

Repressoren sind Proteine, die im Wechselspiel mit Induktoren und Operatoren die Synthese von Enzymen in der Zelle regulieren. Der lac-Repressor sorgt dafür, daß dem Bakterium Escherichia coli die je nach Lactoseangebot im Nährmedium nötige Menge β -Galaktosidase zur Verfügung steht. Aus E. coli hat sich der lac-Repressor isolieren lassen. Der Fortschrittsbericht beschreibt den Weg zu allen diesen Erkenntnissen sowie die Bildung und Wirkungsweise des Repressors.

1. Einleitung

Einige der Mechanismen, die die Proteinsynthese in Bakterien begrenzen und regulieren, sind im Lauf der letzten Jahre bekanntgeworden. Das Bakterium *Escherichia coli* ist für eine solche Analyse besonders geeignet, da sein Chromosom insgesamt nur 3000 Proteine codieren kann. Sie alle werden in Übereinstimmung mit dem „zentralen Dogma“ der Molekularbiologie gebildet:

DNA $\xrightarrow{\text{Transcription}}$ RNA $\xrightarrow{\text{Translation}}$ Protein

Die *Coli*-DNA wird in Abschnitten transkribiert, die jeweils 1 bis 20 Gene umfassen. Die Start- und vermutlich auch die Abbruchpunkte der Transcription sind fixiert. Die Signale für den Start der Transcription haben den Namen Promotoren erhalten. Ihre Basensequenz ist bisher unbekannt.

Es ist klar, daß nur wenige Protein synthetisierende Systeme in einer Zelle zur gleichen Zeit voll in Aktion sein können. Wäre dem nicht so, so würde sich die Zelle mit unnötigem Protein füllen, würde langsamer wachsen und in der Evolution benachteiligt sein. Eine in Gegenwart von Glycerin wachsende *E.coli*-Zelle benötigt z. B. Enzyme zum Abbau des Glycerins, aber nicht die β -Galaktosidase, die Lactose abbaut. Von diesem Enzym enthält sie nur wenige Moleküle. Wachsen die Bakterien aber einige Generationen lang in Gegenwart von Lactose, so steigt der β -Galaktosidase-Spiegel auf das 500-fache an: ungefähr 2% des löslichen Proteins sind jetzt β -Galaktosidase. Ähnlich drastische Änderungen der Proteinmenge finden sich bei vielen katabolischen Enzymsystemen, die Zucker, Aminosäuren oder Lipide abbauen, und bei vielen anabolischen Systemen, die Aminosäuren oder Vorläufer von Nucleinsäuren synthetisieren.

1961 schlugen Jacob und Monod einen negativen Regulationsmechanismus für das Lactose-System vor^[1]. Die biochemische Verwirklichung der negativen Regulation ist einfach: eine reversible sterische Hinderung des Prozesses, der reguliert werden soll, genügt. Sie kann sich auf jeder Stufe des Prozesses abspielen. Die Hemmung des ersten Schrittes der Proteinsynthese erscheint als be-

sonders wahrscheinlich, aber die Hemmung späterer Stufen ist ebenfalls möglich. Nach der Theorie von Jacob und Monod haben die Strukturgene des Lactose-Systems eine negativ regulierte Startregion für die Transcription. Dafür werden zwei Regulationselemente benötigt: 1. ein diffundierbares Genprodukt (der Repressor), das in der Lage ist, mit einem „Signal“ (dem Induktor) in Wechselwirkung zu treten, und 2. eine DNA-Region (der Operator), nahe dem Promotor, mit der der Repressor gleichfalls in Wechselwirkung tritt, so daß Beginn oder Fortgang der Transcription blockiert werden. Die negative Regulation durch sterische Hinderung, und die Unterscheidung zwischen dem regulatorischen Apparat einerseits und den zu regulierenden Proteinen andererseits, sind die grundlegenden Aspekte des Modells. Diese Theorie hat sich in allen ihren Teilen als korrekt erwiesen.

2. Das i-Gen und der lac-Repressor

2.1. Das System

Das Lactose-System ist im Lauf der letzten 25 Jahre eingehend untersucht worden^[2]. Abbildung 1 zeigt eine schematische Genkarte des Lactose-Systems in *E. coli*. Das System enthält drei eng miteinander verbundene Strukturgene, z, y und a, die die Information für die β -Galaktosidase (z), die lac-Permease (y) und die Transacetylase (a) enthalten. Sie werden in ein Molekül messenger-RNA (m-RNA) transkribiert^[1]. Die Ableserichtung läuft von z nach a^[1,3]. Zwischen der für den Start

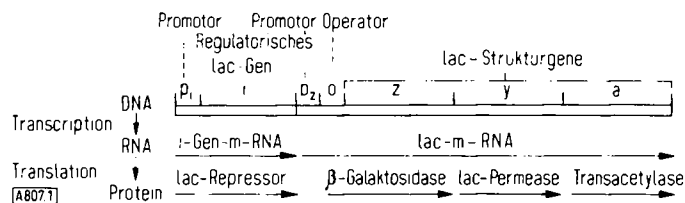
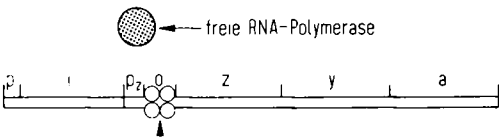


Abb. 1. Das Lactose-System aus *E.coli*: DNA macht RNA, RNA macht Protein – das ist das Dogma der Molekularbiologie. Am regulatorischen i-Gen wird die i-Gen-messenger-RNA synthetisiert, die in das Repressor-Protein übersetzt wird. An den lac-Strukturgenen wird die entsprechende messenger-RNA gebildet, die in drei Proteine übersetzt wird: β -Galaktosidase, lac-Permease und Transacetylase. Die Promotor-Orte (p) sind die Startstellen der Transcription. Am Operator (o) wird die Synthese des lac-Messengers reguliert. Die Abbildungen 1 bis 3 sind nicht im korrekten Maßstab gezeichnet.

[*] Prof. Dr. B. Müller-Hill
Institut für Genetik der Universität
5 Köln-Lindenthal, Weyertal 121

der Transcription verantwortlichen DNA-Region, dem Promotor (p₁), und dem Beginn des Z-Gens liegt eine DNA-Sequenz, an die sich der Repressor in Abwesen-



[A8072] Repressor-Operator-Komplex

Abb. 2. Repression: Der Repressor ist an die Operator-DNA gebunden. Die RNA-Polymerase-Moleküle können nicht an ihre Startstelle p₂ (Promotor) gelangen, um an den lac-Struktur-Genen messenger-RNA zu synthetisieren. Auch am Promotor p₁ des i-Gens befindet sich keine RNA-Polymerase: er gilt als schlechter Promotor. Nur sehr selten wird eine Transcription des i-Gens mit Erfolg gestartet. Das cap-Protein [65] und cyclische AMP [64] sind in den Abbildungen 2 und 3 weggelassen (siehe Abschnitt 3.7).

heit von Induktor bindet (Abb. 2)^[4]. Diese Region wird Operator (o) genannt. Ist der Repressor an den Operator gebunden, kommt es nicht zur Transcription der lac-Strukturgene. Promotor, Operator und die Strukturgene bilden zusammen ein Operon. Der Repressor wird durch ein Gen, das i-Gen, codiert, das sich links an den Promotor p₁ anschließt. Das i-Gen wird ebenfalls von links nach rechts transcribiert, so daß sich sein Promotor (p₁), das heißt die Startstelle seiner Transcription, an seinem linken Ende befindet^[5]. Die Reihenfolge aller lac-loci ist also p₁, i, p₂, o, z, y, a.

Das Produkt des i-Gens, der lac-Repressor, verhindert den Start oder das Fortschreiten der Transcription der lac-Strukturgene in Abwesenheit von Induktor. In Gegenwart eines Induktors hört die Wechselwirkung zwischen Repressor und Operator auf, die Transcription

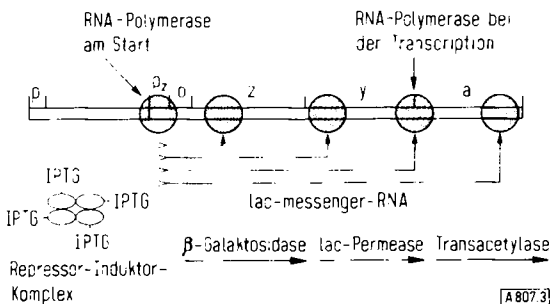
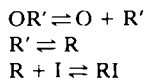


Abb. 3. Induktion: Der Induktor wurde zugefügt. Alle Repressor-Moleküle befinden sich in Repressor-Induktor-Komplexen, die sich nicht an den Operator binden können. Der Operator ist frei. Ein RNA-Polymerase-Molekül ist dabei, von der Promotorstelle des Struktur-Gens aus seine Reise auf der DNA zu starten. Die Transcription beginnt. Bevor die Polymerase das Ende des Strukturgens erreicht, beginnen andere Polymerase-Moleküle ihre Reise. Die langen Ketten der bereits transcribierten messenger-RNA hängen von den RNA-Polymerase-Molekülen herab. An ihnen werden die Struktur-Proteine synthetisiert.

kann ablaufen (Abb. 3). Der Repressor existiert in zwei Formen: die eine Form (R) ist in der Lage, den Induktor (I), aber nicht die Operator-DNA (O) zu binden. Die andere Form (R') kann die Operator-DNA (O), aber nicht den Induktor (I) binden. Da die Induktion rasch verläuft, muß sich das Gleichgewicht zwischen den Formen R und R' rasch einstellen:



Das ist die klassische Interpretation der Induktion. Wie wir später sehen werden, ist sie nur teilweise richtig: ternäre Komplexe (ORI) spielen ebenfalls eine wichtige Rolle.

2.2. Eigenschaften des Wildtyp-i-Gen-Produktes: Spezifität der Induktion

Lactose erhöht die Geschwindigkeit der β-Galaktosidase-Synthese in *Escherichia coli*. Das Produkt des y-Gens (lac-Permease) ist nötig für das Eindringen der Lactose in die Zelle^[6]. Eine y⁻-Mutante, die also kein aktives y-Gen-Produkt erzeugt, kann durch Lactose

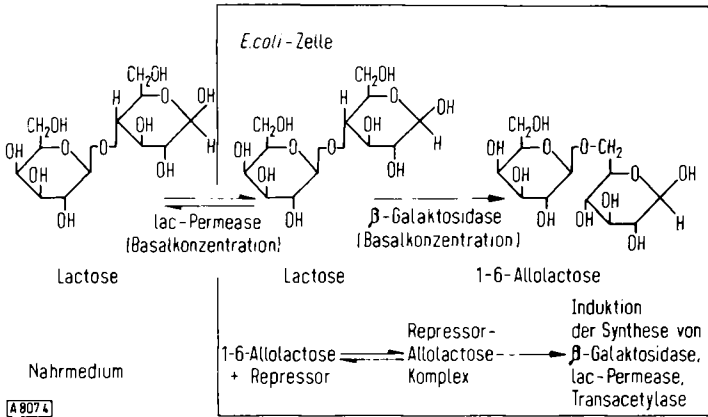


Abb. 4. Induktion mit Lactose: Zunächst muß Lactose in die Zelle eintreten. Dazu ist lac-Permease erforderlich, von der auch in uninduzierten Zellen immer einige Moleküle vorhanden sind. Die Lactose muß dann auf ein β-Galaktosidase-Molekül treffen. Nicht induzierte Zellen enthalten einige Moleküle β-Galaktosidase. Hier wird die Lactose entweder hydrolysiert oder in ein Lactose-Isomer (1-2-, 1-3-, 1-6-Allolactose) umgewandelt. Nur 1-6-Allolactose kann an den lac-Repressor gebunden werden.

nicht zur Bildung der Enzyme für den Lactose-Abbau induziert werden, weil die Lactose nicht in die Zelle eindringen kann. Hat die Lactose Eintritt in die Zelle gefunden, so ist sie immer noch zur Induktion unfähig^[7]. Sie muß zunächst durch die wenigen Moleküle β-Galaktosidase, die auch in einer nicht induzierten Zelle vorhanden sind, in den richtigen Induktor umgewandelt werden. β-Galaktosidase spaltet nicht nur Lactose in Galaktose und Glucose, sondern überträgt auch den Galaktoseteil der Lactose auf geeignete Acceptoren^[8]. Als solche können Moleküle dienen, die aliphatische Hydroxygruppen tragen. Unter den Produkten der Galaktose-Übertragung sind das 1-6-Isomer der Lactose (Allolactose) und das Galaktosido-β-D-glycerin Induktoren des lac-Systems^[7,9]. Andere Lactose-Isomere, die ebenfalls gebildet werden, haben sich als inaktiv erwiesen. Die gesamte Reaktionskette ist in Abbildung 4 wiedergegeben.

