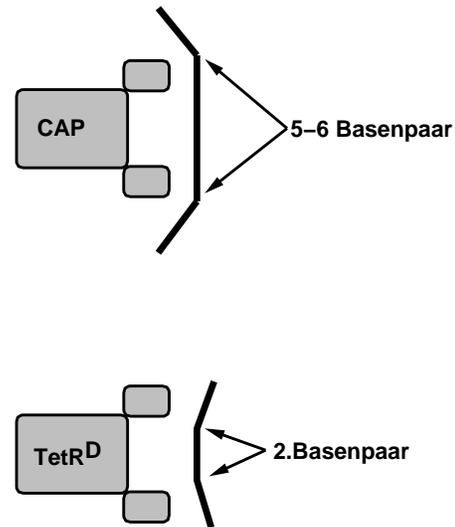


Abbildung 58: Knicke in der DNA in den Komplexen $TetR^D$ /DNA und CAP/DNA

Die DNA (jeweils der dicke Strich rechts) wird bei Bindung von $TetR^D$ und CAP (jeweils die drei Ellipsen für den Proteinkern und die beiden DNA-bindenden Domänen) an den angegebenen Position geknickt. Da die Knickstellen an unterschiedlichen Positionen vom Zentrum entfernt sind, verlaufen die DNA-Doppelstränge ab den Knickstellen in verschiedene Richtungen, entweder zum Protein (CAP) oder vom Protein weg ($TetR^D$).

Beispiel dem CAP-Protein beobachtet¹⁴⁴. Dort beträgt der Wert der Biegung über eine Operatorhalbseite 40° . Die Bindungsstelle des CAP-Proteins ist teilweise palindromisch und konzentriert sich auf einen Knick in der Mitte der Sequenz 5'-GTGA-3' zwischen dem 5 und dem 6 bp der CAP-Bindungsstelle, wo zwischen den Basenpaaren die Basenstapelung verloren geht. In dem FIS/DNA-Komplex wird ebenfalls eine Krümmung vermutet, die sich an einem TG-Schritt befindet¹⁶⁵.

An der Knickstelle des *tet*-Operators mit der Sequenz 5'-TTGA-3' bzw. 5'-ATGA-3' befindet sich wie bei der CAP- und der FIS-Bindungsstelle ein TG-Schritt in dem Operator. Die Deformation in beiden Operatoren ist ähnlich, aber in dem Komplex des CAP-Proteins ausgeprägter. Da aber der Knick sich beim *tet*-Operator zwischen den Basenpaaren 1 und 2 befindet, im Gegensatz zum Knick bei dem Operator des CAP-Proteins

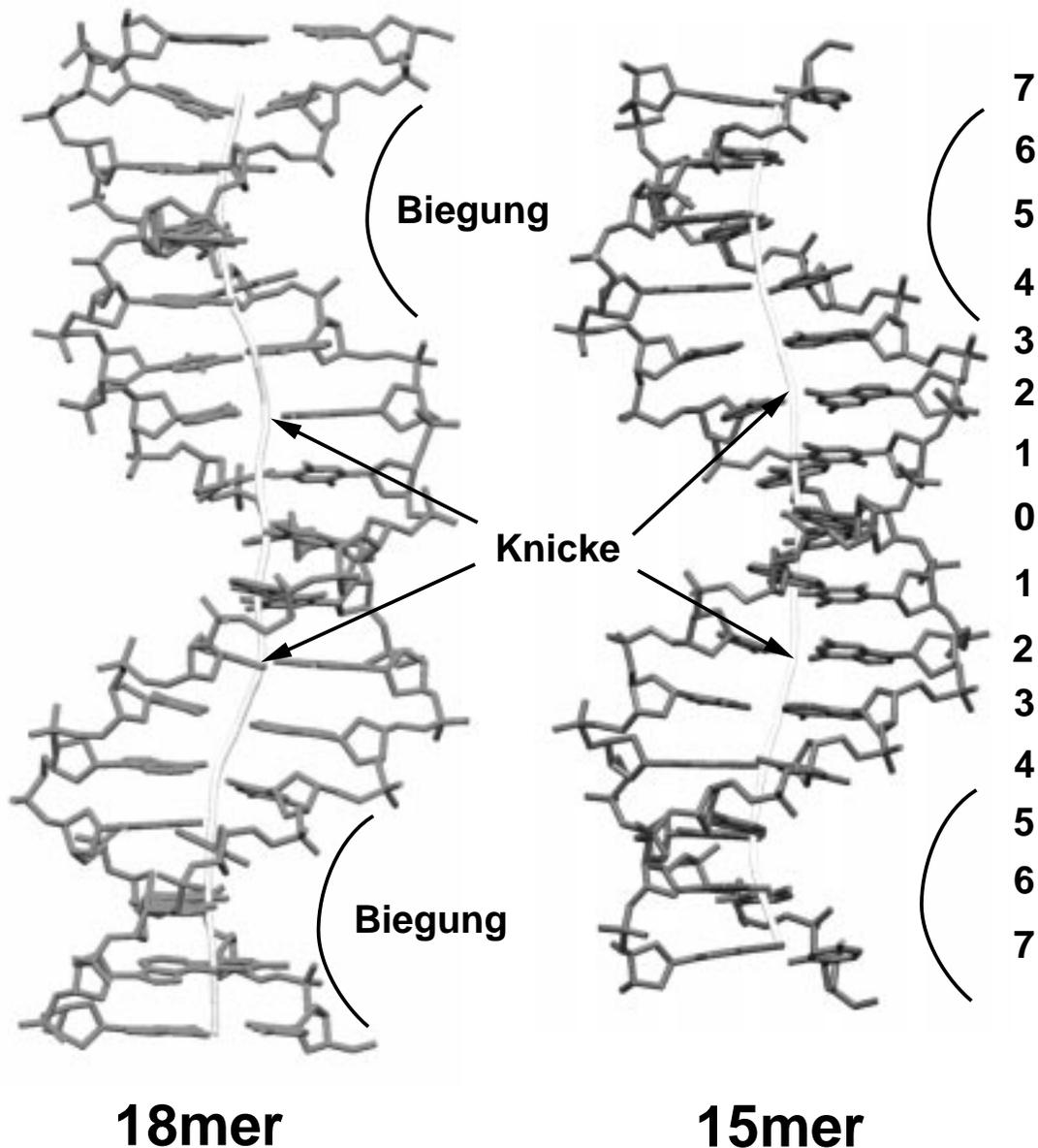


Abbildung 59: Verlauf der DNA-Helix in dem *tet*-Operator

Der Verlauf der DNA-Biegung wurde mit dem Programm *Curves*^{91, 92, 133} berechnet und ist in den beiden Operatoren (links das 17mer, rechts das 15mer) als durchgehende Linie eingezeichnet. Zwei Knickstellen befinden sich jeweils an den beiden Basenpaarpositionen "2". An diesen Stellen befinden sich die TG-Schritte. Eine weitere Krümmung, mit entgegengesetzter Orientierung befindet sich zwischen dem 3. und dem 7. Basenpaar. Diese Krümmung ist aber weniger ein Knick als eine gleichförmige Biegung.

