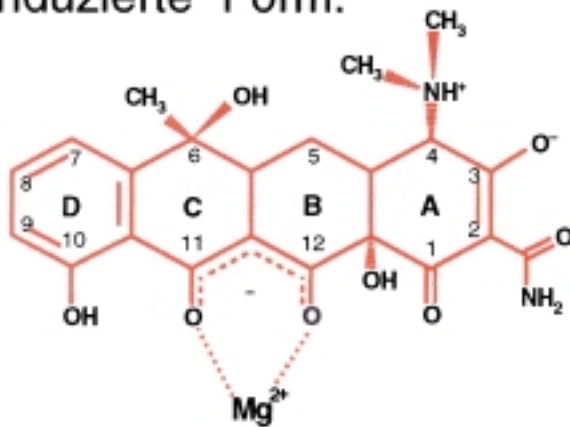
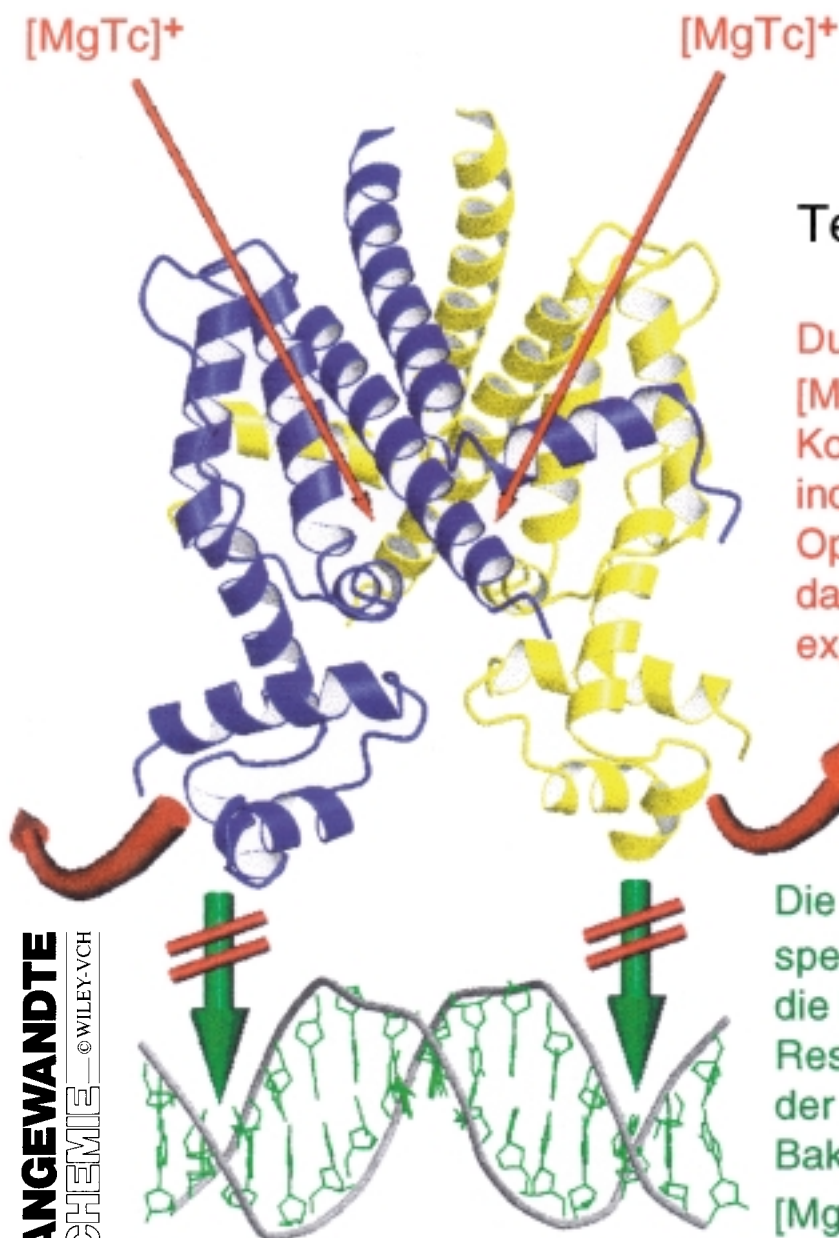


In Gram-negativen Bakterien wird die Resistenz gegen das Antibiotikum Tetracyclin (Tc) durch zwei Zustände des dimeren Tetracyclin-Repressors (TetR)₂ reguliert: gebunden 1) an Operator-DNA und 2) an $[\text{MgTc}]^+$; dies ist die "induzierte" Form.



Wenn Tc in die Bakterienzelle eintritt, bindet es Mg^{2+} und bildet das biologisch aktive Chelat $[\text{MgTc}]^+$.



Tetracyclin Repressor

Durch die Bindung des Chelats $[\text{MgTc}]^+$ werden in (TetR)₂ Konformationsänderungen induziert (dicke Pfeile), sodass Operator-DNA freigegeben und das Resistenz-Protein TetA exprimiert wird.

Die Bindung von (TetR)₂ an spezifische Operator-DNA inhibiert die Biosynthese (Expression) des Resistenz-Proteins TetA. Dies ist der Zustand der resistenten Bakterienzelle in Abwesenheit von $[\text{MgTc}]^+$.