Um die experimentellen Komplikationen, die damit verbunden sind, zu umgehen, hat man Galaktoside synthetisiert, die auch in Abwesenheit der Permease in die Zelle eindringen können, die auch ohne vorherige Einwirkung von β-Galaktosidase Induktoren sind, und die durch β-Galaktosidase nicht hydrolysiert werden^[10,11]. Der wirksamste dieser synthetischen Induktoren ist Isopropyl-1-thio-β-D-galaktopyranosid (IPTG). Es wirkt bei einer niedrigeren Konzentration induzierend als alle anderen

lac-Induktoren, und unter Sättigungsbedingungen erzeugt es die kräftigste β -Galaktosidase-Synthese.

Jede Analyse der Konzentrationsabhängigkeit der Induktion hat zur Voraussetzung, daß die Konzentration des Induktors innerhalb der Zelle bekannt ist. Die Ionenkonzentration muß nicht gleich der Außenkonzentration im Nährmedium sein, da der Induktor in der Zelle angehäuft werden kann. Das ist der Fall^[12] beim 1- β -D-Galaktosidoglycerin, von dem man eine Zeit lang annahm, es sei der wirkungsvollste Induktor des lac-Systems^[7].

Unter den synthetischen Zuckern hat man solche gefunden, die die Induktion hemmen^[9]. Der am besten untersuchte dieser Antiinduktoren ist das o-Nitrophenyl- β -D-fucopyranosid (ONPF). Man kann sich seine Wirkung durch Bindung an die Form des Repressors vorstellen, die sich an den Operator bindet^[13], so daß der Operator-Repressor-Komplex stabilisiert wird. Es überrascht nicht, daß es mehrere Zucker gibt, die zu beiden Klassen gehören: sie induzieren schwach, und sie hemmen die Induktion schwach. Man hat sie paradoxe Verbindungen^[14] genannt. Die Strukturunterschiede zwischen Induktoren, Antiinduktoren und inerten Verbindungen sind ziemlich klein (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1. Spezifität von Induktion und Antiinduktion.

Induktoren: 1-6-O- β -D-Galaktopyranosyl-D-glucose [7, 9] Isopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranosid [11]	
Antiinduktor: o-Nitrophenyl- β -D-fucopyranosid [9]	
Schwacher Induktor und schwacher Antiinduktor: p-Aminophenyl-1-thio- β -D-galaktopyranosid [14]	
Inerte Analoge: 1-4-O- β -D-Galaktopyranosyl-D-glucose (Lactose) [7, 9] p-Nitrophenyl- β -D-fucopyranosid [9] o-Nitrophenyl-1-thio- β -D-fucopyranosid [9]	

2.3. Mutanten des i-Gens

Das i-Gen ist durch eine große Zahl von Mutanten charakterisiert, die in verschiedenen Phänotypen auftreten (Tabelle 2). Sie lassen sich in zwei Klassen einteilen: Mutanten, die nicht mehr reprimieren, und Mutanten, deren Fähigkeiten zur Bindung von Induktoren verändert sind.

Mutanten der ersten Klasse, in denen sich das Produkt des i-Gens nicht mehr wirksam an den Operator bindet, sind konstitutiv, das heißt, sie produzieren unter allen Umständen große Mengen von β -Galaktosidase^[1]. Man bezeichnet sie als i^- (das Minus-Zeichen deutet die Abwesenheit eines aktiven i-Gen-Produktes an). Zwei Klassen solcher i^- -Mutanten sind gefunden worden: Rezessive^[1] und transdominante (i^{-d})^[15, 16]; mit „rezessiv“ ist gemeint, daß die Einführung eines zweiten funktionierenden i^+ -Gens in eine Zelle, die bereits ein i^- -Gen trägt, zur Repression führt. Das neue i^+ -Gen produziert aktiven Repressor, der durch eventuell vorhandene Produkte des i^- -Gens nicht beeinflusst wird. „Transdomi-

Tabelle 2. Mutationen im i-Gen.

Genotyp	Biolog. Phänotyp(i^- 'y')	Molekularer Phänotyp	Lit.
i^+	Wildtyp, induzierbar, wächst auf Lactose	Ca. 10 Moleküle normaler Repressor pro Zelle	[1]
i^-	Konstitutiv, wächst auf Lactose	Der mutierte Repressor bindet nicht an den Operator. Er stoppt nicht die Transcription der lac-Strukturgene	[1]
i^{-d}	Konstitutiv, transdominant, wächst auf Lactose	i^{-d} -Repressor bindet nicht an den Operator. Bildet mit i^+ -Repressor gemischte i^-/i^{-d} -Oligomere, die sich ebenfalls nicht an den Operator binden	[15, 16]
i^s	Normale basale β -Galaktosidaseaktivität, keine Induktion mit niedrigen Induktorkonzentrationen, transdominant über i^+ , wächst nicht auf Lactose	Repressor bindet den Operator, aber schlecht oder gar nicht den Induktor	[23]
i'	Konstitutiv, β -Galaktosidase-Synthese wird durch einige Galaktoside reprimiert	Noch wenig untersucht	[20, 21]
i^{TL}	Konstitutiv bei hoher Temperatur, bei niedriger Temperatur wie Wildtyp, wächst auf Lactose	Repressor ist temperaturempfindlich	[22]
i^{TSS}	Konstitutiv bei hoher Temperatur, bei niedriger Temperatur wie Wildtyp, wächst auf Lactose	Repressor-Untereinheiten sind temperaturempfindlich, der tetramere Repressor ist stabil	[22]
i^l	Induktion durch subnormale IPTG-Konzentrationen, wächst auf Lactose	Repressor bindet IPTG fester als normal	[16]
i^q	Wildtyp, wächst auf Lactose	Ca. 200 Moleküle normaler Repressor pro Zelle	[16]
i^{superq}	Wildtyp, wächst auf Lactose	Ca. 1000 Moleküle normaler Repressor pro Zelle	[19]

nant“ bedeutet dagegen, daß der konstitutive Charakter des i^- -Gens über den i^- -Charakter des anderen i-Gens dominiert. Zu den rezessiven gehören: a) die „nonsense“- i^- -Mutanten^[17, 18], in denen nur das amino-terminale Ende des i-Gen-Produktes hergestellt wird, b) einige, aber nicht alle i-Gen-Deletionen (Mutanten, deren i-Gen teilweise oder vollständig fehlt), und c) einige, aber nicht alle „missense“-Mutationen, in deren i-Gen-Produkt eine Aminosäure durch eine andere ersetzt ist. Unter den transdominanten Mutationen sind drei „missense“-Mutationen^[15, 16], aber auch drei Deletionen gefunden worden^[19], die alle in das Aminoende hineinreichen. Ihr Verhalten kann durch negative Komplementation (d. h. die Bildung von gemischten i^-i^{-d} -Oligomeren)^[16] erklärt werden: der i^{-d} -Charakter einer Untereinheit „verdirbt“ alle „guten“ i^+ -Untereinheiten. Das ist insofern möglich, als der normale Repressor ein Tetrameres ist (siehe unten). Denkbar wäre auch, daß der i^{-d} -Repressor an den Operator gebunden wird, ohne daß Repression eintritt. Es gibt auch i^- -Mutanten, in denen der Repressor nach Zugabe von synthetischen Zuckern wie IPTG, ONPF oder DTG (Thiodigalaktosid) an

den Operator gebunden wird^[20, 21]. Sie haben die Bezeichnung i^R bekommen. In den meisten dieser Fälle ist die Repression nicht quantitativ.

Zwei Klassen von temperaturempfindlichen i^- -Mutanten sind isoliert worden^[22]: Mutanten, in denen das i -Gen-Produkt selbst temperaturlabil ist (i^{T1}), und Mutanten, in denen ein Vorläufer (die Untereinheit) des Repressors temperaturlabil ist (i^{TSS}).

Es gibt zahlreiche Mutanten, in denen IPTG oder Lactose bei den üblichen Konzentrationen nicht induzieren. Der Phänotyp solcher Mutanten ist lac^- , das heißt sie können auf Lactose nicht wachsen. Sie sind transdominant. Der Defekt liegt im i -Gen, ihre Bezeichnung ist i^s ^[23]. Sie sind ziemlich selten. Nur 0.2 % unabhängiger lac^- -Mutanten haben diesen Genotyp. Man kann annehmen, daß in ihnen die Bindung des Induktors an den Repressor schwächer ist oder, weniger wahrscheinlich, daß die Bindung noch fest ist, aber daß der Repressor auch in Gegenwart des Induktors an den Operator gebunden wird. Revertanten dieser Mutanten, die auf Lactose wachsen können, sind fast vollständig vom Typ i^- oder o^c (siehe unten), weil es viel leichter ist, das i -Gen durch eine Mutation zu stören, als genau das Basenpaar zu revertieren, das aus dem ursprünglichen i^- einen i^s -Typ gemacht hat. Eine seltene Mutante (i^l) ist isoliert worden, in der die Bindung des Repressors an IPTG fester als normal ist^[24].

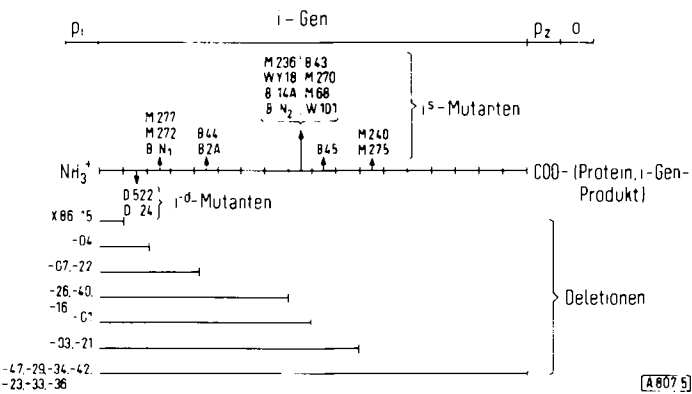


Abb. 5. Genkarte des i -Gens: Sechzehn i^s - und zwei i^d -Mutanten wurden mit siebzehn TonB-i-Deletionen kartiert. Die Deletionen X8600 stammen aus der Sammlung von J. Miller, die Stämme Nr. 86, 101, 236, 240, 277, 272 und 275 aus der Sammlung von B. Müller-Hill, die Stämme Nr. N1, N2, 2A, 14A, 43, 44 und 45 aus der Sammlung von S. Bourgeois, Stamm y 18 von C. Willson, die Stämme 24 und 522 von J. Davies. Die Genkarte wurde von M. Pfahl hergestellt. Einzelheiten werden an anderer Stelle mitgeteilt [25].