(zwischen dem 5. und 6. bp), ist die Biegung des TetR^D-Operators entgegengesetzt zu der des CAP-Operators.

In dem 11 bp langen zentralen Teil des palindromischen *tet*-Operators gibt es nur zwei G/C-Basenpaare. In den Chromosomen sind es die GC-reichen Regionen, die die gleichförmige Biegung der DNA um die Histone ermöglichen¹³⁷. Der Operator ist deshalb

im mittleren Teil relativ linear. Knicke in der DNA-Doppelhelix kommen bevorzugt an AT-Schritte vor ¹⁶⁵.

Ein weiterer Parameter, der die Geometrie der DNA beschreibt, ist die relative Verschiebung der Basenpaare zueinander. Die Verschiebung kann parallel zur langen Achse der Basenpaare ("Slide") oder in Richtung der großen Furche verlaufen ("Shift"). Die beiden mittleren Werte betragen bei der 15mer-DNA jeweils -0.7 und 0.0 Å, was mit den Daten für B-DNA übereinstimmt. Die relativen Positionen der Basenpaare zur DNA-Helix bestimmen jeweils die Breite und die Tiefe der beiden DNA-Furchen. Sie sind entlang der 15mer-DNA konstant und betragen 4.5 und 5.3 Å für jeweils die kleine und die große Furche.

Strukturen der 18mer-DNA. Bei Verwendung des 18mer Operators wurden drei Kristallformen beobachtet und vermessen ¹¹⁷. Von zwei der drei Formen wurde die Struktur bis zu einer Auflösung von jeweils 3.9 bzw. 3.0 Å gelöst. Die Packung der Moleküle in den einzelnen Raumgruppen wurde bereits im Kapitel 4.2.2 analysiert. Dabei wurde festgestellt, daß in der Raumgruppe P2₁ die Operatorenden aufgewunden sind und nur die zentralen 11 bp eine B-DNA bilden. Mit den vorliegenden Daten konnten an einem DNA-Strang die Base Cyt-6 und die DNA-Hauptkette bis Cyt-7 in der Elektronendichte modelliert werden. An dem anderen Strang konnten die DNA-Hauptkette bis Cyt-7 und die Basen bis Thy+9 positioniert werden. Für die modellierten Basen Gua+6 bis Thy+9 ist der Desoxyribose/Phosphat-Strang nicht zu erkennen.

Die teilweise Aufwindung des Operators wirkt sich auf die TetR^D-DNA-Kontakte aus. Die beiden HTH-Motiv/Halboperator-Komplexe unterscheiden sich in dieser Kristallstruktur. So ist eine der beiden Seitenketten der Aminosäure Arg28 des TetR^D-Dimers von der Base Gua+2 weggedreht und zeigt zum Solvens. Die Wasserstoffbrücke zwischen Arg28 und Gua+2 wird also nicht gebildet. Dagegen liegt die Wasserstoffbrücke zwischen His44 und der Phosphatgruppe zwischen den Basen -7 und -8 vor; die Abstände an beiden Operatorhalbseiten betragen jeweils 2.9 und 3.3 Å. Alle anderen Protein-DNA-Kontakte stimmen im Rahmen der Fehlergrenze mit den Kontakten der Kristallstruktur von TetR^D/15mer überein. Zusätzlich bilden sich zwischen dem Carbonylsauerstoff von Lys46 und der Phosphatgruppe zwischen Ade+3 und Thy+4 ein Kontakt mit 3.7 Å Abstand aus. Desweiteren sind die basischen Seitenketten von Lys29 und Lys46 in einem Abstand von 4.0 bis 4.3 Å jeweils zu den Phosphaten der Basen "0" und Thy+4 in Kontakt. Diese drei Kontakte befinden sich aber nur an einer Operatorhalbseite, genau dort wo die Wasserstoffbrücke zwischen Gua+2 und Arg28 fehlt. Die Abstände an der anderen Operatorhalbseite betragen dagegen wie auch bei dem 15mer-Operator mehr als 5 Å.

Das bedeutet, daß eine Operatorhalbseite deformiert wird, so daß keine TetR^D-spezifische Erkennung vorliegt.

Auf der Grundlage dieser Kristallstruktur (Form 5) wurde für eine optimale Kristallpackung eine 15mer-DNA ohne Überhang vorgeschlagen. Die Form 7 entspricht dieser Packung, wobei anstelle der monoklinen eine orthorombische Raumgruppe vorliegt, die anstelle des gesamten TetR^D/Operator-Komplexes nur einen Komplex zwischen TetR^D-Monomer und DNA-Einzelstrang in der asymmetrischen Einheit enthält.

In der zweiten Kristallstruktur mit der 18mer-DNA (Form 4) bildet das zentrale 17mer eine reguläre B-DNA, die im weiteren eingehender beschrieben wird.

Bei der Analyse der Struktur TetR^D/18mer-DNA wurde besonderes Augenmerk auf die Position der terminalen Basenpaare und des 3'-terminalen Thymins gelegt. Im Vergleich zu TetR^D/15mer-DNA sind zusätzlich sechs Nukleotide in diesem Komplex vorhanden. Obwohl die Auflösung nur 3.9 Å beträgt, ist eindeutig zu erkennen, daß die terminalen Basenpaare zweier Duplexe eine Nukleinsäure-typische Basenstapelung ausbilden. Der Abstand dieser beiden Basenpaare (3.4 Å) entspricht der Stapelung im Inneren eines Operators. Die beiden 3'-terminalen Thymine bilden Kontakte zum Nachbarduplex aus. Sie befinden sich dort in der kleinen Furche und sind in Van-der-Waals-Kontakt mit dem vorletzten Basenpaar der Nachbar-DNA. Welche Wasserstoffbrücken an diesem Kontakt ausgebildet werden, ist wegen der geringen Auflösung und damit der ungenau bestimmten Position schwierig zu analysieren. Die mögliche Erkennung der terminalen Thymine ist mit zwei Modellen erklärt, die in Abb. 61 dargestellt sind. In beiden Modellen dient der Stickstoff an Position 3 des Thy+9 als Protonendonor. Von der DNA kommt innerhalb der kleinen Furche nur noch die Aminogruppe des Guanins als Protonendonor in Frage, so daß die terminalen Thymine sowohl als Donoren (mit N3), als auch als Akzeptoren (mit O4) gegenüber Guanin in Position +7 wirken können.