Der Tetracyclin-Repressor – das Musterbeispiel für einen biologischen Schalter

Wolfram Saenger,* Peter Orth, Caroline Kisker, Wolfgang Hillen und Winfried Hinrichs

Durch den übermäßigen Gebrauch von Antibiotika haben Bakterien Resistenzen erworben, die unterschiedlichen Mechanismen folgen. Die bakteriostatische Wirkung des Breitbandantibiotikums Tetracyclin (Tc) beruht auf der Inaktivierung der bakteriellen Ribosomen, sodass die Proteinbiosynthese unterbrochen wird und die Bakterien absterben. Der in Gram-negativen Bakterien am häufigsten vorkommende Resistenzmechanismus gegen Tc beruht auf dem membranständigen Protein TetA, das eingedrunenes Tc aus der Bakterienzelle exportiert, bevor es die Ribosomen angreifen kann. Die Expression des TetA-Proteins

wird durch den homodimeren Tet-Repressor (TetR)₂ streng reguliert. In Abwesenheit von Tc bindet er an die spezifische DNA-Sequenz des Operators *tetO* ($K_{\text{ass}} \approx 10^{11} \text{ M}^{-1}$), der vor dem das Protein TetA kodierenden Gen liegt und dessen Transkription blockiert. Wenn Tc in die Bakterienzelle diffundiert, koordiniert es Mg^{2+} , bindet als $[\text{MgTc}]^+$ an den Komplex $[(\text{TetR})_2 \cdot \text{tetO}]$ und bewirkt Konformationsänderungen im Repressor, die zur Dissoziation des induzierten Repressors $(\text{TetR} \cdot [\text{MgTc}])_2$ von *tetO* führen. Damit wird die Biosynthese des TetA-Proteins ermöglicht und die Bakterienzelle resistent gegen Tc. Kri-

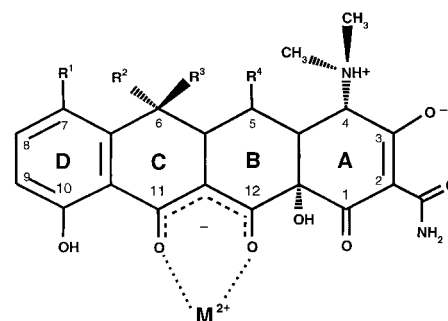
stallographische Studien zeigen die spezifischen Protein-Nucleinsäure-Wechselwirkungen in $(\text{TetR})_2 \cdot \text{tetO}$ sowie die Konformationsänderungen, die durch die Bindung von $2[\text{MgTc}]^+$ an $(\text{TetR})_2$ ausgelöst und durch zwei kooperative Ketten von jeweils acht Wassermolekülen stabilisiert werden. Da die Schaltzustände des TetR/ $[\text{MgTc}]^+$ -Systems so exakt definiert sind, wird es erfolgreich zur Regulation von eukaryontischer Genexpression eingesetzt und könnte Anwendung in der Gentherapie finden.

Stichwörter: Antibiotika • DNA-Erkennung • Resistenz • Tetracycline

1. Einleitung: Regulation der Tetracyclin-Resistenz

Die Fähigkeit von Bakterien, rasch mit genetischen Änderungen auf ihre Umgebung zu reagieren und unter unwirtlichen Bedingungen zu überleben, verursacht erste Probleme in der heutigen Pharmakologie und Medizin,^[1–3] da fast alle pathogenen Bakterien Resistenzen gegen die bekannten und oft verwendeten Antibiotika erworben haben. Die Resistenzen beruhen auf Proteinen, deren kodierende Gene

häufig auf beweglichen genetischen Elementen wie Transposons oder Resistenz(R)-Faktoren liegen,^[4–6] die schnell und sehr effizient unter den Bakterien ausgetauscht und verteilt werden können. Eines der am besten untersuchten Beispiele bakterieller Resistenz richtet sich gegen das Breitbandantibiotikum Tetracyclin (Tc) und seine chemisch modifizierten Analoga (Schema 1).



Schema 1. Chemische Struktur von Tetracyclin (Tc). In den therapeutisch eingesetzten Tetracyclinen können die Substituenten wie folgt verändert sein: $\text{R}^1 = \text{H}, \text{Cl}, \text{N}(\text{CH}_3)_2$; $\text{R}^2 = \text{CH}_3, \text{H}$; $\text{R}^3 = \text{OH}, \text{H}$; $\text{R}^4 = \text{H}, \text{OH}$. Unter physiologischen Bedingungen wird ein zweiwertiges Metallion M^{2+} (bevorzugt Mg^{2+}) von der deprotonierten 1,3-Keto-Enol-Gruppe $\text{O}11/\text{O}12^{(-)}$ unter Bildung von $[\text{MgTc}]^+$ koordiniert.

[*] Prof. Dr. W. Saenger, Dr. P. Orth

Freie Universität Berlin
Institut für Kristallographie
Takustraße 6, 14195 Berlin (Deutschland)

Prof. Dr. C. Kisker
State University of New York at Stony Brook
Department of Pharmacological Sciences
Stony Brook, NY 11794-8651 (USA)

Prof. Dr. W. Hillen
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
Institut für Mikrobiologie und Biochemie
Staudtstraße 5, 91058 Erlangen (Deutschland)

Prof. Dr. W. Hinrichs
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Institut für Chemie und Biochemie
Soldmannstraße 6, 17487 Greifswald (Deutschland)



W. Saenger



P. Orth



C. Kisker



W. Hillen



W. Hinrichs

Wolfram Saenger, geboren 1939 in Frankfurt am Main, studierte Chemie an der Technischen Hochschule Darmstadt und promovierte 1965 bei F. Cramer mit einer Arbeit über die Kinetik von Cyclodextrin-Einschlussverbindungen. In einem zweijährigen Postdoc-Aufenthalt bei J. Z. Gougoutas an der Harvard Universität machte er sich mit der Röntgen-Kristallstrukturanalyse vertraut.