Nur einige der erwähnten i^- -Mutationen sind durch Drei-Faktor-Kreuzungen lokalisiert worden^[15]. Wir haben mit der Kartierung von i^s - und i^d -Mutationen begonnen^[25] (Abb. 5). Sechzehn i^s - und zwei i^d -Mutanten sowie siebzehn Deletionen wurden geordnet. Obwohl die untersuchte Zahl der Mutationen und Deletionen zu klein ist, um endgültige Aussagen zu machen, erkennt man, daß die i^d - und die i^s -Mutationen in Gruppen an bestimmten Stellen des Genoms liegen. Die Sequenzanalyse dieser und weiterer im aktiven Zentrum mutierter Repressoren sollte Auskunft über ihre Wirkungsweise bringen.

2.4. Mutanten des i -Gen-Promotors

Von einer i -Gen-Mutation des Typs i^{TSS} (Bildung eines temperatur-empfindlichen Vorläufers des Repressors) ausgehend^[22] ist eine i -Gen-Mutante isoliert worden, die lac -Repressor überproduziert^[16]. Sie hat die Bezeichnung i^q (q für Quantität) bekommen. Die Überproduktion schien zunächst etwa 10-fach zu sein. Diese Angabe basierte auf Werten für den Ausgangsstamm, der einen Überschuß an temperatur-empfindlichem Repressor produzierte. In der Folge wurde die TSS-Mutation herausgekreuzt, und es resultierte ein Stamm, der eine 20-fache Überproduktion des Repressors (vermutlich vom Wildtyp) aufwies^[26]. Von diesem Stamm ausgehend war es möglich, einen noch besseren Überproduzenten zu gewinnen^[26]. Dieser Stamm mit der Bezeichnung i^{superq} erzeugt 5- bis 10-mal mehr Repressor als der i^q -Stamm (Tabelle 3). Diese Stämme sind benutzt worden, um ge-

Tabelle 3. lac -Repressor-Konzentrationen in einigen Stämmen.

Genotyp	lac -Repressor-Moleküle pro Zelle i -Gen auf dem Chromosom	i -Gen auf dem Phagen
i^+	10	300
i^q	200	6000
i^{superq}	1000	-

nügend Repressor (4 g) für eine Sequenzanalyse zu gewinnen (siehe unten). Die q-Mutation wurde am linken Ende des i -Gens kartiert^[19].

2.5. Änderung der Zahl der i -Gen-Kopien in der Zelle

E. coli enthält normalerweise pro Chromosom nur eine Kopie eines jeden Gens. Es ist seit langem bekannt, daß die Verdoppelung unregulierter Gene zu einer Verdoppelung der Gen-Produkte führt^[22]. Stämme mit drei Sätzen von lac -Genen kann man mit Hilfe eines lac -transduzierenden Phagen konstruieren^[27]. Wie erwartet ergibt sich annähernd eine Verdreifachung des i -Gen-Produktes. Eine elegante Methode zur Einführung von Kopien eines bestimmten Gens in *E. coli* ist die Benutzung eines sich vermehrenden, speziell transduzierenden Phagen, der dieses Gen trägt. Ein solcher Phage ist für das lac -System verfügbar^[27]. Er ist durch die Einführung von zwei weiteren Mutationen noch brauchbarer gemacht worden. Die eine dieser zusätzlichen Mutationen erlaubt es, die Vermehrung des Phagen durch kurze Hitzebehandlung des Bakteriums zu starten (der Phage hat einen temperatur-empfindlichen Repressor; die Mutation wird c_{1857} genannt), die andere Mutation verhindert die Lyse der Bakterienzelle nach der Induktion des Phagen (die Natur der Lysehemmung ist nicht klar, die Mutation wird mit t68 bezeichnet^[28]). Die Benutzung dieses Phagen bringt eine 30-fache Erhöhung der Repressorproduktion^[16] (siehe Tabelle 3).

2.6. Konsequenzen der niedrigen Repressor-Menge in Stämmen vom Wildtyp

Vom Repressor werden nur wenige Moleküle pro Zelle synthetisiert. Eine genaue Bestimmung der Menge ist

schwierig, man kann aber die Existenz von ungefähr 10 Molekülen pro Zelle annehmen^[24]. Die wahrscheinlichste Erklärung für die geringe Repressormenge ist, daß der Promotor des *i*-Gens (das heißt die Startstelle für die Transcription des Gens) nicht sehr wirksam ist^[16]. Eine oder zwei Kopien der *i*-Gen-messenger-RNA pro Zellteilungscyclus könnten ausreichen, um die gefundene Repressormenge zu erklären, da ein Molekül messenger-RNA mehrfach abgelesen werden kann, bevor es abgebaut wird. Die Annahme einer sehr niedrigen Synthesegeschwindigkeit für die *i*-Gen-messenger-RNA kann als Grundlage für die Erklärung verschiedener Phänomene dienen:

Nach einer Konjugation zwischen einem Donor- i^+z^+ -Stamm (F' oder Hfr) und einem Rezeptor-Stamm mit einer *lac*-Deletion wird β -Galaktosidase ungefähr 60 Minuten lang mit hoher Geschwindigkeit produziert^[29] (Abb. 6). Die β -Galaktosidase- z^+ -Gene sind nach dem

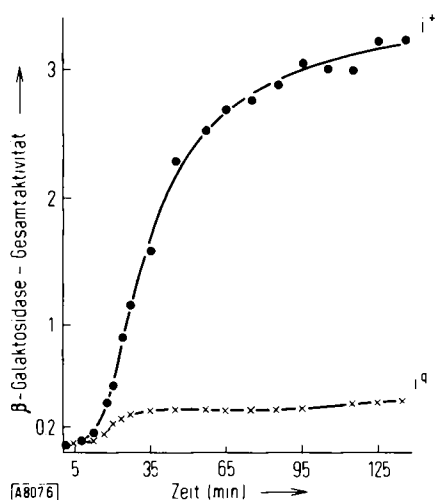


Abb. 6. Beginn der Repression in einem Konjugationsexperiment: Das Experiment, das bereits einmal mit unklarem Ergebnis mit einem $F'i^{qTSS}$ -Donor-Stamm [16] ausgeführt worden war, wurde hier mit einem $F'i^q$ -Donor-Stamm wiederholt. Sm^S -Donor-Zellen mit dem $F'i^+z^+$ - oder dem $F'i^qz^+$ -Episom aus der exponentiellen Phase einer Zucht bei $37^\circ C$ wurden zur Zeit $t=0$ mit einem zweifachen Überschuß von Sm^S -Acceptor-Zellen, die eine *RV-lac*-Deletion enthielten, gemischt. Nach 10 Minuten weiteren Wachstums bei $37^\circ C$ im gleichen Medium [10] wurde die Konjugation durch kräftiges Schütteln und Zufügen von 30γ Natriumdodecylsulfat/ml unterbrochen. Streptomycin ($250\gamma/ml$) wurde zugefügt, um weiteres Wachstum der Donor-Zellen zu verhindern. In 10-Minuten-Intervallen wurden Proben zur Messung der β -Galaktosidase entnommen [9]. Die Übertragung des *lac*-Charakters wurde durch Plattieren bestimmt, sie lag zwischen 15 und 20%. Die β -Galaktosidase-Aktivität ist in willkürlichen Einheiten angegeben. Der Blindwert für die Donor-Zellen wurde abgezogen. — — — Donor $F'i^+z^+$, — x — x — Donor $F'i^qz^+$. Die Daten stammen aus der Dissertation von M. Pfahl, Universität Köln.

Transfer in die Rezeptor-Zelle nicht mehr reprimiert. Sie arbeiten in der neuen Umgebung eine Zeit lang konstitutiv, das heißt, bis die erste *i*-Gen-messenger-RNA produziert worden ist, entsteht β -Galaktosidase mit maximaler Geschwindigkeit. Die Repressor-messenger-RNA wird in verschiedenen Zellen zu verschiedenen Zeiten synthetisiert, aber nach einer bestimmten Zeit sollte die Hälfte aller vorhandenen Zellen ein Molekül *i*-Gen-messenger-RNA erzeugt haben, an dem dann mehrere Repressor-Moleküle innerhalb weniger Minuten synthetisiert werden. Das führt zum fast vollständigen Abbruch

der β -Galaktosidase-Synthese in diesen Zellen. Trägt man den Logarithmus der relativen Geschwindigkeit der β -Galaktosidase-Synthese gegen die Zeit auf, so erhält man eine Gerade (Abb. 7). Beim Wildtypstamm $F'lac$

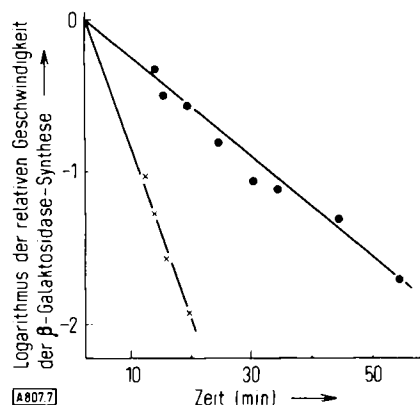


Abb. 7. Beginn der Repression in einem Konjugationsexperiment (Daten aus Abb. 6): Der Logarithmus der Geschwindigkeit der Synthese von β -Galaktosidase (in willkürlichen Einheiten) ist gegen die Zeit aufgetragen. Die Geraden weisen auf den exponentiellen Abfall dieser Geschwindigkeit hin (— — — $F'i^+z^+y^+$, — x — x — $F'i^qz^+y^+$). Wir interpretieren dieses Ergebnis so, daß die *i*-Gen-Transcription im Wildstamm seltener als im i^q -Stamm stattfindet [16].

$i^+z^+y^+$ findet man einen exponentiellen Abfall der Geschwindigkeit der β -Galaktosidase-Synthese über 60 Minuten. Nach 24 Minuten ist die Synthesegeschwindigkeit um den Faktor $1/e$ abgesunken. Wenn die hier gegebene Erklärung korrekt ist, bedeutet das, daß alle 24 Minuten ein Molekül *i*-Gen-messenger-RNA synthetisiert wird. Die Existenz der i^q -Mutation ermöglicht eine Kontrolle dieses Experimentes. Ist i^q eine Promotor-Mutation, das heißt, erhöht sie die Häufigkeit der *i*-Gen-Transcription, dann muß die Geschwindigkeit der β -Galaktosidase-Synthese bei Verwendung eines $F'i^qz^+y^+$ -Stammes entsprechend schneller abfallen. Abbildung 6 enthält die Versuchsbedingungen, Abbildung 7 zeigt, daß bei einem i^q -Stamm die Geschwindigkeit der β -Galaktosidase-Synthese mindestens dreimal so schnell abnimmt wie beim Wildtyp. Das bedeutet, daß die Frequenz der *i*-Gen-Transcription beim i^q -Stamm dreimal so groß ist wie beim i^+ -Stamm. Es mag verwundern, daß sie nicht noch höher ist, da doch die 20-fache Repressor-Menge synthetisiert wird. Wir können im Moment dafür keine einfache Erklärung geben.