In der Kristallstruktur mit der 15mer-DNA konnten für His44 und die flexiblen Seitenketten Arg3 und Ser2 keine Kontakte zur DNA ermittelt werden, da der Operator zu kurz ist (siehe Abb. 62). Desweiteren muß die Position von Trp43 geklärt werden, die in der 15mer-DNA neben einem fehlgeordneten Basenpaar lokalisiert war. In der Kristallstruktur mit dem 2 bp längeren Operator lassen sich einige zusätzliche Kontakte ermitteln. Die Seitenkette Thr40 bildet mit O_γ eine Wasserstoffbrücke zu dem Phosphat von Cyt-6, und mit dem C_γ steht sie in Van-der-Waals-Kontakt zu dem Phosphat von Cyt-7 bzw. Thy-7. His44 bildet eine Wasserstoffbrücke zu dem Phosphat zwischen den Basen Cyt-7 (bzw. Thy-7) und Cyt-8. Die Aminosäuren des N-Terminus vor Leu4 konnten nicht modelliert werden. Damit fehlt auch die Position von Arg3.

Trp43 ist in Van-der-Waals-Kontakt zu Cyt-8. Der Abstand beträgt ca. 4 Å, und der

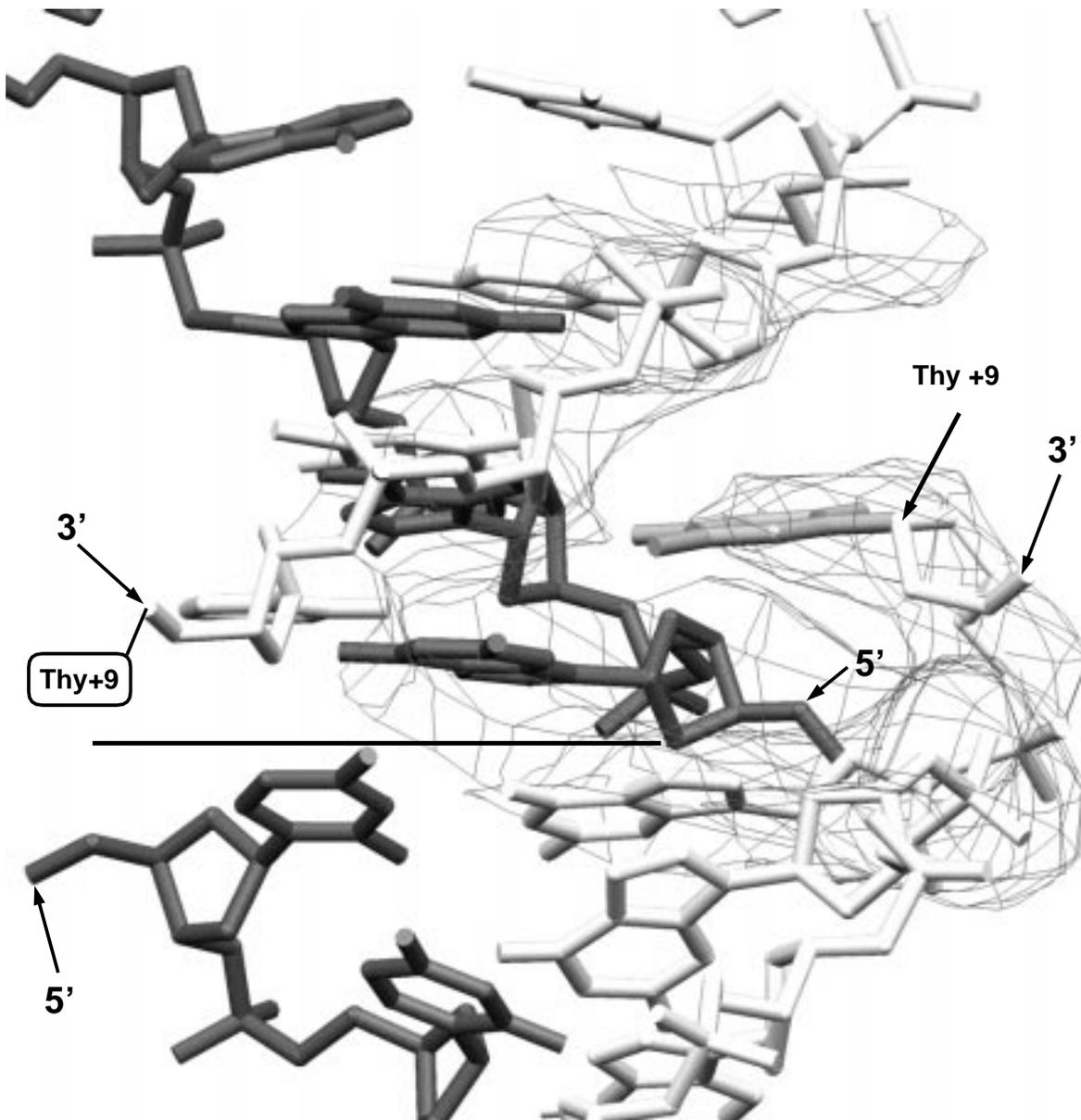


Abbildung 60: Position des 3' terminalen Thymins in TetR^D/18mer (hexagonale Form, Form 4)

Das überhängende 3'-terminale Thymin (+9) steht in Kontakt mit dem vorletzten Basenpaar des Nachbarduplexes und befindet sich in der kleinen Furche dieses Operators. In der Abb. sind jeweils ein DNA-Einzelstrang hell und der andere DNA-Einzelstrang dunkel dargestellt. Mit einem horizontalen Strich ist die Kontaktfläche zwischen den beiden Operatoren angedeutet. Zur Berechnung der Elektronendichte, die in der Abb. als Netz dargestellt ist, wurden aus dem Modell die beiden 3'-terminalen Thymine entfernt und eine Dichtemodifikation mit dem Programm `dm`²⁹ durchgeführt. Die Konturierung liegt bei einer Standardabweichung über dem mittleren Niveau der Elektronendichte. Das 3'-terminale Thymin des oberen Doppelstrangs wurde der Übersichtlichkeit halber weggelassen.