Danach ging er an das Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen zu F. Cramer und baute dort eine unabhängige Gruppe auf, die sich mit Strukturanalysen von Cyclodextrinen, Proteinen und Nucleinsäuren beschäftigte. 1972 erfolgte die Habilitation an der Universität Göttingen und seit 1981 ist er Inhaber des Lehrstuhls für Kristallographie an der Freien Universität Berlin. 1987 erhielt er den Leibniz-Preis und 1989 den Humboldt-Preis. Neben der Strukturbio-logie gehören Wasserstoffbrückenbindungen und die Protein-Aggregation und -Kristallisation zu seinen Forschungsinteressen. Professor Saenger ist Mitglied des Kuratoriums der Angewandten Chemie.

Peter Orth, geboren 1969 in Berlin, studierte Chemie an der Lomonossow Universität in Moskau und legte 1994 sein Diplom ab. Er promovierte an der Freien Universität Berlin bei W. Saenger. In seiner Dissertation ermittelte er den Regulationsmechanismus des Tetracyclin-Repressors. Seit 1998 arbeitet er als Postdoc in der Arbeitsgruppe von W. Saenger an der Strukturaufklärung des Membranproteins Photosystem II.

Caroline Kisker, geboren 1964 in Berlin, studierte Biochemie an der Freien Universität Berlin und promovierte 1994 in der Arbeitsgruppe von W. Saenger über die Röntgenstrukturanalyse des Tetracyclin-Repressors im Komplex mit seinem Induktor Tetracyclin. Ihre Dissertation wurde mit dem Karl-Ramsauer-Preis ausgezeichnet. Nach der Promotion schloss sie sich der Arbeitsgruppe von D. C. Rees am California Institute of Technology in Pasadena an, wo sie mit der Strukturanalyse einer archaischen Carboanhydrase einen neuen Proteinfaltungstyp nachweisen konnte und mit einer weiteren Arbeit entscheidende Kenntnisse zum Verständnis der Sulfitoxidase-Defizienz lieferte. Seit ca. zwei Jahren ist sie Assistant Professor an der State University of New York in Stony Brook. In ihrer Forschung beschäftigt sie sich mit DNA-Reparatur-Enzymen und mit eukaryontischen Molybdäncofaktor-enthaltenden Enzymen.

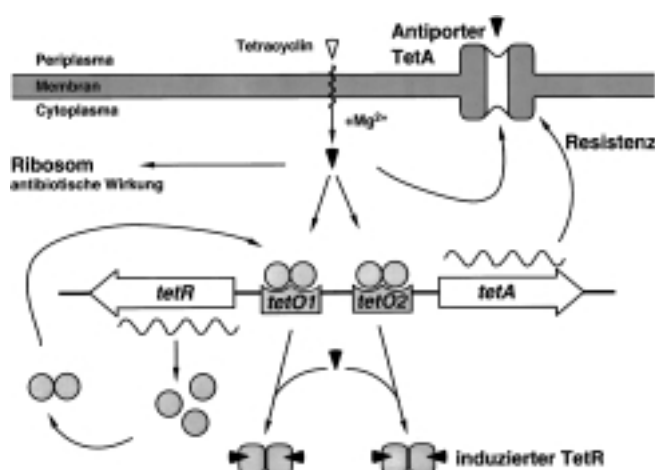
Wolfgang Hillen, geboren 1948 in Osnabrück, studierte Chemie an der Universität Münster und promovierte 1977 bei H.-G. Gassen mit einer Arbeit über die Codon-Anticodon-Erkennung. Von 1978 bis 1980 arbeitete er als Postdoc an der University of Wisconsin, Madison, bei R. D. Wells über sequenzspezifische DNA-Strukturen. Danach baute er am Institut für Biochemie der Technischen Hochschule Darmstadt eine eigene Arbeitsgruppe auf und habilitierte sich 1983 für Biochemie mit einer Arbeit über Mechanismen der Genregulation. 1984 wurde er zum Professor für Physikalische Biologie an der Universität Düsseldorf ernannt und ist seit 1986 Inhaber des Lehrstuhls für Mikrobiologie an der Universität Erlangen-Nürnberg. 1986 erhielt er den Carl-Duisberg-Preis der GDCh und 1997 den Max-Planck-Forschungspreis. Neben den molekularen Mechanismen der Genregulation interessiert er sich derzeit speziell für Fragen der Protein-Ligand-Wechselwirkung, der Signalübertragung zwischen physiologischen Parametern und Genregulatoren sowie der allosterischen Konformationsänderungen bei Proteinen.

Winfried Hinrichs, geboren 1950 in Hamburg, absolvierte eine Chemielaboranten-Lehre, studierte zunächst Chemie-Ingenieurwesen (1970–1973) und dann, nach einem Industrieaufenthalt, Chemie von 1976–1980. Er promovierte 1983 mit einer Arbeit über organische Halbleiter am Institut für Anorganische und Angewandte Chemie der Universität Hamburg in der Arbeitsgruppe von G. Klar. Nach einem Postdoc-Aufenthalt an der Rijksuniversiteit te Leyden (Niederlande) ging er 1986 an die Freie Universität Berlin (Institut für Kristallographie, Arbeitsgruppe W. Saenger), wo er sich 1996 im Fachbereich Chemie habilitierte. Nach einem einjährigen Gastaufenthalt im Arbeitskreis von D. Moras in Strasbourg (Université Louis Pasteur, IGBMC) folgte er 1999 einem Ruf auf den Lehrstuhl Biochemie I an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald. Seine wissenschaftlichen Arbeiten sind geprägt von der Anwendung der Röntgenstrukturanalyse. Eines seiner Interessengebiete sind Struktur-Funktions-Beziehungen biologischer Makromoleküle.