Methyltryptophan wurde benutzt, um in einem derartigen Konjugationsexperiment die Proteinsynthese zu stoppen und damit zu prüfen, ob die Assoziation der Repressor-Untereinheiten sehr langsam vor sich geht^[30].

Man beobachtete den gleichen exponentiellen Abfall der β -Galaktosidase-Synthesegeschwindigkeit wie unter normalen Bedingungen. Es ist also die m-RNA-Synthese selbst, die geschwindigkeitsbestimmend ist; die Assoziation der Repressor-Untereinheiten verläuft ziemlich schnell^[16].

Die geringe Repressormenge in Zellen vom Wildtyp ist die Ursache für ein anderes interessantes Phänomen: der „Ausbruch“ (escape) der Synthese von β -Galaktosidase nach Induktion von *lac*-transduzierenden Phagen

durch UV-Bestrahlung^[31] oder Hitze^[32]. Die lac-Gene $i^-o^-z'y'$ entkommen der Kontrolle des Repressors: β -Galaktosidase wird nach der Induktion des Phagen konstitutiv synthetisiert. Offenbar ist die dereprimierte Synthese darauf zurückzuführen, daß zu wenig Repressor anwesend ist, um alle lac-Operatoren der reduplizierenden DNA zu besetzen. Besonders saubere Ergebnisse sind mit dem hitze-induzierbaren Phagen $\lambda c_{1857}h80t68d-lac$ erhalten worden^[32]. Die enthemmte Synthese dauert genau 10 Minuten und hört dann vollständig auf, obwohl die Phagen-DNA weiter redupliziert wird. Benutzt man einen Phagen mit einem i^q -Gen, so wird ein „Ausbruch“ der Synthese nicht beobachtet. Dann nämlich wird jederzeit genug Repressor synthetisiert, um alle Operatoren zu besetzen.

Eine andere Konsequenz der Existenz nur weniger Repressor-Moleküle pro Zelle ist die Kinetik der β -Galaktosidase-Synthese nach der Hitzeinduktion eines i^{TSS} -Stammes^[22]. Man hat das „Einschalten“ der β -Galaktosidase-Synthese durch Temperaturerhöhung als Hitzeinduktion bezeichnet. Im i^{TSS} -Stamm scheint bereits gebildeter Repressor bei hohen Temperaturen stabil zu sein, neuer aktiver Repressor durch Assoziation der Untereinheiten unter diesen Bedingungen aber nicht gebildet zu werden. Läßt man einen i^{TSS} -Stamm mehrere Zellgenerationen bei niedriger Temperatur wachsen und erhöht dann die Temperatur auf 43 °C, dann beobachtet man eine Beschleunigung der β -Galaktosidase-Synthese noch vor der Verdoppelung der Zellzahl. Die erste Erklärung für dieses Phänomen lautete, daß bereits gebildeter i^{TSS} -Repressor in ruhenden Zellen stabil sein sollte. Unter Wachstumsbedingungen vermutete man für den Repressor eine Halbwertszeit von 1/10 bis 1/5 der Generationszeit^[22]. Eine plausible Erklärung ist allerdings, daß der i^{TSS} -Repressor doch etwas temperaturlabil ist: Bei sehr niedrigem Repressorspiegel können kleine Differenzen der Repressorkonzentration in verschiedenen Zellen zu außerordentlich verschiedenen Geschwindigkeiten der β -Galaktosidase-Synthese führen. Zwei lac-Operatoren und zwei Repressor-Moleküle führen zu kompletter Repression, während zwei lac-Operatoren und ein Repressor-Molekül die optimale Funktion eines der beiden lac-Promotoren ermöglichen. Die Situation läßt sich durch eine Poisson-Verteilung beschreiben. Nach dieser Interpretation würden einige Zellen ziemlich bald nach der Temperaturerhöhung weniger Repressor als Operator enthalten. Will man diesen Mechanismus beweisen, so muß man den ungleichen β -Galaktosidase-Gehalt einzelner Zellen experimentell demonstrieren; das ist bisher nicht geschehen.

2.7. Die Natur des i-Gen-Produktes

Als Jacob und Monod ihr Modell für die Regulation des lac-Systems veröffentlichten, war gerade die Existenz der messenger-RNA bewiesen worden. Die Annahme schien daher vernünftig, daß der Repressor eine Nucleinsäure sein könnte^[35], vermutlich die dem i-Gen entsprechende messenger-RNA. Falsch interpretierte Konjugationsexperimente, bei denen vorausgesetzt wurde,

daß Chloramphenicol die Synthese neuen Proteins vollständig verhindert, bei denen aber anscheinend doch neuer Repressor entstand, dienten zum Beweis^[34]. Andererseits war es schwer einzusehen, daß ein RNA-Molekül in der Lage sein sollte, spezifisch mit einem kleinen Molekül wie IPTG zu reagieren. Was über die Spezifität von Induktoren bekannt war^[7,9,10], ließ vermuten, daß der Repressor ein Protein sei. Mit dem Auffinden temperatur-empfindlicher i-Gen-Mutanten^[22] wurde diese Vermutung zur Wahrscheinlichkeit. In den temperatur-empfindlichen Mutanten ist entweder der Repressor selbst oder sein Vorläufer temperaturlabil. Da man damals noch keine temperatur-empfindlichen RNA-Moleküle kannte, mußte man annehmen, daß der Repressor ein Protein sei. Die gleichen Mutanten ermöglichten einen ausgezeichneten Beweis der Tatsache, daß sich der Induktor direkt an den Repressor bindet: IPTG beeinflusst die Stabilität des temperatur-empfindlichen Repressors^[22]. Aus der Konzentrationsabhängigkeit der Hitzelabilität des Repressors aus dem i^{TSS} -Stamm konnte man außerdem schließen, daß der Repressor ein Tetramer oder ein anderes Oligomer sein mußte^[22]. Wesentlich handfestere Beweise für die Proteinnatur des Repressors wurden einige Jahre später geliefert. i^- -Mutanten, die aus i^s -^[17] oder i^+ -Stämmen^[18] gewonnen worden waren, ließen sich durch Nonsense-Suppressoren supprimieren. Da die Nonsense-Suppression Kettenabbruch am Nonsense-Codon bei der Translation verhindert, ist damit bewiesen, daß die Translation der i-Gen-messenger-RNA Voraussetzung für die Synthese eines aktiven Repressors ist.

2.8. In-vitro-Tests für den lac-Repressor

Für die quantitative Bestimmung des lac-Repressors gibt es zwei Verfahren: Gemessen wird die Bindung des Repressors an den Induktor IPTG^[24,36] oder den lac-Operator^[37,38]. Eine empfindliche Methode zur Bestimmung kleiner Repressormengen ist die Gleichgewichtsdialyse mit ¹⁴C-markiertem IPTG^[24]. Man dialysiert den zu prüfenden Extrakt gegen eine 10^{-7} -molare Lösung von ¹⁴C-markiertem IPTG. Ist der Gleichgewichtszustand erreicht, wird die Radioaktivität außerhalb und innerhalb des Dialyseschlauchs gemessen. Eine elegantere und schnellere Methode macht sich die Tatsache zunutze, daß der lac-Repressor an Nitrocellulose (Millipore-Filter) gebunden wird, und daß er in diesem Zustand IPTG sehr fest bindet^[36]. Diese Methode ist durch die Proteinmenge (ca. 10^{-6} bis 10^{-5} g) begrenzt, mit der der Filter beladen werden kann. Auch andere Methoden, wie die Fällung des Komplexes mit Ammoniumsulfat^[39] (Farr-Test aus der Immunologie^[40]) und die Verteilungschromatographie, sind benutzt worden^[21].

Die Bindung des lac-Repressors an den lac-Operator kann auf zwei Weisen gemessen werden: erstens (ziemlich mühsam) mit unmarkierter, lac-Operator enthaltender DNA und markiertem Repressor im Glycerin-Gradienten^[37], und zweitens (erheblich leichter) unter Benutzung der Membranfiltertechnik mit unmarkiertem Repressor und ³²P-markierter DNA^[38].

2.9. In-vitro-Tests für lac-Repressor aus Mutanten

Der ursprüngliche Test für den lac-Repressor^[41] beruhte auf dessen Fähigkeit, IPTG zu binden^[24]. Die Beweise für die Isolierung des lac-Repressors beruhten auf der Benutzung von i⁻-Gen-Mutanten: Das physikalisch-chemische Verhalten des Repressors muß mit den Voraussetzungen übereinstimmen, die sich aus den Eigenschaften der Mutanten ergeben. Die einfachsten Beziehungen sind negativer Art. So ist zu erwarten, daß in Extrakten aus Stämmen mit i⁻-Gen-Deletionen kein IPTG-bindendes Material nachzuweisen ist. Tatsächlich hat sich in verschiedenen Stämmen mit i⁻-Deletionen keine Bindung von IPTG nachweisen lassen, aber da in einigen dieser Stämme die Deletion über die Grenzen des i⁻-Gens hinausgeht, war dies kein besonders guter Beweis. Aussagekräftiger war die Abwesenheit von IPTG-bindendem Material in Extrakten aus einer i⁻-Nonsense-Mutante, da die Fähigkeit zur Bindung von IPTG kaum von einem Repressorfragment erwartet werden konnte. (Spätere Arbeiten (siehe unten) ergaben, daß bei einigen Deletionen Repressoren entstehen, denen nur kleine Teile am Amino- oder Carboxy-Ende fehlen und die IPTG noch binden können^[19].) Weiter sollte man erwarten, daß Extrakte aus i^s-Mutanten keine gute IPTG-Bindung aufweisen. In der Tat wurde bei dem i^s-Stamm, der als erster untersucht wurde, keine Bindung gefunden^[24].

Alle diese Beweise sind negativer Natur. Bessere Beweise dafür, daß IPTG vom Produkt des i⁻-Gens gebunden wird, bieten positive Beziehungen zwischen dem Verhalten des Extraktes und dem Genotyp der jeweiligen Mutante: Die Dissoziationskonstante des bei der Bindung von IPTG entstehenden Komplexes ist bei einem Extrakt aus einem i⁻-Stamm halb so groß wie bei einem Extrakt aus dem Wildtyp; außerdem ist die IPTG-Bindungsaktivität von i^{T1}- und i^{T55}-Extrakten hitzelabiler als die eines Wildtyp-Extraktes^[42]. Die Bindung des lac-Repressors an den Operator (siehe unten) bildet den abschließenden Beweis dafür, daß das i⁻-Gen-Produkt der Repressor ist. Die verringerte Fähigkeit von i^s-Repressoren, den Induktor zu binden, wurde kürzlich sehr überzeugend nachgewiesen^[43]: Je stärker der i^s-Charakter einer Mutante, umso schwächer ist ihre Wechselwirkung mit IPTG in vitro.