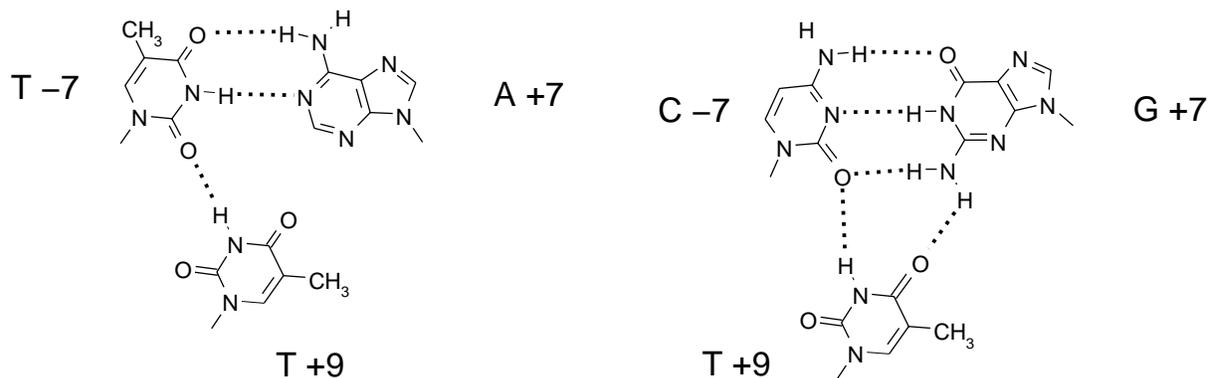


Abbildung 61: Zwei mögliche Wasserstoffbrückenmuster des 3'-terminalen Thymins in der kleinen Furche des Nachbarstrangs der Form 4

Die Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien dargestellt. Thymin kann in der kleinen Furche mit dem Watson-Crick Basenpaar Wasserstoffbrücken bilden. Dabei ist das Thymin in van-der-Waals-Kontakt mit dem vorletzten Basenpaar des Nachbarstranges (A-T/links oder G-C/rechts). Da dieses Basenpaar nicht palindromisch ist und aufgrund der unzureichenden Auflösung der Daten ist eine genauere Zuordnung nicht möglich.

Indolring steht senkrecht zur Base (siehe Abb. 62). Für die Seitenkette von Trp43 ist eine eindeutige Elektronendichte nach der Dichtemodifikation zu beobachten. Es bestand aber die Möglichkeit, daß der hydrophobe Indolring zwischen Basenpaare des Operators interkaliert. In einigen der bisher bekannten Protein/DNA-Komplexe sind solche Interkalationen von Aminosäuren in die DNA-Basenstapelung beobachtet worden¹⁷³. Dabei interkalieren die Aminosäuren über die kleine Furche wie im Fall des Purinrepressors¹⁴⁶, einer Domäne des SRY-Proteins¹⁷⁴ und des TATA-Box bindenden Proteins^{77, 76, 75}. Die Interkalation von Tryptophanseitenketten wird für die Bindung der SSB ("Single-Strand-Binding")-Proteine vorgeschlagen, die isolierte DNA-Einzelstränge binden¹⁸¹. Für ein synthetisches Tryptophanalogon konnte mittels NMR eine Interkalation in die Basenstapelung gezeigt werden¹¹⁰.

Im TetR^D ist die Seitenkette von Trp43 3.4 Å von Cyt-8 entfernt. Wenn die Seitenkette von Trp43 um die Bindungen C_α-C_β und C_β-C_γ gedreht wird, so ist der Abstand zur Base Cyt-8 nicht kürzer als 1 Å und eine mögliche Interkalation nicht zu beobachten.

Struktur der 13mer-DNA. In diesem 13 bp langen Operator fehlen an beiden Enden 3 Basenpaare zur vollen Länge der Operatoren *tetO*₁ und *tetO*₂. Trotzdem bildet sich wie bei den anderen Operatoren aus den beiden Komponenten der Repressor/Operator-Komplex. Die wichtigen sequenz-spezifischen Kontakte zwischen den Basenpaaren 2 bis 6 und TetR^D werden gebildet. Da aber die maximale Auflösung dieser Struktur nur bei 3.5 Å liegt, ist die Bestimmung der Länge der Wasserstoffbrücken relativ ungenau.

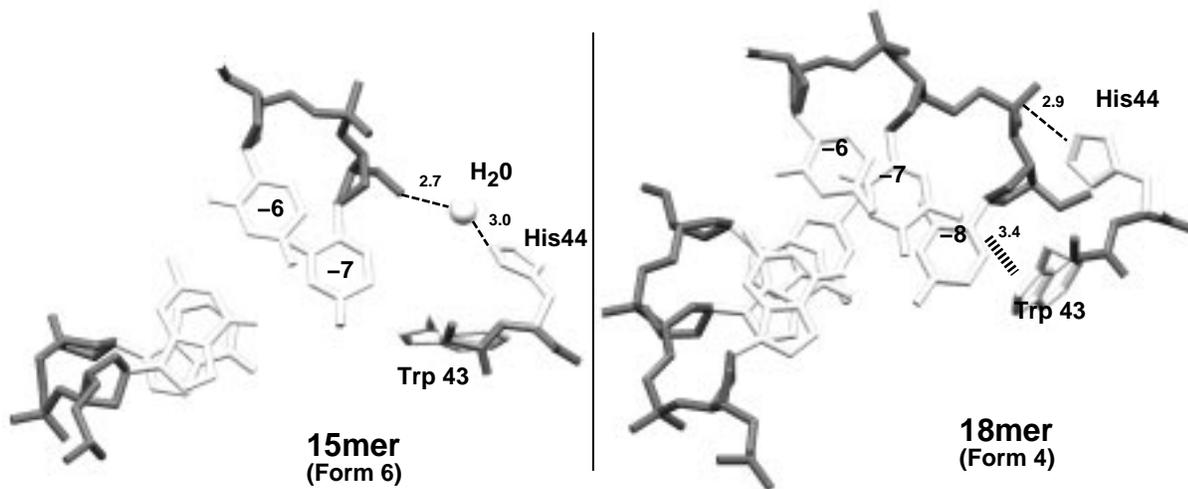


Abbildung 62: Kontakte von Trp43 und His44 zum *tet*-Operator

Dargestellt sind die beiden letzten Aminosäuren der Erkennungshelix, Trp43 und His44 und die letzten zwei (15mer, links) bzw. drei Basenpaare (18mer, rechts) des *tet*-Operators. Seitenketten sind jeweils weiß und die Hauptketten grau dargestellt. Die Blickrichtung ist parallel zur DNA-Doppelhelix und verläuft vom zentralen Basenpaar nach außen.

Rechts: His44 koordiniert in der 18mer-DNA an das Phosphat zwischen den Basen -7 und -8 (als dünne gestrichelte Linien gezeigt). An der Stelle des Phosphats befindet sich in der 15mer-DNA ein Wassermolekül. Trp43 ist in einem hydrophoben Kontakt mit der Base Cyt-8 (dicke gestrichelte Linien).

Links: Wegen Kristallpackungseffekten befindet sich der Indolring von Trp43 bei der 15mer-DNA neben Cyt-7/Thy-7. Da aber in der Struktur mit der 15mer-DNA in diesem Bereich eine Fehlordnung vorliegt, die in einer schlechten Elektronendichtekarte resultiert, kann hier nicht auf eine spezifische Erkennung geschlossen werden.