Nachdem Tc durch die cytoplasmatische Membran in Bakterien verschiedener Spezies eingedrungen ist, bindet es ein zweiwertiges Kation Mg^{2+} , vorzugsweise Mg^{2+} . Das Chelat $[MgTc]^+$ (Schema 1) übt seine Wirkung aus, indem es an die kleine (30S) prokaryontische ribosomale Untereinheit bindet ($K_{ass} \approx 10^6 M^{-1}$), wodurch die Proteinbiosynthese inhibiert wird und die betroffene Zelle nicht mehr wächst.^[7, 8] Die zurzeit bekannten Resistenzmechanismen^[6] gegen Antibiotika des Tc-Typs umfassen Proteine, die entweder das Ribosom vor dem Angriff durch $[MgTc]^+$ schützen^[9, 10] oder eingedrungenes Tc aus der Bakterienzelle exportieren.^[11–14] Außerdem kann Tc durch Resistenzproteine modifiziert werden, doch spielt dieser Resistenzmechanismus zurzeit keine bedeutende Rolle.^[15] Unter Gram-negativen Bakterien tritt der Exportmechanismus am häufigsten auf. Er beruht auf dem Transportprotein TetA, das in die cytoplasmatische Membran eingebettet wird und als Antiporter den Export von $[MgTc]^+$ aus der resistenten Bakterienzelle an die Aufnahme von H^+ koppelt.^[16, 17] Die Expression von TetA ist durch den Tetracyclin-Repressor (Tet-Repressor, TetR) eindeutig reguliert, weil TetA in Abwesenheit von $[MgTc]^+$ das elektrostatische Potential über die Zellmembran stört^[18] und damit die Zelle schädigt.

1.1. Der Tet-Repressor (TetR) und seine Induktion durch $[MgTc]^+$

Der Tetracyclin-Repressor liegt als Homodimer $(TetR)_2$ vor. Er enthält zwei identische Helix-Turn-Helix (HTH)-Motive, die in Abwesenheit von $[MgTc]^+$ an zwei benachbarte große Furchen der DNA binden. Zu nichtspezifischen DNA-Sequenzen hat $(TetR)_2$ nur geringe Affinität, aber es bindet sehr fest ($K_{ass} \approx 10^{11} M^{-1}$) an zwei spezifische Operator-DNA-Bereiche, *tetO1* und *tetO2*, mit sehr ähnlichen Nucleotidsequenzen^[18, 19] und zweifacher (palindromer) Symmetrie. Sie bilden mit $(TetR)_2$ die Komplexe $[(TetR)_2 \cdot tetO]$ (hier und im Folgenden bezeichnet *tetO* sowohl *tetO1* als auch *tetO2*) und blockieren die Transkription des Gens *tetR* (abhängig von *tetO1*), das TetR selbst kodiert, sowie des Gens *tetA* (abhängig von *tetO1* und *tetO2*), das das Resistenzprotein TetA kodiert (Schema 2, 3 A). Wenn Tc in eine Bakterienzelle eindiffundiert, bildet es mit Mg^{2+} das Chelat $[MgTc]^+$. In einer resistenten Zelle, die die Gene *tetR* und *tetA* trägt, bindet das Chelat an den Komplex $[(TetR)_2 \cdot tetO]$ ($K_{ass} \approx 10^9 M^{-1}$)^[20] und erzwingt Konformationsänderungen in $(TetR)_2$, die seine Affinität zu *tetO* in zwei Schritten herabsetzt: 10^2 – 10^3 -fach bei Bindung des ersten und weitere 10^4 – 10^7 -fach bei Bindung des zweiten Moleküls $[MgTc]^+$, sodass schließlich die gesamte Affinität von $(TetR)_2$ zu *tetO* um 6–10 Größenordnungen verringert wird.^[19] Der von dem Homodimer $(TetR)_2$ und zwei Induktoren $[MgTc]^+$ gebildete „induzierte“ Komplex $(TetR \cdot [MgTc]^+)_2$ fällt vom Operator *tetO* ab, sodass die Expression der Gene *tetR* und *tetA* erfolgen kann. Das nun synthetisierte Antiporterprotein TetA wird in die cytoplasmatische Membran eingelagert und exportiert $[MgTc]^+$. Da $[MgTc]^+$ eine ca. 1000-fach höhere Affinität zu $(TetR)_2$ aufweist als zu der kleinen Untereinheit des Ribosoms, wird der Resistenzmechanismus aktiviert, bevor die Proteinbiosynthese durch Angriff auf das Ribosom inhibiert wird.