2.10. Reinigung des lac-Repressors

Bei den meisten Reinigungen des lac-Repressors wurde nur die Fähigkeit zur Bindung von IPTG verfolgt. In dieser Beziehung ist der Repressor sehr stabil. Die Fähigkeit zur Bindung an den Operator verschwindet dagegen langsam während der Reinigung des lac-Repressors: Der Repressor kann aus einem Stamm, der das i^q-Gen^[44] auf λ h80c₁₈₅₇t68dlac-Phagen enthält, in zwei Schritten erhalten werden: Durch kurze Hitzebehandlung der Bakterien wird die Vermehrung des Phagen induziert. Die i^q-Gene, die zusammen mit dem Phagen vermehrt werden, erzeugen Repressor, der ungefähr 1 % des löslichen Proteins ausmacht. Die Bakterien werden abzentrifugiert und zur Lagerung eingefroren. Sie lysieren, wenn man sie in Puffer (pH = 7.6) bringt. Die Zelltrümmer

werden abzentrifugiert. Eine Ammoniumsulfat-Fällung zwischen 15 und 33 % und eine Chromatographie an Cellulosephosphat reichen aus, um reinen Repressor zu erhalten (Tabelle 4). Die Chromatographie an DEAE-

Tabelle 4. Reinigung von lac-Repressor aus 100 g gefrorener Zellen (λ h80c₁₈₅₇t68dlac^q) [44].

Schritt	Spezifische Aktivität [a] ($\%$ mg ⁻¹ ml ⁻¹)	Ausbeute (%)	Gesamte Repressor-menge (mg)
1: Rohextrakt	14	100	61
2: Überstand der ersten Ammoniumsulfat-Fällung (0-15 %)	19	98	60
3: Dialysierter Niederschlag der zweiten Ammoniumsulfat-Fällung (15-33 %)	112	88	54
4: Chromatographie an Cellulosephosphat	1300	54	33

[a] Die spezifische Aktivität des lac-Repressors wird durch Gleichgewichtsdialyse gegen ¹⁴C-markiertes IPTG bestimmt [24]. Die Angabe $\%$ mg⁻¹ ml⁻¹ bedeutet: Überschuß an IPTG im Dialyseschlauch (%) dividiert durch die Proteinkonzentration (mg/ml).

Cellulose und auf Sephadex ist ebenfalls mit Erfolg angewandt worden^[36, 46]. Im Rohextrakt eines hitzeinduzierten, nicht eingefrorenen, Phagen enthaltenden i^q-Stammes hat der Repressor eine Sedimentationskonstante von 7 S. Er tendiert dazu, während der Reinigung zu aggregieren und aus der Lösung auszufallen^[44, 36]. Unsere Arbeiten zeigen, daß sich die Sedimentationskonstante von 7 S nicht wesentlich ändert, wenn der Repressor in Gegenwart von 10⁻³ M IPTG oder 10⁻³ M ONPF zentrifugiert wird. Durch Gleichgewichtszentrifugation wurde die relative Molekülmasse der 7-S-Spezies zu 150 000 bestimmt^[45]. Bei der Elektrophorese auf Acrylamid-Gel, das Natriumdodecylsulfat (SDS) enthält, ist nur eine einzige Bande zu beobachten. Aus der Wanderungsgeschwindigkeit dieser Bande errechnet

Tabelle 5. Aminosäure-Zusammensetzung des lac-Repressors aus *E. coli* (i^q).

Aminosäure	μ mol/100 μ mol	Zahl der für MG = 40000 berechneten Aminosäurereste
Lysin	3.67	13
Histidin	1.69	6
Arginin	4.80	17
Asparaginsäure	9.04	32
Threonin	5.37	19
Serin	7.34	26
Glutaminsäure	12.43	44
Prolin	3.95	14
Glycin	7.34	26
Alanin	11.58	41
Cystein [a]	0.58	3
Valin	8.19	29
Methionin	2.25	8
Isoleucin	5.65	20
Leucin	10.73	38
Tyrosin	2.26	8
Phenylalanin	2.26	8
Tryptophan [b]	0.56	2

[a] Als Cysteinsäure bestimmt.
[b] Nach enzymatischer und alkalischer Hydrolyse.

man eine relative Molekülmasse von 39000^[45]. Aus der Aminosäure-Analyse erhält man den Wert 40000 für das Monomere^[46]. Die stabilste Form des Repressors scheint das Tetramere zu sein. Unter extremen Bedingungen (nach dem Einfrieren, nach Einfrieren und Auftauen, in Tris- oder Salz-Lösungen sehr hoher Konzentration) sind Monomere, Dimere und höhere Aggregate beobachtet worden^[46]. Die Aminosäure-Zusammensetzung ist normal: Der Repressor enthält alle normalerweise in Proteinen vorkommenden Aminosäuren^[46] (Tabelle 5). Er ist ein saures Protein (isoelektrischer Punkt = 5.6)^[45].

Die Analyse des reinen Repressors hat keine Hinweise auf die Anwesenheit von reduzierenden Zuckern oder Nucleinsäuren ergeben^[44]. Das Verhältnis der Absorption bei 280 nm zu der bei 260 nm erreicht bei reinen Präparaten des Tetrameren den Wert 1.8 (Tabelle 6).

Bei gealterten Präparaten, in denen der Repressor bereits zu aggregieren beginnt, kann das Verhältnis der Absorptionen infolge der Lichtstreuung wesentlich niedriger liegen und so zu der irrigen Vermutung führen, es seien Nucleinsäuren anwesend.

Tabelle 6. Eigenschaften des lac-Repressors aus *E. coli* (i⁺).

		Bestimmungsmethode	Lit.
Relat. Molekülmasse	150000	Hochgeschwindigkeits-Gleichgewichtszentrifugation	[45]
Relat. Molekülmasse der Untereinheit	40000	Polyacrylamidgel-Elektrophorese mit Na-Dodecylsulfat, Aminosäure-Analyse	[45, 46]
Sedimentationskonstante Tetramer Monomer	7.2 2.7	Zentrifugation im Glycerin-Gradienten	[24, 36, 46]
Isoelektrischer Punkt	5.6	Isoelektrische Fokussierung	[45]
DNA-Gehalt RNA-Gehalt	unter 1.2% unter 0.2 %	Dische-Reaktion Orcinol-Reaktion	[46]
Bindungsstellen für IPTG pro MG = 150000	4.2	Gleichgewichtsdialyse	[46]
Bindungskonstante für IPTG bei 4°C und pH ~ 7.6	$1.8 \times 10^{-6} \text{ M}$	Gleichgewichtsdialyse	[24, 36, 46]
OD _{280 nm} , 0.1%, 1 cm	1.38		[46]
OD ₂₈₀ : OD ₂₆₀	1.8		[46]
N-endständige Aminosäure	Methionin	DNP-Methode, Dansyl-Methode, Edman-Abbau	[45, 46]
C-endständige Aminosäure	Lysin	Carboxypeptidase B, Hydrazinolyse	[46]

Die Zahl der Bindungsstellen für IPTG ist sorgfältig bestimmt worden (Abb. 8). Es gibt exakt eine Bindungsstelle pro Untereinheit^[43].

Papierchromatogramme des Proteins nach Spaltung mit Trypsin^[46] zeigen die Zahl von Fragmenten^[29], die man nach dem Gehalt an Arginin und Lysin (zusammen 30 pro MG = 40000, Tabelle 5) erwartet. Zusammen mit den genetischen Daten ist dies ein starker Hinweis darauf, daß der Repressor aus vier gleichen Untereinheiten

besteht. Dafür spricht auch das einheitliche amino-terminale Ende (Methionin)^[45, 46] und die einheitliche Sequenz des carboxy-terminalen Endes Arg-Lys^[46].

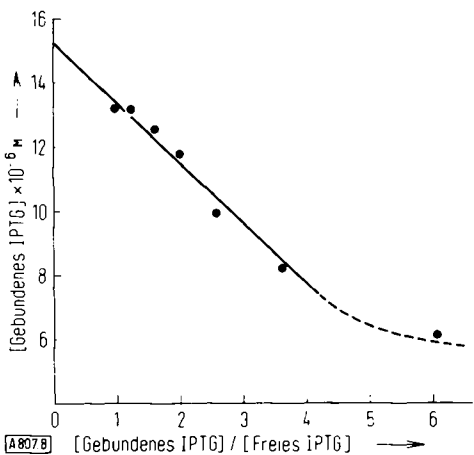


Abb. 8. Zahl der Bindestellen für den Induktor am lac-Repressor. Die Konzentration an gebundenem IPTG ist gegen das Verhältnis der Konzentrationen an gebundenem IPTG und freiem IPTG aufgetragen. Die Konzentration des Repressors war in diesem Experiment $3.6 \times 10^{-6} \text{ M}$. Die Extrapolation der Kurve führt zu vier Bindungsstellen pro Repressormolekül der relativen Molekülmasse 150000^[46].

2.11. Eigenschaften der Repressoren aus verschiedenen i-Gen-Mutanten

Nur wenige i-Gen-Mutanten sind auf die biochemischen und physikalischen Eigenschaften ihrer Repressoren hin untersucht worden. Dabei hat sich überraschenderweise herausgestellt, daß viele i⁻-Mutanten noch IPTG-bindende Aktivität enthalten. Das ist der Fall bei einer i^{-d}-Mutante (i₂₄^{-d})^[46], einer transdominanten Deletion^[19, 46], die vom Tryptophan-Operon bis in den ersten Teil des i-Gens reicht, und bei der Deletion L1^[19], die vom C-ter-

minimalen Ende des lac-Repressors bis in den lac-Promotor geht. Im letzteren Fall ist der Repressor isoliert worden. Die relative Molekülmasse der Untereinheit wurde durch Elektrophorese auf Polyacrylamid-Gel in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat zu 38000 bestimmt^[19].

2.12. Dominanz der lac-i-Gen-Mutanten

Als Jacob und Monod ihr Modell vorschlugen, schienen die Dominanzverhältnisse der i-Gene einfach und klar. Anwesenheit des Repressors (i^-) war dominant über die Anwesenheit (i^-)^[1]. Die Anwesenheit eines mutierten Repressors, der nicht in der Lage war, mit dem Induktor in Wechselwirkung zu treten (i^s), war dominant sowohl über i^+ als auch über i^- ^[23]. Die Entdeckung der transdominanten i^-d -Mutanten brachte die ersten Probleme^[15,16]. Wirken sie durch negative Komplementation (das heißt, durch die Bildung gemischter Oligomere von Repressor-Untereinheiten, die nicht in der Lage sind, den Operator zu binden) oder bindet ihr Repressor noch den Operator, ohne in der Lage zu sein, die Transcription zu stoppen? Wenn, was am wahrscheinlichsten ist, negative Komplementation die Erklärung für die Dominanz ist, dann müssen die Untereinheiten eines i^-d -Repressors sehr langsam aggregieren, da die Repressor-m-RNA nur alle 20 Minuten hergestellt wird. (Wir nehmen dabei an, daß die einmal gebildeten Tetramere stabil sind, und untereinander keine Untereinheiten austauschen können.)

Die Existenz von Mutanten, die Repressor vom Wildtyp im Übermaß produzieren, führt zu weiteren Komplikationen: i^q ist dominant über i^s ^[16]. Die einfachste Erklärung ist sicher Komplementation, das heißt, die Bildung normal funktionierender gemischter Oligomere aus i^s - und i^+ -Repressor-Untereinheiten. Die Halbwertszeit freier i^s -Repressor-Untereinheiten kann ziemlich klein sein, da in der i^q -Mutante die lac-m-RNA für den Repressor mindestens alle sechs Minuten synthetisiert wird. IPTG kann die Ablösung der gemischten Oligomere vom Operator verursachen.

Alle Dominanzverhältnisse sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tabelle 7. Dominanzverhältnisse.