Aufgrund der Kürze des Operators, werden im Vergleich zu den anderen TetR/DNA-Komplexen keine DNA-DNA-Kontakte ausgebildet. Diese DNA-DNA-Kontakte entlang der "unendlichen" Helizes in den Formen 4 und 6 wirken sich möglicherweise negativ auf die Struktur der DNA aus. Die Deformation der Operatoren beruht eventuell auf der Kristallpackung, wobei die DNA-Moleküle gestaucht bzw. die beiden Knicke an den beiden Basenpaaren in Position 2 entstanden sind. Da in der Struktur des TetR^D/13mer-DNA keine "unendliche" DNA-Helix und damit solche Packungseffekt nicht vorliegen, läßt sich die Geometrie dieses Operators eher mit dem im freien Zustand vergleichen.

In Abb. 63 ist der Verlauf der DNA-Biegung dargestellt. Wie in den beiden Formen 4 und 6 ist der Operator an den Basenpaaren -2 und +2 geknickt; der weitere Verlauf der DNA ist geradlinig und stimmt mit dem der 15mer-DNA überein. Analog ist auch der Verlauf der Furchen in den beiden Komplexen. In der 13mer-DNA beträgt die Breite der großen Furche auf der TetR^D abgewandten Seite 9.5 bis 9.9 Å und auf der Seite zum Repressor 14.0 bis 14.4 Å. Dieselben Werte zeigen die Furchen in der 15mer- und der 18mer-DNA. Die Geometrie der Basenpaare zueinander wird hier nicht analysiert,

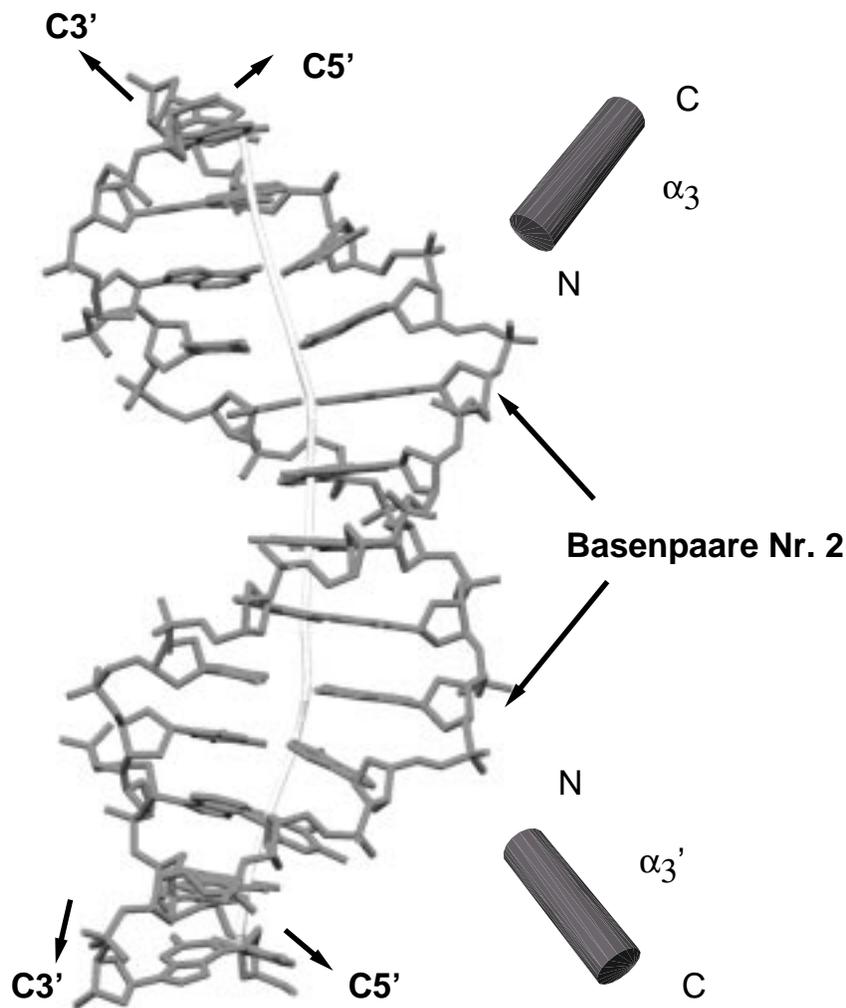


Abbildung 63: Verlauf der DNA-Helix in dem 13 bp langen Operator
 Der Verlauf der DNA-Biegung wurde mit dem Programm *Curves*^{91, 92, 133} berechnet. Die Knickstellen befinden sich jeweils an den beiden Basenpaarpositionen "2". Der Verlauf des Operators außerhalb dieser Knickstellen ist nahezu gradlinig (weiße Linie). Obwohl die DNA keine Kontakte zu benachbarten DNA-Fragmenten hat und deshalb aus Packungsgründen kaum deformiert sein kann, liegen die zwei Knicke an den Positionen -2 und +2 vor. Daraus läßt sich schließen, daß diese Verbiegung durch Bindung an TetR^D verursacht wird. Die DNA-Erkennungshelizes sind rechts als Säulen symbolisiert. Die Termini der DNA-Einzelstränge sind angegeben.

da bei der gegebenen Auflösung die Qualität der berechneten Elektronendichte für die Basenpaare eine genaue Positionierung der DNA-Basen nicht möglich macht.

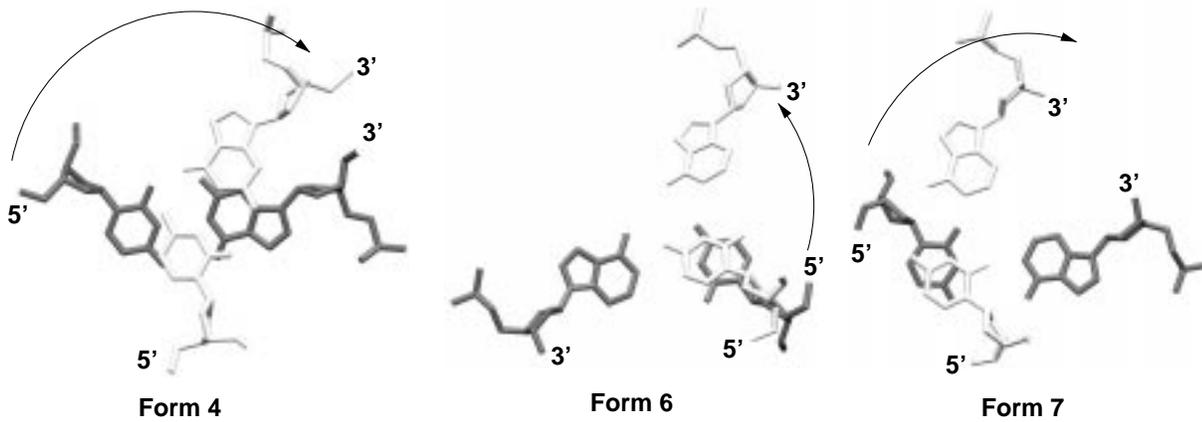


Abbildung 64: Basenpaarstapelung zwischen zwei Operatoren

Dargestellt sind jeweils die terminalen Basenpaare zweier kontaktierender TetR^D/DNA-Komplexe, wobei das Basenpaar in weiß sich im Fordergrund befindet. Die Enden der vier Oligonukleotide sind jeweils markiert. In allen drei Formen sind die beiden Operatoren gegeneinander versetzt.