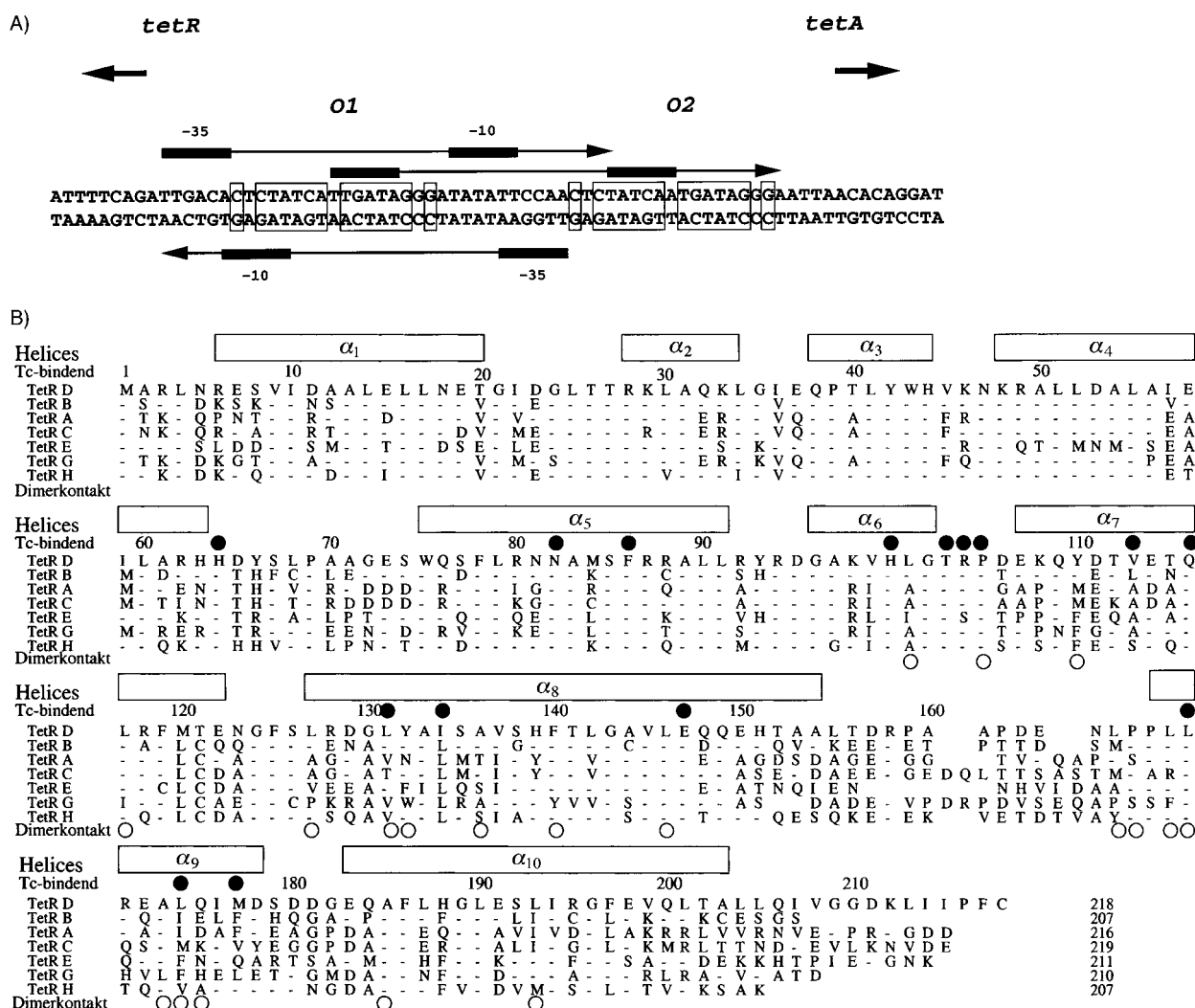
Schema 2. Übersicht zur Tetracyclin(Tc)-Resistenz: Der Tet-Repressor (TetR; als graue Kugeln dargestellt) bindet als Homodimer an die Operatoren *tetO1* und *tetO2*. Tc (offenes Dreieck) diffundiert in die (Bakterien-) Zelle und bildet mit einem zweiwertigen Kation (Mg^{2+}) das Chelat $[MgTc]^+$ (schwarze Dreiecke). Wenn $[MgTc]^+$ an den Komplex $[(TetR)_2 \cdot tetO]$ bindet, erzwingt es eine Konformationsänderung und der „induzierte“ Komplex $(TetR \cdot [MgTc]^+)_2$ gibt den Operator frei, sodass die Transkription der Gene *tetR* (kodiert TetR) und *tetA* (kodiert das Resistenzprotein TetA) erfolgen kann (Schlangenlinien stellen mRNA dar). Nach der Translation wird TetA in die cytoplasmatische Membran eingebaut und exportiert eingedrungenes $[MgTc]^+$ aus der Zelle, sodass es nicht seinen Zielort, das Ribosom, angreifen kann. Der Export von $[MgTc]^+$ ist an den Import von H^+ gekoppelt.

1.2. Der Tet-Repressor ist ein einzigartiger biologischer Schalter

Die hohe Affinität von $(TetR)_2$ zu den DNA-Operatoren *tetO1* und *tetO2* wird durch die Bindung des Induktors $[MgTc]^+$ an $(TetR)_2$ fast aufgehoben. Diese wohldefinierte Schaltung zwischen zwei Zuständen, die für die Regulation der Genexpression wichtig sind, ist einmalig unter den bekannten induzierbaren prokaryontischen Repressoren. Dies ist der Grund, warum $(TetR)_2/[MgTc]^+$ von Molekularbiologen als ein leicht kontrollierbarer und exakt regulierender, nichtleckender Schalter für die Regulation der Genexpression in transgenen Organismen verwendet wird.^[21–23] Um den molekularen Mechanismus der TetR-Regulation auf atomarem Niveau zu verstehen, haben wir Röntgenstrukturanalysen von $(TetR)_2$, seinen Komplexen mit verschiedenen nativen und chemisch modifizierten $[MgTc]^+$ und mit Oligonucleotid-Duplexen, die die Operator-DNA-Sequenz *tetO1* enthalten, bestimmt.^[24–28] Die Ergebnisse dieser Studien bilden die Grundlage der nun folgenden Diskussion.