Genotyp	dominant über	Lit.
i^-	i^-	[1]
i^s	$i^-; i^-$	[23]
i^-d	i^-	[15, 16]
i^q	$i^s; i^-d$	[16]

3. Der Operator und die Wirkungsweise des Repressors

3.1. Mutationen des Operators

Die genetische Analyse zeigt, daß das Produkt des i-Gens mit dem Operator in trans reagiert^[1]: Der Repressor wird nicht nur an Operatoren gebunden, die nahe den i-Genen lokalisiert sind, sondern auch an weit entfernte lac-Operatoren, beispielsweise an solche auf einem F' oder auf einem Prophagen. Der Operator ist durch ope-

ratorkonstitutive Mutationen charakterisiert (o^c). Dies sind cisdominante Mutationen, in denen die Wechselwirkung zwischen Repressor und Operator geschwächt ist: Die Synthese von β -Galaktosidasen in cis (von einem z-Gen, das direkt mit dem Operator verbunden ist) ist nicht mehr um den Faktor 1000 reprimiert. Sie ist teilweise konstitutiv geworden. Durch die Zugabe von Induktor kann sie voll induziert werden. Bisher sind keine operator-konstitutiven Mutanten gefunden worden, bei denen die Repression total beseitigt ist. Die „aktivsten“ o^c -Mutationen sind noch um den Faktor 8 reprimiert. Es wurde postuliert^[47], daß alle o^c -Mutanten Deletionen seien, aber das ist fraglich, weil die wichtigste Eigenschaft von Deletionen, ihre Nichtrevertierbarkeit, nicht leicht geprüft werden kann. Die Häufigkeit des Vorkommens von o^c -Mutationen nach der Benutzung spezifischer Mutagene muß ebenfalls mit Vorsicht interpretiert werden, da die „ o^{c-} “-Mutanten aus i^s -Diploiden isoliert worden sind, und weil Komplikationen wie das Vorkommen von Transdominanz oder eine verstärkte Homozygose nach der Mutagenisierung die Resultate unsicher machen.

3.2. Abschätzung der Bindungskonstante zwischen Repressor und Operator aus in-vivo-Daten

Die Einführung eines F' i^-z^+ -Episoms (F' = ein unabhängig replizierendes DNA-Stück, das aus einem F-Faktor und Bakterien-DNA, in diesem Fall den lac-Genen, besteht) in eine Zelle mit dem Genotyp $i^+o^cz^-$ vermindert die Geschwindigkeit der operator-konstitutiven β -Galaktosidase-Synthese um den Faktor 2 bis 2.5^[1]. Da der Repressorspiegel durch die Einführung eines zweiten i-Gens auf das Doppelte ansteigt, kann man sagen, daß die Geschwindigkeit der β -Galaktosidase-Synthese linear vom Kehrwert der Repressorkonzentration abhängt^[22]. Wir haben diese Annahme weiterhin geprüft durch die Einführung eines F' i^q -Gens in den gleichen $i^+o^cz^-$ -Stamm. Der Repressorspiegel steigt dann auf das 10- bis 20-fache an, der β -Galaktosidase-Spiegel sinkt ab um den Faktor 7 (siehe Tabelle 8). Das bedeutet qua-

Tabelle 8. Repressor-Operator-Wechselwirkung. Die Bakterien wurden in Minimalmedium M56 [10] mit Glycerin-Zusatz bei 37°C gezüchtet. β -Galaktosidase wurde nach [9] bestimmt.

Genotyp	Spezifische Aktivität der β -Galaktosidase
$i^+o^cz^-$	2000
$i^-o^cz^- / F'i^+o^cz^-$	1200
$i^+o^cz^- / F'i^qo^cz^-$	300
$i^-o^cz^- / F'i^{supr14}o^cz^-$	130
$i^+o^cz^-$	15

litativ, daß für die Beziehung zwischen Repressor und Operator das Massenwirkungsgesetz gilt.

$$R + O \rightleftharpoons RO$$
$$\frac{[R] \cdot [O]}{[RO]} = K_0$$

Machen wir die Annahme, daß die Geschwindigkeit der β -Galaktosidase-Synthese proportional der Konzentration an freiem Operator ist^[22]. Dann muß auch die basale Konzentration von β -Galaktosidase um den Faktor 2 zurückgehen, wenn ein $F' i^+ o^+ z^-$ -Gen in einen $i^- o^+ z^+$ -Stamm eingeführt wird^[48]. Damit läßt sich die Bindungskonstante zwischen Repressor und Operator berechnen: Das Volumen einer *E.coli*-Zelle ist $0.7 \times 10^{-12} \text{ cm}^3$; die Loschmidtsche Zahl ist 6×10^{23} . Ist also in jeder *E.coli*-Zelle ein „Molekül“ Operator anwesend, so ist seine Konzentration etwa 10^{-9} molar. In einer sich normal teilenden *E.coli*-Zelle wäre demnach die Konzentration an lac-Operator 2×10^{-9} molar, die Konzentration an lac-Repressor unter der Annahme von 10 Molekülen pro Zelle 10^{-8} molar. Nehmen wir nun an, daß das Verhältnis von 1 : 1000 für die β -Galaktosidase-Konzentration im nichtinduzierten und im induzierten Zustand vollständig auf Repression zurückzuführen ist, dann sollte die Konzentration an freiem Operator in einer nicht induzierten Zelle bei $2 \times 10^{-12} \text{ M}$ liegen. Die Konzentration an Operator-Repressor-Komplex ist praktisch gleich der Konzentration an Gesamtoperator, nämlich $2 \times 10^{-9} \text{ M}$. Die Konzentration an freiem Repressor kann man als praktisch unverändert ansehen, d. h. als 10^{-8} M . Aus diesen Daten läßt sich die Bindungskonstante abschätzen:

$$K_o = \frac{[R] \cdot [O]}{[RO]} = \frac{10^{-8} \cdot 2 \cdot 10^{-12}}{2 \cdot 10^{-9}} = 10^{-11} \text{ M}$$

3.3. Bestimmung der Bindungskonstante für den IPTG-Repressor-Komplex

Die Abhängigkeit der Induktion von der Konzentration des Induktors in einem $i^+ o^+ z^+ y^-$ - und in einem $i^+ o^+ z^+ y^-$ -Stamm gibt ein direktes Maß für die Bindungskonstante zwischen Induktor und Repressor^[23,24]. Die Abhängigkeit von der Induktorkonzentration ist nicht erster, sondern dritter Ordnung. Vernachlässigen wir dies für einen Augenblick, so gilt, daß man die gleiche Menge von Induktor braucht, um in beiden Stämmen den basalen β -Galaktosidase-Spiegel zu verdoppeln^[23]. Daraus folgt:

$$K_i = \frac{[I] \cdot [R]}{[IR]}$$

Nehmen wir an, daß die Geschwindigkeit der β -Galaktosidase-Synthese proportional der Konzentration an freiem Operator ist, so folgt daraus direkt, daß die Bindungskonstante für den Induktor numerisch gleich der IPTG-Konzentration ist, die nötig ist, um die basale Geschwindigkeit der β -Galaktosidase-Synthese zu verdoppeln, und zwar sowohl in einem $i^+ o^+$ - als auch in einem $i^+ o^c$ -Stamm. Das bedeutet de facto, daß $K_i = 2 \times 10^{-6} \text{ M}$ ist.

Die Bindung des Repressors an IPTG ist in vitro bestimmt worden. Es hat sich gezeigt, daß reiner i^4 -Repressor sich bei der Bindung an den Induktor nicht kooperativ verhält. Freilich entsprechen die experimentellen Bedingungen (Temperatur usw.) nicht den in-vivo-Bedingungen. Dennoch bleibt die Frage, wie

sich diese Beobachtung mit der Kinetik der Induktion in Einklang bringen läßt, die dritter Ordnung ist. Eine quantitative Theorie, die allen Fakten gerecht wird, ist noch nicht vorhanden. Wahrscheinlich genügt ein an den Repressor gebundenes IPTG-Molekül, um dessen Affinität zum Operator so weit zu schwächen, daß Induktion entsteht.

3.4. In-vitro-Messungen der Bindung zwischen Repressor und Operator

Die Bindung von Repressor an Operator-DNA ist mit zwei Methoden gemessen worden. Die eine bedient sich der Zentrifugation des Komplexes im Glycerin-Gradienten^[37], die andere der Adsorption des Komplexes an Nitrocellulose-Filter (Millipore-Filter)^[38]. DNA aus lac- o^+ -transduzierenden Phagen ist als Quelle für Operator-DNA benutzt worden. Das hat gegenüber DNA aus *E.coli* den Vorteil, daß man mit siebzigmal weniger DNA auskommt. Außerdem ist die Phagen-DNA bezüglich ihrer Größe homogen. Der Unterschied zwischen den Sedimentationskonstanten der λ h80₁₈₅₇t68dlac-DNA (40 S) und des Repressors (7 S) ermöglicht es, radioaktiv markierten Repressor, der an Operator-DNA gebunden ist, durch einen Glycerin-Gradienten hindurch zu verfolgen. Solche Untersuchungen brachten die folgenden Ergebnisse^[37,49]: Der Repressor wird mit einer Dissoziationskonstante der erwarteten Größe (10^{-11} bis 10^{-13} M) an den Operator gebunden. Die Bindungskonstante ist von der Salzkonzentration abhängig; steigende Salzkonzentration schwächt die Bindung. Die DNA muß nativ sein, denaturierte DNA bindet den Repressor nicht. Die Wechselwirkung ist spezifisch, denn der Repressor wird an λ h80-DNA nicht gebunden. Der Induktor (IPTG) ist in der Lage, die Bindung zu verhindern. Dieser Effekt ist spezifisch; der Antiinduktor ONPF zum Beispiel führt nicht zu einer Schwächung der Bindung.

In vitro konnte ebenfalls gezeigt werden, daß die Bindung des Repressors an o^c -DNA schwächer ist als die an Wildtyp-DNA. Dabei wurden zwei o^c -Mutanten benutzt, deren Verhalten qualitativ den Erwartungen entsprach: je stärker der o^c -Charakter ausgebildet ist, desto schwächer ist die Bindung^[37,38].

3.5. Physikalische Konsequenzen der festen Bindung zwischen Repressor und Operator

Die Dissoziationskonstante des Repressor-Operator-Komplexes (K_o) kann auch als Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten für die Vorwärts- und Rückwärtsreaktion (k_a bzw. k_b) definiert werden.

$$K_o = \frac{k_b}{k_a}$$

Der Repressor muß zum Operator diffundieren. Im Volumen der Zelle (10^{-12} cm^3) sind nur Sekunden nötig, bis der Repressor seinen Operator gefunden hat. Dann müssen noch möglicherweise Konformationsänderungen im Repressor und im Operator stattfinden, bevor der Komplex gebildet werden kann. Die Konformationsänderungen müssen sehr schnell sein. Die Geschwindigkeitskonstante der Vorwärtsreaktion ist zu $7 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ bestimmt worden^[50]. Sie ist mindestens eine

Größenordnung höher als erwartet. Das ließe sich durch eindimensionale Diffusion erklären, das heißt, der Repressor, der eine nicht allzu weit vom Operator entfernte DNA-Stelle trifft, könnte sehr schnell an der DNA entlang gleiten, bis er auf den Operator trifft.