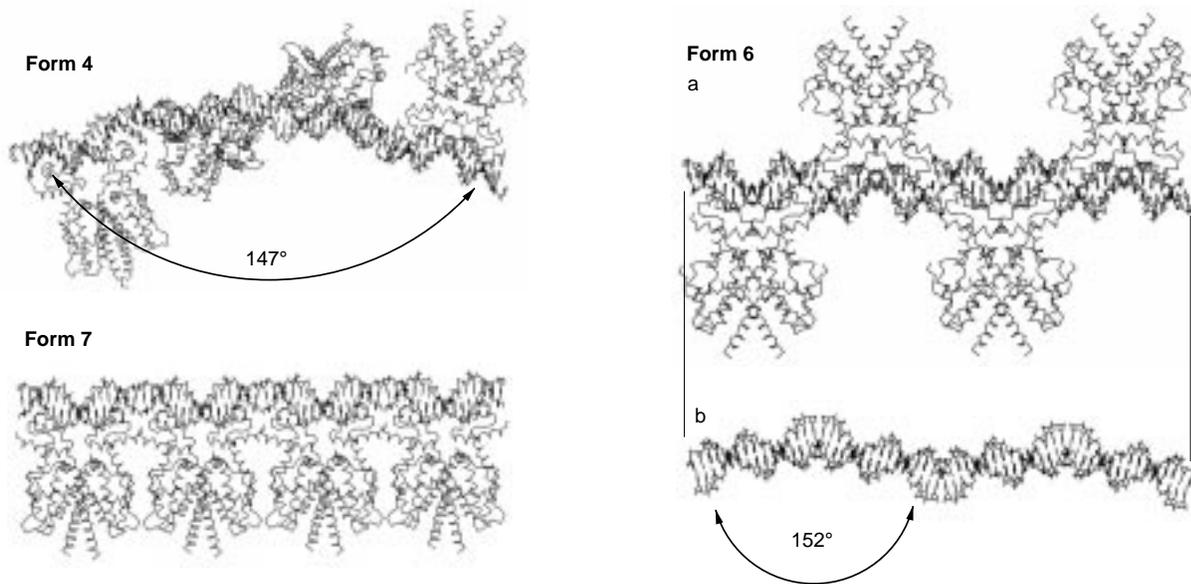


Abbildung 65: Struktur der "unendlichen" DNA

Dargestellt sind jeweils vier TetR^D/DNA-Komplexe, die über DNA/DNA-Kontakte miteinander verknüpft sind. In Form 4 bilden 6 Komplexe eine helikale Windung, so daß die TetR-Moleküle entlang der "unendliche DNA" um 60 ° zueinander versetzt sind. In Form 7 sind die Komplexe durch die Kristallsymmetrie aneinandergereiht, dagegen befinden sich in Form 6 die TetR-Moleküle auf gegenüberliegenden Seiten (a). In Abb. b ist Form 6 um eine horizontale Achse gedreht und die TetR-Moleküle wurden der Übersichtlichkeit halber weggelassen.

Struktur der "unendlichen" DNA In den Kristallformen 4, 5, 6 und 7 bilden die Operatoren durch Aneinanderreihen "unendliche" DNA-Stränge. Bis auf Form 5, wo die Enden aufgewunden sind, bestehen zwischen den terminalen Basenpaaren zweier benachbarter DNA-Duplexe DNA-ähnliche Stapelungen. Der Abstand zwischen diesen Basenpaaren beträgt 3.8 (Form 4) 3.2 (Form 6) und 5.9 Å (Form 7). Es bilden sich aber nicht die Basenpaar-Basenpaar-Stapelungen mit einem Helix-Twist von 36° , sondern die Basenpaare sind weiter versetzt zueinander (siehe Abb. 64). Die Rotation zwischen den terminalen Basenpaaren beträgt jeweils -110° (Form 4) 93° (Form 6) und -89° (Form 7). Diese Werte sind durch die relative Lage der Repressor/DNA-Komplexe in den jeweiligen Raumgruppen bedingt. So sind die Repressoren entlang der "unendlichen" DNA entweder auf der gleichen Seite, um 60° oder um 180° gegeneinander versetzt angeordnet (siehe Abb. 65).

Aufgrund der Kristallpackung sind die Operatoren in den Formen 4 und 6 gegeneinander gekippt (siehe Abb. 65), während sie in der Form 7 linear positioniert sind. Die Anordnung in den Formen 4 und 6 wirkt sich dabei weniger auf die globale DNA-Struktur, sondern eher auf die Geometrie der terminalen Basenpaare aus (siehe Kapitel 4.12.3).

Übereinstimmung der DNA-Struktur in den Formen 4, 5, 6 und 8. Bei der Kristallisation großer Moleküle ist es möglich, daß bei einer ungünstigen Kristallpackung flexible Bereiche in eine bestimmte Konformation gezwungen werden, mit anderen biochemischen Strukturinformationen im Widerspruch steht. Um dieses Problem zu umgehen, ist es wünschenswert, die zu untersuchenden Moleküle in verschiedenen Raumgruppen zu kristallisieren, um zwischen Packungseffekten und strukturspezifischen Konformationen unterscheiden zu können. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb die Kristallstrukturen des TetR^D/DNA-Komplexes in vier verschiedenen Raumgruppen diesbezüglich analysiert: P2₁, C222₁, P4₁2₁2 und P6₁22.

Die TetR^D/DNA-Komplexe unterscheiden sich nur in den Bereichen, in denen aufgrund verschiedener Kristallkontakte die Haupt- und Seitenkettenatome verschoben sind. Die Differenzen der Atompositionen im zentralen Bereiche der DNA-bindenden Domäne und der Operatoren liegen im Bereich des experimentellen Fehlers. Eine Ausnahme bildet ein Halboperator der monoklinen Raumgruppe (Form 5). Bei diesem Operator ist die Seitenkette von Arg28, die normalerweise zwei Wasserstoffbrücken zu Gua+2 ausbildet, von der DNA weggerichtet. Außerdem werden zusätzliche Wasserstoffbrücken ausgebildet, die eine Folge der entwundenen Operator-DNA sind (siehe Kap 4.12.3).