2. Biochemischer Hintergrund: die Tc- und TetR-Familien und die DNA-Operatoren *tetO*

Von den vier für Tc charakteristischen Sechsringen A–D ist nur D aromatisch (siehe Schema 1). Auf der „Südseite“ des Tc-Moleküls liegen fünf Hydroxy/Keto-Gruppen in einer geeigneten Anordnung, um Metallionen zu koordinieren.^[27] Unter physiologischen pH-Bedingungen ist die 1,3-Keto-Enol-Gruppe O11/O12 deprotoniert und weist eine hohe



Schema 3. A) Nucleotidsequenzen der Operatoren *tetO1* und *tetO2* für die Klasse TetR^D, wie sie im Resistenzfaktor RA1 vorliegen. Die umrandeten Operatorsequenzen sind palindromisch und enthalten ein zusätzliches Basenpaar A-T oder T-A in der Position der zweizähligen Symmetrieachse. Der Promotor von *tetA* ist über der Sequenz angegeben, der von *tetR* unterhalb der Sequenz; die Bindungsregion für RNA-Polymerase (TATA- und GC-reiche Boxen) sind durch dicke Linien, die mit -10 bzw. -35 bezeichnet sind, angedeutet. Die Transkriptionsrichtungen sind mit dicken Pfeilen gekennzeichnet. B) Die sieben Aminosäuresequenzen der TetR-Klassen A–E, G und H. Bindestriche (–) bezeichnen Aminosäuren, die mit denen in der ersten Zeile (TetR^D) identisch sind, jede zehnte Aminosäure ist markiert. Die α -Helices α_1 – α_{10} sind über den Sequenzen angedeutet. Aminosäuren, die mit • in der Zeile „Tc-bindend“ bezeichnet sind, wechselwirken mit dem Induktor [MgTc⁺] im Komplex (TetR·[MgTc⁺])₂; diese Aminosäuren sind konserviert oder Typ-konserviert. Offene Kreise (○) in der letzten Zeile („Dimerkontakt“) kennzeichnen Aminosäuren, die zu Monomer-Monomer-Kontakten in (TetR^D)₂ beitragen. Das Helix-Turn-Helix (HTH)-Motiv, das an Operator-DNA (*tetO*) bindet, ist mit α_2 und α_3 bezeichnet.

Affinität zu zweiwertigen Kationen auf. Die Bindung von Mg²⁺ ist in wässriger Lösung bevorzugt ($K \approx 10^3 \text{ M}^{-1}$). Der Komplex hat eine positive Nettoladung, [MgTc]⁺, und ist in dieser Form biologisch aktiv.^[29]

Zurzeit sind sieben hoch homologe Resistenz-Determinanten des Typs TetR bekannt. Sie liegen in die Klassen A bis E, G und H gruppiert und weisen 45 % bis 75 % Aminosäuresequenzidentität auf (siehe Schema 3B). Wie zu erwarten ist, wird die höchste Identität/Homologie in Positionen gefunden, von denen man weiß, dass sie an der Bindung des Induktors [MgTc]⁺ und des DNA-Operators beteiligt sind. Die hohe Aminosäuresequenzidentität lässt vermuten, dass alle TetR-Klassen eine ähnliche globale Faltung mit zehn α -Helices und ohne β -Stränge aufweisen, wie durch kristallographische Studien an den TetR-Klassen B und D, TetR^B bzw. TetR^D,

gezeigt werden konnte.^[24–28] Es gibt nur ein Segment zwischen den α -Helices α_8 und α_9 , in dem Deletionen bzw. Insertionen auftreten und die Länge des C-Terminus ist variabel, doch liegt die Gesamtlänge der TetR-Polypeptidkette im Bereich von 207 bis 218 Aminosäuren. Eine Vielzahl von willkürlichen und zielgerichteten Punktmutationen ergab Varianten von TetR, die zu unserem Verständnis der Funktion dieses Proteins beigetragen haben und in Abschnitt 5 diskutiert sind.

Die beiden DNA-Operatoren *tetO1* und *tetO2* sind palindromisch mit einem zusätzlichen Basenpaar, das zentral auf ihren Symmetrieachsen liegt (siehe Schema 3A). Die damit assoziierten Gene *tetR* und *tetA* sind in entgegengesetzter Polarität angeordnet und werden von den Promotoren für die Transkription von *tetA* und *tetR* überlappt. Der Abstand

zwischen den Symmetrieachsen von *tetO1* und *tetO2* hängt vom jeweiligen Regulon in den unterschiedlichen Transposons und R-Faktoren ab und variiert zwischen 27 und 36 Basenpaaren. Wie durch Footprint-Analysen gezeigt wurde, binden die Erkennungshelices α_3 und $\alpha_{3'}$ des homodimeren $(\text{TetR})_2$ an zwei benachbarte große Furchen der Operatoren *tetO1* und *tetO2*.^[31, 32]

3. Kristallographische Studien korrelieren Struktur und Funktion von TetR

3.1. Architektur des $(\text{TetR}^D)_2$ -Homodimers

Die Kristallstrukturanalysen des $(\text{TetR}^D)_2$ -Homodimers im Komplex mit Operator-DNA und in der induzierten Form als Komplex mit zwei Molekülen $[\text{MgTc}]^+$ haben gezeigt, dass die Polypeptidketten nicht aus den 218 Aminosäuren bestehen, die der Nucleotidsequenz des *tetR^D*-Gens entsprechen, sondern dass der N-terminale Met1-Rest und die C-terminalen zehn Aminosäuren fehlen, wie durch N- und C-terminale Sequenzierung und matrixassistierte Laserdesorptions/ionisations(MALDI)-MS bestätigt wurde. Diese Deletionen erfolgen posttranslational (Met1) oder während der Präparation (zehn C-terminale Aminosäuren) und haben keinen Einfluss auf die biologische Aktivität von TetR^D .

Die beiden Monomere von $(\text{TetR}^D)_2$ sind identisch und in jeweils zehn α -Helices gefaltet, die mit $\alpha_1 - \alpha_{10}$ für das eine und $\alpha_{1'} - \alpha_{10'}$ für das andere Monomer bezeichnet werden (Abbildung 1). Die Monomere sind über eine zweizählige Rotationsachse, die mit der langen Achse des $(\text{TetR}^D)_2$ -Dimers zusammenfällt, symmetrieäquivalent. $(\text{TetR}^D)_2$ ist deutlich unterteilt in zwei kleine, N-terminale, DNA-bindende Domänen und in eine große, globuläre, regulatorische Kerndomäne.