Auch die Zerfallsgeschwindigkeit des Repressor-Operator-Komplexes ist gemessen worden^[50]: Sie ist mit $5 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ recht niedrig. Die Halbwertszeit des Komplexes liegt damit in der Gegend von einer halben Stunde. Auf den ersten Blick scheint damit unvereinbar zu sein, daß der Induktionsprozess in vivo weniger als 15 Sekunden benötigt^[51]. (Die beiden Arbeiten, die eine langsamere Induktion in vivo fanden, sind falsch^[52, 53].) Die Existenz eines ternären Komplexes zwischen Operator, Repressor und IPTG löst dieses Problem. Die Stärke der Repressor-Operator-Wechselwirkung nimmt durch die Bindung von IPTG ab, was in vitro zu schnellerer Dissoziation und in vivo zu schnellerer Induktion führt. In Gegenwart von IPTG ist die Zerfallsgeschwindigkeit des Repressor-Operator-Komplexes tatsächlich so groß, daß sie nicht gemessen werden kann^[54]. Die Existenz eines ternären IPTG-Repressor-Operator-Komplexes ist nicht so überraschend, wie sie auf den ersten Blick scheinen könnte. Es ist schon lange bekannt, daß nicht alle Induktoren bei der höchsten Induktorkonzentration vollständig induzieren. Beim Methyl-1-thio- β -D-galaktopyranosid (TMG), einem engen Verwandten des IPTG, liegt die Induktion bei Sättigung um 20% unter der mit IPTG erreichten Induktion^[55]. Man kann das durch das Auftreten eines TMG-Repressor-Operator-Komplexes erklären. Bei höchster TMG-Konzentration wären dann 20% des Operators inaktiv, weil sie an der Bildung des ternären Komplexes beteiligt sind. Der ternäre Repressor-ONPF-Operator-Komplex ist sogar stabiler als der binäre Repressor-Operator-Komplex^[54].

3.6. Die Größe des Operators

Die Größe des Operators läßt sich durch folgende Überlegungen abschätzen: Wenn der Operator keine Sekundärstruktur hat, und wenn der Repressor nur an den Operator und nicht an anderen DNA-Stellen in *E.coli* gebunden wird, dann muß der Operator mindestens 12 Basenpaare lang sein. Bezeichnen wir mit

A: die Zahl der Basenpaare in einem *E.coli*-Chromosom, mit

B: die Zahl der verschiedenen Basen und mit

n: die Zahl der Basenpaare, deren Sequenz nur einmal im Chromosom vorkommt, dann erhalten wir:

$$A = B^n$$

$$3.5 \cdot 10^6 = 4^n$$

$$n = 11 \text{ bis } 12$$

Diese Berechnung enthält einige Annahmen: Die DNA muß ein statistisches Polymer sein oder etwas spezifischer ausgedrückt, verschiedene Operatoren dürfen keine gemeinsamen Sequenzen haben. Die enge Nachbarschaft zwischen Operator und Promotor könnte ge-

gen diese Annahme sprechen. Wäre der Anteil an gemeinsamen Strukturen bei den Operatoren sehr hoch, so könnte die Zahl der Basenpaare, an die der Repressor spezifisch gebunden wird, erheblich geringer sein.

Die Existenz von Symmetrie im Operator^[50] und die Existenz einer Sekundärstruktur des Operators^[56] sind diskutiert worden: Es gibt jedoch keinen zwingenden Grund, mit ihnen zu rechnen. Die Betrachtung eines räumlichen Modells der DNA läßt vermuten, daß ein Protein die Basenpaare in der Vertiefung zwischen den beiden Ketten „erkennen“ kann. Auf eine Windung der Helix kommen zehn Basenpaare. Zwölf Basenpaare sind zusammengenommen nicht zu groß, als daß sie nicht von einer Untereinheit des Repressors abgegriffen werden könnten. Wenn jedes Basenpaar eine oder zwei Kilokalorien zur Bindungsenergie beiträgt, kann die Bindung des Repressors an die gesamte Struktur so fest werden, wie beobachtet.

Unglücklicherweise helfen rein genetische Messungen bei dieser Diskussion nicht weiter. Man könnte die Länge des Operators aus der Häufigkeit der Rekombination zwischen o^c -Mutanten^[50] oder aus der Mutationshäufigkeit von o^c -Mutanten^[58] bestimmen. Rekombinationsfrequenzen zwischen verschiedenen o^c -Mutanten sind gemessen worden. Sie ergeben den ziemlich hohen Wert von 200 Basenpaaren^[57]. Wie bei allen Rekombinationsmessungen für eng benachbarte Mutationen leiden die Daten unter den Einflüssen anderer Effekte, die die Werte für die Entfernungen zwischen den Mutationen unsicher machen. Man hat auch versucht, die Frequenzen von o^c -Mutationen im Verhältnis zu denen von i-Mutationen zu messen^[58]. Die bei o^c -Mutanten beobachtete relativ hohe Mutationshäufigkeit scheint auf den ersten Blick eine sehr große Struktur anzuzeigen. Man darf aber nicht vergessen, daß Stellen besonders großer Mutationshäufigkeit („hot spots“) solche Daten unsicher machen.

Versuche, die Größe des Operators direkt durch seine Isolierung zu bestimmen, sind in Arbeit. DNA-Bereiche, die nur 1/20 der DNA des λ h80dlac-Phagen enthalten und auf denen der Operator noch lokalisiert ist, sind isoliert worden^[59]. Sie sind 2500 Basenpaare lang und damit wesentlich länger als der Operator selbst. Kürzlich ist über die Isolierung einer Operator-DNA von 20 bis 23 Basenpaaren berichtet worden^[60]: ^{32}P -markierte DNA aus λ c₁₈₅₇S7plac wurde in Gegenwart von Repressor mit DNase abgebaut und das durch den Repressor abgeschirmte Stück auf Nitrocellulose-Filtern isoliert.

3.7. Repression in vitro

Die Repression in vitro läßt sich messen. Man kann ein isoliertes transkribierendes oder ein protein-synthetisierendes System verwenden. Beides ist versucht worden. Man kann λ h80dlac-DNA mit RNA-Polymerase in vitro transkribieren. Der lac-Messenger kann dabei von anderer RNA durch einen spezifischen Hybridisierungstest unterschieden werden. Man hat in einem System, das ausschließlich aus DNA, RNA-Polymerase und Repressor bestand, keine Repression beobachtet. Es scheint so,

als ob zusätzliche Faktoren nötig wären. Kürzlich wurde ein Erfolg durch Zugabe von Ribosomen gemeldet^[61]. Der Anspruch, in vitro die Synthese und die Repression von β -Galaktosidase beobachtet zu haben, ist einige Male erhoben worden^[62-64]. In den beiden ersten Fällen waren die Ergebnisse falsch. Im dritten Fall^[61] scheint das Ergebnis wohl untermauert zu sein. Aus den Experimenten folgt eine außerordentlich interessante Tatsache: Das System benötigt zur Funktion cyclisches AMP und ein Protein (das „cap-Protein“), das allen durch Katabolite reprimierten Systemen gemeinsam ist^[65, 66]. Nur die Gegenwart dieses Proteins und von cyclischem AMP ermöglicht die Synthese und Repression der lac-Struktur-Proteine.

3.8. Wirkungsmechanismus des Repressors

Wie arbeitet der Repressor? Welcher Prozeß wird gehemmt, wenn der Repressor an den Operator gebunden wird? Es gibt zwei Prozesse, auf die der Repressor einwirken könnte: der Start der Transcription oder die RNA-Kettenverlängerung. Nehmen wir an, es sei der Start der Transcription, so würde das bedeuten, daß entweder die RNA-Polymerase keine Möglichkeit hat, auf dem Promotor zu „sitzen“, oder daß die Startreaktion der RNA-Polymerase nicht möglich ist.

Es gibt einige biologische Hinweise darauf, daß der Repressor den Start der Transcription beeinträchtigt^[67]. Es ist eine Deletion isoliert worden, die von einem der Tryptophan-Gene bis in den (transponierten) lac-Promotor reicht. Die lac-Strukturgene werden jetzt durch den Tryptophan-Repressor kontrolliert. Der lac-Operator ist vom trp-Promotor, an dem jetzt die Transcription der lac-Gene beginnt, weit entfernt. Induziert man das Tryptophan-System und führt in diesen Stamm ein i^- -Gen auf einem Episom ein, dann sinkt die β -Galaktosidase-Menge in dem jetzt konstitutiven Tryptophan-Stamm um den Faktor 3. Man hat dies als Hinweis dafür genommen, daß der Repressor auch im Wildtyp etwas wie RNA-Kettenverlängerung und nicht den Start der Transcription beeinträchtigt^[67]. Mir scheint die gegenteilige Interpretation der Daten richtiger. Die 3-fache Repression der RNA-Kettenverlängerung dürfte ein Nebeneffekt sein. Besteht die Wirkung des Repressors in der sterischen Behinderung des Starts der Transcription, so müßten sich o^c -Mutanten finden lassen, die auf Insertionen zwischen dem Promotor und dem Operator zurückzuführen sind. Die Existenz solcher o^c -Mutanten sollte allerdings die Kartierung des Operators schwierig machen.

4. Evolution der Regulation des lac-Systems

Das lac-Operon und sein Regulator-Gen sind eng miteinander verbunden. Diese Situation ist bei *E.coli* nicht normal. Bei den meisten negativen Regulationssystemen liegen Struktur- und Regulations-Gene nicht nahe beieinander. Was hat sie im lac-System zusammengebracht? Diese Frage stellen heißt nach der Evolution des lac-Systems fragen. Es ist einleuchtend, daß das Produkt eines

Regulator-Gens in der Lage sein muß, ein kleines Molekül zu binden, das sterisch mit mindestens einem der Produkte oder Substrate des Enzyms verwandt sein muß, dessen Synthese reguliert werden soll. Es ist möglich, aber nicht notwendig, daß das Regulator-Gen durch Verdoppelung eines der Struktur-Gene, die reguliert werden sollten, entstanden ist. Dann müßte das i -Gen strukturell mit Teilen der z -, y - und a -Gene verwandt sein. Außerdem müßte der Vorläufer eines Repressors „lernen“, sich sehr nahe am Promotor der Struktur-Gene an das Chromosom zu binden. Duplikationen scheinen in der Genkarte in Tandem aufzutreten^[68], d. h. unmittelbar nebeneinander zu liegen. Das könnte als Erklärung für die enge Nachbarschaft zwischen dem i -Gen und den Struktur-Genen dienen. Uns fällt sonst keine vernünftige Erklärung dafür ein, wie ein Regulator-Gen, das anderswo entstanden ist, in derart enge Nachbarschaft zu den Struktur-Genen kommen kann. Wir haben nach Ähnlichkeiten zwischen den Strukturen des lac-Repressors und der β -Galaktosidase mit Hilfe immunologischer Methoden gesucht^[46] und haben im Ouchterlony-Test keine Kreuzreaktionen zwischen Repressor und β -Galaktosidase und den gegen sie gerichteten Antikörpern gefunden. Eine strukturelle Verwandtschaft zwischen Repressor und β -Galaktosidase wird damit unwahrscheinlich.

Es ist nicht bekannt, welche Zeitspanne die Evolution der lac-Gene benötigte. In *Shigella* (einem eng verwandten Bakterium) fehlt das y -Gen^[69]. Ist es verlorengegangen, oder hat *Shigella* nie ein Transportsystem für Lactose gebildet? Die i^+z^- -Gene allein sind nicht nutzlos: *Shigella* kann zwar nicht auf Lactose wachsen, aber auf Methylgalaktosid oder Galaktosidoglycerin, da diese durch ein anderes System transportiert werden. Es ist darauf hingewiesen worden^[12], daß Lactose ausschließlich in Säugetieren vorkommt, und daß *E.coli* älter sein muß als die Säugetiere, in denen es heute lebt. Galaktolipide finden sich außerordentlich häufig in Pflanzen. Es mag sein, daß die Ursprünge des lac-Systems zurückgehen auf Zeiten, in denen Galaktolipide die Substrate für *E.coli* waren. Andernfalls wäre das lac-System ziemlich neueren Ursprungs, was wiederum eine Erklärung für die enge Nachbarschaft zwischen Struktur- und Regulator-Genen bieten könnte: Die lac-Gene hatten noch nicht so viel Zeit, sich voneinander zu trennen, wie z. B. die sicher sehr alten Regulator- und Strukturgene, die an der Synthese der Aminosäuren beteiligt sind.