Die Abweichungen zwischen den Strukturen beschränken sich auf den N-Terminus, auf die Schleifenbereiche zwischen den Helizes 1 und 2 bzw. 2 und 3, als auch auf den

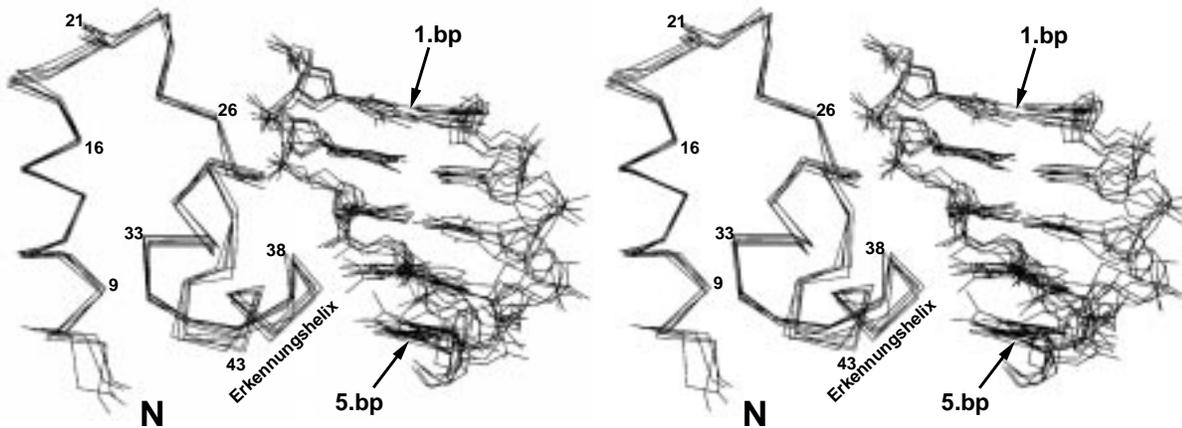


Abbildung 66: Vergleich der fünf TetR^D/DNA-Komplexe
 Stereodarstellung der TetR^D/DNA-Komplexe der Formen 4, 5 (beide HTH/Halboperatoren), 6 und 8. Gezeigt sind die C α -Atome der Aminosäuren 4 bis 48 und die Basenpaare 1 bis 5 der dazugehörigen Operatoren. Größere Abweichungen treten zwischen den einzelnen Proteinfragmenten insbesondere an den N-Termini und an den Enden der Erkennungshelices auf. Diese Bereiche unterscheiden sich in ihren Kristallpackungen zwischen den einzelnen Formen.

Tabelle 13: Vergleich der Strukturen des Dreihelixbündels und des Halboperators zwischen vier TetR^D/DNA-Komplexen

Als Basis des Strukturvergleiches wurde das TetR^D/15mer gewählt und alle anderen Komplexe dieser Struktur mit dem Programm `lsqkab` angepaßt. Für die Überlagerung wurden die ersten fünf Basenpaare der Operatorhalbseite und die Aminosäuren 4 bis 48 der entsprechenden DNA-bindenden Domäne verwendet. Für den Komplex in der Raumgruppe P2₁ wurde die Überlagerung mit beiden Drei-Helix-Bündel/Halboperatoren durchgeführt, da sie sich unterscheiden (siehe dazu Seite 104).

Form	Operator- länge	Raumgruppe	rms in Å	Aminosäurereste mit einer rms ≥ 1 Å
4	18	P6 ₁ 22	1.05	4, 23, 24, 43
5 (mit R28:Gua+2)	18	P2 ₁	1.26	4, 5, 42, 43, 46
5 (ohne R28:Gua+2)	18	P2 ₁	1.45	4, 5, 6
8	13	P4 ₁ 2 ₁ 2	1.23	4, 5, 6, 7, 18, 19, 35, 36, 43, 44

C-Terminus der Erkennungshelix (Helix 3), der in den verschiedenen Komplexen jeweils in unterschiedliche Kristallkontakte eingebunden ist.

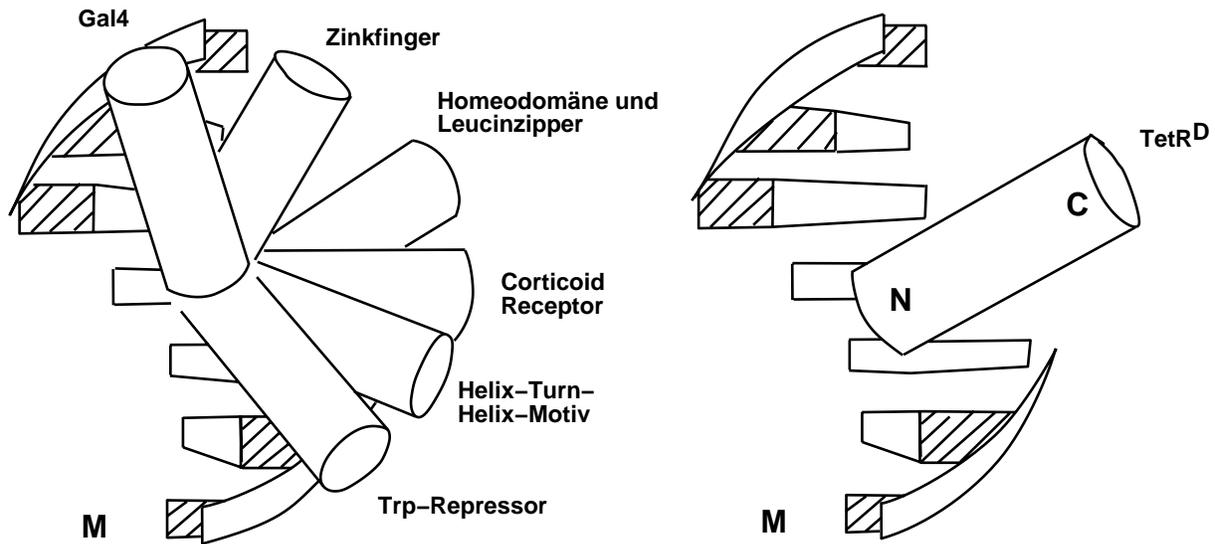


Abbildung 67: Position der α -Helix in Protein/DNA-Komplexen und bei TetR^D. Gezeigt ist die große Furche der DNA-Doppelhelix mit den in ihr positionierten α -Helices aus verschiedenen Protein/DNA-Komplexen (links) oder Helix 3 von TetR^D (rechts). Horizontal sind die DNA-Basen als Kästen angeordnet. Die Helices sind als Säulen dargestellt und sind entsprechend ihrer Klasse (Zinkfinger, Homeodomäne, Leucinzipper und Helix-Turn-Helix-Motiv) bzw. des Proteins (Gal4, Corticoid Receptor und Tryptophan-Repressor) bezeichnet. Die linke Darstellung wurde von Suzuki und Mitarbeitern übernommen¹⁵⁸. Der N-Terminus der Helices befindet sich im Zentrum, wo die Helices sich überschneiden. Bei TetR^D sind die Termini markiert. Das "M" symbolisiert die große Furche der DNA.