Die DNA-bindenden Domänen bestehen aus den N-terminalen Drei-Helix-Bündeln $\alpha_1/\alpha_2/\alpha_3$ und $\alpha_{1'}/\alpha_{2'}/\alpha_{3'}$. Dabei sind α_2 und $\alpha_{2'}$ die Gerüst-Helices α_3 und $\alpha_{3'}$ die DNA-Erkennungshelices des klassischen Helix-Turn-Helix(HTH)-Motivs.^[33] Der Abstand zwischen den beiden Erkennungshelices α_3 und $\alpha_{3'}$, der die Bindung von $(\text{TetR}^D)_2$ an *tetO* reguliert, wird durch die Helices α_4 und $\alpha_{4'}$ (Aminosäuren 48–63) kontrolliert; sie verknüpfen die DNA-bindenden Domänen mit $[\text{MgTc}]^+$ in der regulatorischen Kerndomäne (siehe Abschnitte 3.3.3 und 4).

Der zentrale Teil der regulatorischen Kerndomäne besteht aus einem Vier-Helix-Bündel, das von den antiparallelen Helices α_8 und α_{10} und den über die zweizählige Rotationsachse verwandten Helices $\alpha_{8'}$ und $\alpha_{10'}$ gebildet wird. Diese Helixpaare kreuzen sich unter einem Winkel von etwa 50° .^[25] Bei Überlagerung der dreidimensionalen Strukturen des freien $(\text{TetR}^D)_2$,^[26] des Komplexes $(\text{TetR}^D) \cdot [\text{MgTc}]^+$,^[24, 25] und des Komplexes $[(\text{TetR})_2 \cdot \text{tetO}]$ ^[34, 35] ergibt sich, dass diese vier α -Helices und α_5 sowie $\alpha_{5'}$ strukturell nahezu identisch sind. Sie bestimmen die Architektur der Kerndomäne von $(\text{TetR}^D)_2$ als strukturell konserviertes, starres Gerüst. Die Kerndomäne beherbergt zwei tunnelartige Bindungstaschen für $[\text{MgTc}]^+$, die von $\alpha_5 - \alpha_8$, $\alpha_{8'}$ und $\alpha_{10'}$ bzw. deren symmetrieäquivalenten Helices $\alpha_{5'} - \alpha_{8'}$, α_8 und α_{10} gebildet werden.^[26]

In der regulatorischen Kerndomäne sind die beiden Monomere in der Form eines Handschlag-Motivs deutlich voneinander getrennt. Nur α_9 an der Peripherie von $(\text{TetR}^D)_2$ legt sich um das „andere“ Monomer und schließt nach der Aufnahme von $[\text{MgTc}]^+$ den Bindungstunnel wie eine Schiebetür. Im induzierten Repressor $(\text{TetR} \cdot [\text{MgTc}]^+)_2$ sind beide $[\text{MgTc}]^+$ -Moleküle vollständig von $(\text{TetR})_2$ ein-