5. Wie allgemeingültig ist die negative Regulation der Protein-Synthese?

Als Jacob und Monod ihr Modell der genetischen Regulation vorschlugen, sah es so aus, als wäre es das einzige in *E.coli* vorkommende. Inzwischen sind weitere Systeme untersucht worden. Von diesen sind die negativen Kontroll-Systeme von λ - und $i_{434}c_1$ dem lac-System analog: Das Produkt des λ - und des $i_{434}c_1$ -Gens ist ein Oligomer^[70] und wird an Operator-DNA gebunden^[71, 72]. Ungefähr die Hälfte aller in *E.coli* bekannten Systeme gehorcht dem Schema von Jacob und Monod, aber die andere Hälfte scheint auf andere Weise zu arbeiten. Hier

begegnen wir den Charakteristiken der positiven Regulation: In Abwesenheit des Produktes des Regulator-Gens werden die Produkte der Struktur-Gene nicht hergestellt. Genetische Analysen machen es unwahrscheinlich, daß diese positiven Regulationssysteme auf bisher nicht identifizierte negative Regulationssysteme zurückzuführen sind. Und doch gibt es einen Weg, sie auf negative Systeme zurückzuführen: Es könnte nämlich die Verhinderung eines Stop-Vorgangs die Basis dieser Regulationen sein. Sollte dies auf der Ebene der Transcription stattfinden, dann könnte nur in Gegenwart des Produktes der Regulator-Gene die Transcription der Struktur-Gene erfolgen. Sigma-Faktoren^[73], die der RNA-Polymerase Spezifität gegenüber Promotoren verleihen, können mit im Spiel sein. Die biochemische Analyse, die allein diese Mechanismen beweisen kann, steht noch aus.

Ich danke der Stiftung Volkswagenwerk für die Maschinen zur Sequenzanalyse und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung der laufenden Arbeit. Ich danke weiter meinen Kollegen vom Institut für Genetik, daß sie dieses Manuskript kritisch gelesen haben, und allen Kollegen, die mir unveröffentlichte Information zugänglich gemacht haben.

Eingegangen am 18. Juni 1970 [A 807]

Übersetzt von Dr. Thomas Höpner, Heidelberg

- [1] F. Jacob u. J. Monod, *J. Mol. Biol.* 3, 318 (1961).
- [2] J. R. Beckwith u. D. Zipser: The Lactose Operon, Cold Spring Harbor Laboratory (1970).
- [3] A. Kumar u. W. Szybalsky, *J. Mol. Biol.* 40, 145 (1969).
- [4] K. Ippen, J. H. Miller, J. Scaife u. J. Beckwith, *Nature* 217, 825 (1968).
- [5] J. H. Miller, J. Beckwith u. B. Müller-Hill, *Nature* 220, 1287 (1968).
- [6] H. V. Rickenberg, G. N. Cohen, G. Buttin u. J. Monod, *Ann. Inst. Pasteur* 91, 829 (1956).
- [7] C. Burstein, M. Cohn, A. Kepes u. J. Monod, *Biochim. Biophys. Acta* 95, 634 (1965).
- [8] K. Wallenfels u. O. P. Malhotra, *Advan. Carbohydrate Chem.* 16, 239 (1961).
- [9] B. Müller-Hill, H. V. Rickenberg u. K. Wallenfels, *J. Mol. Biol.* 10, 303 (1964).
- [10] J. Monod, G. Cohen-Bazire u. M. Cohn, *Biochim. Biophys. Acta* 7, 585 (1951).
- [11] J. Monod: *Enzymes: Units of Biological Structure and Function*, Academic Press, New York 1956, S. 7.
- [12] W. Boos u. K. Wallenfels, *Eur. J. Biochem.* 3, 360 (1968).
- [13] K. Jayaraman, B. Müller-Hill u. H. V. Rickenberg, *J. Mol. Biol.* 18, 339 (1966).
- [14] B. Williams u. K. Paigen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24, 143 (1966).
- [15] J. Davies u. F. Jacob, *J. Mol. Biol.* 36, 413 (1968).
- [16] B. Müller-Hill, L. Crapo u. W. Gilbert, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 59, 1259 (1968).
- [17] S. Bourgeois, M. Cohn u. L. Orgel, *J. Mol. Biol.* 14, 300 (1965).
- [18] B. Müller-Hill, *J. Mol. Biol.* 15, 374 (1966).
- [19] J. H. Miller, persönliche Mitteilung (1969).
- [20] F. Jacob u. J. Monod in L. Löcke: Cytodifferentiation and Macromolecular Synthesis, Academic Press, New York 1963.
- [21] L. G. Myers u. J. R. Sadler, noch unveröffentlicht.
- [22] J. R. Sadler u. A. Novick, *J. Mol. Biol.* 12, 305 (1965).
- [23] C. Willson, D. Perrin, M. Cohn, F. Jacob u. J. Monod, *J. Mol. Biol.* 8, 582 (1964).
- [24] W. Gilbert u. B. Müller-Hill, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 56, 1891 (1966).
- [25] M. Pfahl, J. H. Miller u. B. Müller-Hill, noch unveröffentlicht.
- [26] J. H. Miller in J. R. Beckwith u. D. Zipser: The Lactose Operon, Cold Spring Harbor Laboratory 1970, S. 173.
- [27] J. Beckwith u. E. R. Signer, *J. Mol. Biol.* 19, 254 (1966).
- [28] A. W. Harris, D. W. A. Mount, C. R. Fuerst u. L. Siminovitch, *Virology* 32, 553 (1967).
- [29] A. B. Pardee, F. Jacob u. J. Monod, *J. Mol. Biol.* 1, 165 (1959).
- [30] S. D. Barbour u. A. B. Pardee, *J. Mol. Biol.* 20, 505 (1966).
- [31] W. Epstein, *J. Mol. Biol.* 30, 529 (1967).
- [32] M. Pfahl, *Mol. Gen. Genetics* 105, 122 (1969).
- [33] S. D. Barbour, C. Gross u. A. Novick, *J. Mol. Biol.* 33, 967 (1968).
- [34] A. B. Pardee u. L. S. Prestidge, *Biochim. Biophys. Acta* 49, 77 (1961).
- [35] F. Jacob u. J. Monod, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 26, 193 (1961).
- [36] A. D. Riggs u. S. Bourgeois, *J. Mol. Biol.* 34, 361 (1968).
- [37] W. Gilbert u. B. Müller-Hill, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 58, 2415 (1967).
- [38] A. D. Riggs, R. R. Newby, S. Bourgeois u. M. Cohn, *J. Mol. Biol.* 34, 365 (1968).
- [39] A. D. Riggs, J. Suzuki u. S. Bourgeois, *J. Mol. Biol.* 48, 67 (1970).
- [40] P. Minden u. R. S. Farr in Weir: *Handbook of Experimental Immunology*, Blackwell Publications, Oxford 1967.
- [41] Zur Isolierung des lac-Repressors siehe B. Müller-Hill, *Sci. J. (London)* 5A, 48 (1969); M. Ptashne u. W. Gilbert, *Sci. Amer.* 222, 36 (1970).
- [42] Y. Ohshima, J. Tomizawa u. T. Horiuchi, *J. Mol. Biol.* 34, 195 (1968).
- [43] S. Bourgeois u. A. Jobe in J. R. Beckwith u. D. Zipser: The Lactose Operon, Cold Spring Harbor Laboratory 1970, S. 325.
- [44] B. Müller-Hill, K. Beyreuther u. W. Gilbert, *Methods Enzymol.*, im Druck (1970).
- [45] K. Weber, T. Platt u. R. Burgess, persönliche Mitteilung.
- [46] K. Beyreuther, A. Klemm u. B. Müller-Hill, noch unveröffentlicht.
- [47] F. Jacob, A. Ullman u. J. Monod, *C. R. Acad. Sci. Paris* 258, 3125 (1964).
- [48] P. Overath, *Mol. Gen. Genetics* 101, 155 (1968).
- [49] A. D. Riggs, H. Suzuki u. S. Bourgeois, *J. Mol. Biol.* 48, 67 (1970).
- [50] A. D. Riggs, S. Bourgeois u. M. Cohn, *J. Mol. Biol.* 53, 401 (1970).
- [51] A. Kepes, *Biochim. Biophys. Acta* 76, 293 (1963).
- [52] J. A. Boezi u. D. B. Cowie, *Biophys. J.* 1, 639 (1961).
- [53] B. Müller-Hill, H. V. Rickenberg u. K. Wallenfels, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 18, 751 (1965).
- [54] A. D. Riggs, R. F. Newby u. S. Bourgeois, *J. Mol. Biol.* 51, 303 (1970).
- [55] L. A. Herzenberg, *Biochim. Biophys. Acta* 31, 525 (1959).
- [56] A. Gierer, *Nature* 212, 1480 (1966).
- [57] J. H. Miller, K. Ippen, J. G. Scaife u. J. Beckwith, *J. Mol. Biol.* 38, 413 (1968).
- [58] S. Bourgeois, Dissertation, Universität Paris 1965.
- [59] S. Bourgeois u. A. D. Riggs, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38, 348 (1970).
- [60] W. Gilbert, Persönliche Mitteilung (1970).
- [61] Y. Ohshima, T. Horiuchi, Y. Iida u. T. Kameyama, *Mol. Gen. Genetics* 106, 307 (1970).
- [62] G. D. Novelli, T. Kameyama u. J. M. Eisenstadt, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 26, 133 (1961).
- [63] B. Nisman, R. Cohen, A. Kayser, H. Fukahara, J. Demailly, O. Genin u. D. Giron, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 26, 145 (1961).
- [64] D. A. Chambers u. G. Zubay, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 63, 118 (1969).
- [65] G. Zubay, D. Schwartz u. J. Beckwith, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 66, 104 (1970).
- [66] B. de Crombrughe, H. E. Varmus, R. L. Perlman u. J. H. Pastan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38, 894 (1970).
- [67] W. S. Reznikoff, J. H. Miller, J. G. Scaife u. J. Beckwith, *J. Mol. Biol.* 43, 201 (1969).
- [68] R. L. Russel, J. N. Abelson, A. Landy, M. L. Gefter, S. Brenner u. J. D. Smith, *J. Mol. Biol.* 47, 1 (1970).
- [69] S. E. Luria in V. Bryson u. H. J. Vogel: *Evolving Genes and Proteins*, Academic Press, New York 1965, S. 357.
- [70] V. Pirrotta, P. Chadwick u. M. Ptashne, *Nature* 227, 41 (1970).
- [71] M. Ptashne, *Nature* 214, 232 (1967).
- [72] V. Pirrotta u. M. Ptashne, *Nature* 222, 541 (1969).
- [73] R. R. Burgess, A. A. Travers, J. J. Dunn u. E. K. F. Bautz, *Nature* 221, 43 (1969).