4.13 Orientierung des HTH-Motivs zur DNA

Die Erkennungshelices 3 und 3' liegen mit ihrer Achsen jeweils in zwei großen, benachbarten Furchen der DNA-Doppelhelix (siehe Abb 63). Diese große Furche besitzt in der B-DNA einen Winkel zur linearen DNA-Achse von 33° ¹⁸². Ungefähr denselben Winkel bilden die beiden Helices 3 und 3' in dem DNA-gebundenen TetR^D (siehe Abb. 67). Beide sind so orientiert, daß ihre N-Termini zum Zentrum des Operators zeigen und die C-Termini nach außen. Beide Helices sind tangential zur DNA-Helix positioniert und, da sie die DNA an verschiedenen Punkten kontaktieren, sind die α -Helixachsen gegeneinander gewinkelt. Der Winkel zwischen beiden Helixachsen beträgt ca. 65° .

Für eine Reihe von Protein-DNA-Komplexen wurde die relative Orientierung der DNA-bindenden α -Helix zur DNA-Doppelhelix bestimmt. Nach Suzuki^{158, 157, 160} läßt sich diese relative Orientierung in einem modifizierten Koordinatensystem beschreiben (siehe Abb. 67). Laut diesen Ergebnissen liegen die Erkennungshelices der HTH-Motive in einer Ebene, die senkrecht zur linearen DNA-Helix orientiert ist. Da die HTH-Motive häufig in Homodimeren vorkommen, bilden die beiden Erkennungshelices ein Paar antiparalleler α -Helices, die im Abstand von ca. 34 \AA in zwei aufeinanderfolgende große Fur-

chen der DNA-Doppelhelix binden. In HTH-Motiven liegen die Erkennungshelizes also nicht direkt in der großen Furche, da die DNA-Furche einen Anstiegswinkel von 30 bis 40° besitzt.

Im Vergleich mit anderen DNA-bindenden Proteinen läßt sich die Orientierung der Helix 3 von TetR^D zur tiefen Furche der DNA mit denen in den Klassen "Leucin-Zipper" und "Homeoproteine" vergleichen (siehe Abb. 67).

4.14 Strukturmodell der DNA-Kontrollregion der Resistenzdeterminante D

In Abb. 68 ist schematisch die gesamte Promotor/Operator-Region der Resistenzklasse D dargestellt. Als Grundlage wurden die hexagonale Kristallstruktur von TetR^D/18mer-DNA (Form 6) und ein mit dem Programm SCHNArP erzeugtes B-DNA Fragment gewählt. An die beiden Enden der 11 bp langen Linker-DNA zwischen den beiden Operatoren wurden die beiden TetR^D/DNA-Komplexe modelliert.

Da die Länge der Linkersequenz zwischen den Resistenzklassen B und D gleich ist

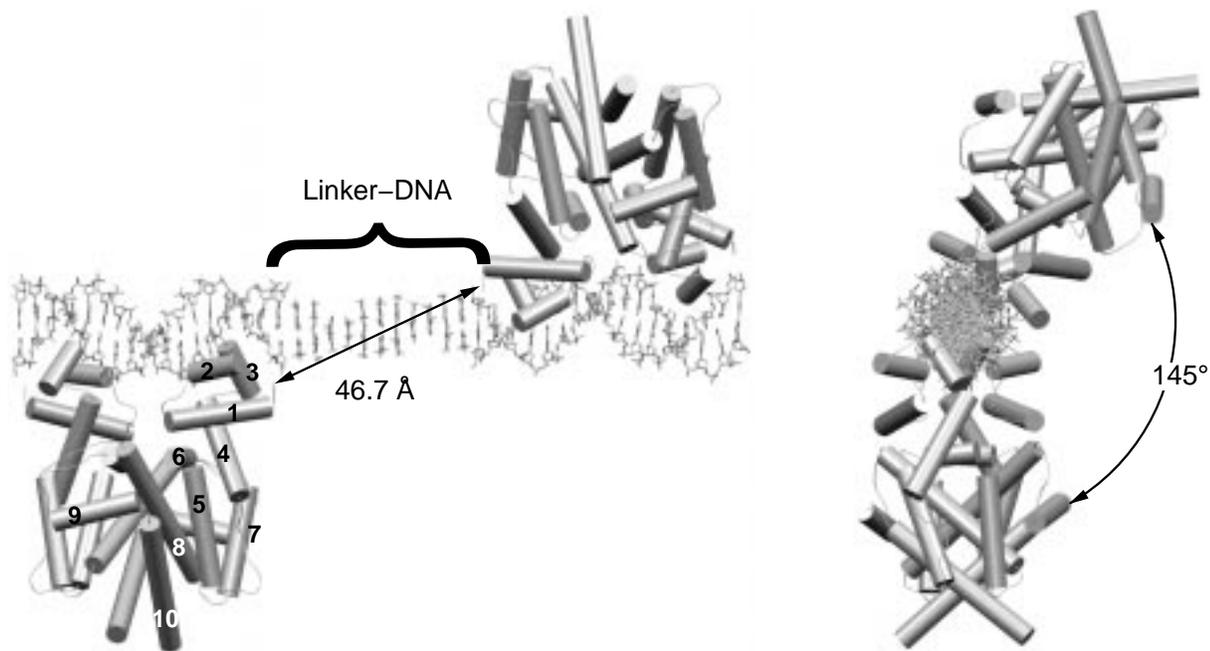


Abbildung 68: Modell der Promotor/Operator-Region der Resistenzklasse D. Das Modell ist in zwei Orientierungen dargestellt. Links ist die DNA horizontal, in der rechten Darstellung in Blickrichtung orientiert. Die beiden TetR^D-Moleküle sind mit jeweils 20 Helizes dargestellt. Zur Modellierung wurden die TetR^D/18mer-DNA-Komplexe (Form 4) und mit einer mit dem Programm SCHNArP¹⁰³ berechnete, 11bp lange ideale B-DNA verbunden. Die beiden TetR^D-Moleküle sind auf unterschiedlichen Seiten des Operators lokalisiert. Eine Überlappung der Proteine liegt nicht vor.

und die Strukturen der beiden Repressor/Operator-Komplexe vermutlich ähnlich sind, sollten die Gesamtstrukturen der Repressor/Operator-Region ebenfalls vergleichbar sein. Entsprechend den Neutronenstreuungs-Experimenten, die für die DNA-Kontrollregion der Resistenzdeterminante B durchgeführt wurden, beträgt der mittlere Abstand zwischen den beiden Repressoren 108 bis 116 Å (siehe Seite 93). Der kürzeste Abstand liegt zwischen 48 bis 52 Å. In dem in Abb. 68 dargestellten Modell sind die entsprechenden Werte 46.7 Å (von Leu4C_α bis Leu4C_α) und 114.6 Å (TetR^D-Schwerpunktsabstand). Wie auch Lederer *et al.* experimentell festgestellt haben⁹³, sind die beiden Repressoren voneinander getrennt und berühren sich nicht, in Übereinstimmung mit dem hier entwickelten Modell (Abb. 68).