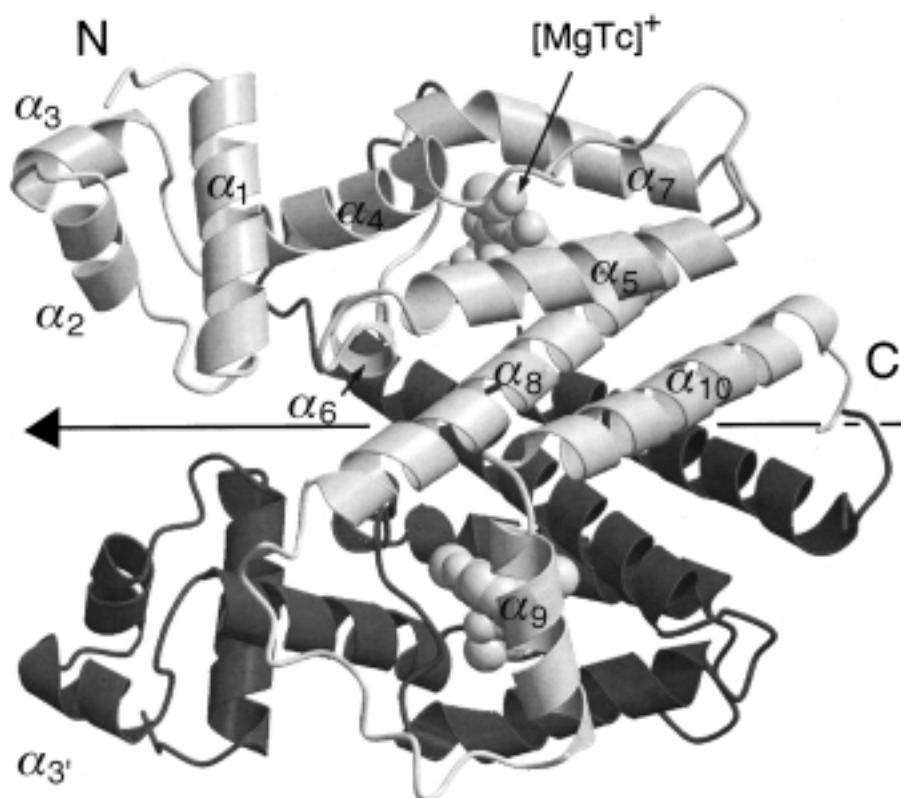


Abbildung 1. Schematische Darstellung des $(\text{TetR}^D)_2$ -Homodimers, das mit zwei Induktoren $[\text{MgTc}]^+$ den induzierten Komplex $(\text{TetR}^D) \cdot [\text{MgTc}]^+)_2$ bildet. Von den beiden TetR^D -Monomeren ist eins hell- und das andere dunkelgrau gezeichnet. Sie werden durch eine zweizählige Rotationsachse (horizontaler Pfeil) ineinander überführt. α -Helices sind durch Spiralen dargestellt und mit α_1 bis α_{10} bezeichnet. Die Termini der hellgrauen Polypeptidkette sind mit N und C angegeben. Die beiden gebundenen $[\text{MgTc}]^+$ -Moleküle sind als Kalottenmodelle dargestellt. Die DNA-Bindungsdomänen $\alpha_1 - \alpha_3$ und $\alpha_{1'} - \alpha_{3'}$ befinden sich links. Sie gehören zum klassischen Helix-Turn-Helix(HTH)-Motiv. Darin sind α_3 und $\alpha_{3'}$ die DNA-Erkennungshelices, deren Mittelpunkte $39,6 \text{ \AA}$ voneinander entfernt sind. Nur nach Dissoziation von $[\text{MgTc}]^+$ können sie sich um etwa 3 \AA nähern und sind nun in der Lage, sich in benachbarte große Furchen der Operator-DNA *tetO* einzulagern (siehe Abbildung 2A). Die große regulatorische Kerndomäne von $(\text{TetR}^D)_2$ wird durch die Helices $\alpha_5 - \alpha_{10}$ und $\alpha_{5'} - \alpha_{10'}$ gebildet. Sie beherbergt die beiden Bindungstunnel für $[\text{MgTc}]^+$. Die Kerndomäne ist mit den beiden DNA-Bindungsdomänen durch die Helices α_4 und $\alpha_{4'}$ verbunden.

geschlossen und von den DNA-Erkennungshelices α_3 bzw. α_3' etwa 33 Å entfernt.

3.2. Struktur des Komplexes zwischen (TetR)₂ und der Operator-DNA

(TetR^D)₂ wurde als Komplex mit verschiedenen Oligonucleotid-Duplexen der spezifischen DNA-Operatorsequenz *tetO1* kokristallisiert.^[34] Die Kristallstrukturanalysen von Komplexen mit 13 und 15 Basenpaar langen *tetO1*-Fragmenten mit stumpfen Enden oder mit Nucleotidüberhängen liefern folgendes Bild.^[35]

Im Komplex mit (TetR^D)₂ liegt der *tetO*-Operator in der B-DNA-Konformation vor, und die zweizählige Rotationssymmetrie gilt für den gesamten Komplex (Abbildung 2A). In der Mitte (Basenpaar 0) von *tetO* ist die dem Dimer (TetR^D)₂ zugewandte kleine Furche aufgeweitet und die große Furche auf der Rückseite entsprechend von 11.7 Å in idealer, linearer B-DNA^[36] auf 9.5–10 Å komprimiert. In Höhe der Basenpaare +2 und –2 ist die DNA vom Dimer (TetR^D)₂ weggebogen, weil an diesen Positionen die Erkennungshelices α_3 und α_3' in die großen Furchen eingelagert sind und sie auf 14 Å aufweiten. Diese Verzerrungen der DNA-Doppelhelix werden entlang der Basenpaare 3 bis 6 bzw. –3 bis –6 dadurch kompensiert, dass die DNA zum Protein hin gebogen ist, sodass die DNA insgesamt „gerade“ erscheint.

Die sequenzspezifischen Kontakte zwischen Aminosäureseitenketten der Helix-Turn-Helix-Motive in (TetR^D)₂ und Basen in benachbarten großen Furchen der Operator-DNA betreffen G2, A3 und T4 im einen sowie T5 im antiparallelen Strang der Doppelhelix (Abbildung 2B). Diese Kontakte werden durch zweizählige Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Seitenketten von Arg28 (an α_2) und Gln38 (an α_3) mit den Basen G2 bzw. A3 gebildet (Abbildung 2B, C) sowie durch van-der-Waals-Kontakte zwischen den Seitenketten von Pro39 und Tyr42 (beide an α_3) und den C5-Methylgruppen der Basen T4 und T5. Wenn diese Basen und/oder Aminosäuren durch andere ersetzt werden, ist die Affinität von *tetO* zu (TetR^D)₂ stark herabgesetzt, wie durch eine Serie von genetischen Experimenten gezeigt wurde.^[29] Diese sequenzspezifischen Wechselwirkungen werden durch ortsspezifische Wechselwirkungen zwischen (TetR^D)₂ und dem Desoxyribosephosphat-Rückgrat von *tetO* verstärkt, die folgende Aminosäuren betreffen: Thr26 und Thr27 an α_2 , Thr40 und Trp43 an α_3 sowie Lys48 am N-Terminus von α_4 . Da all diese Aminosäuren in den sieben TetR-Klassen konserviert sind (siehe Schema 3B), sind die in Abbildung 2B dargestellten Wechselwirkungen mit hoher Wahrscheinlichkeit für das gesamte System *tetO*/(TetR)₂ identisch.

3.3. Der induzierte Komplex (TetR^D·[MgTc]⁺)₂

3.3.1. Bindung des Induktors [MgTc]⁺ an (TetR^D)₂

Wenn Tc in eine resistente Bakterienzelle eintritt, bindet es als [MgTc]⁺ mit hoher Affinität ($K_{\text{ass}} \approx 10^9 \text{ M}^{-1}$) an (TetR^D)₂ in dem von (TetR^D)₂ und dem *tetO*-Operator gebildeten Kom-

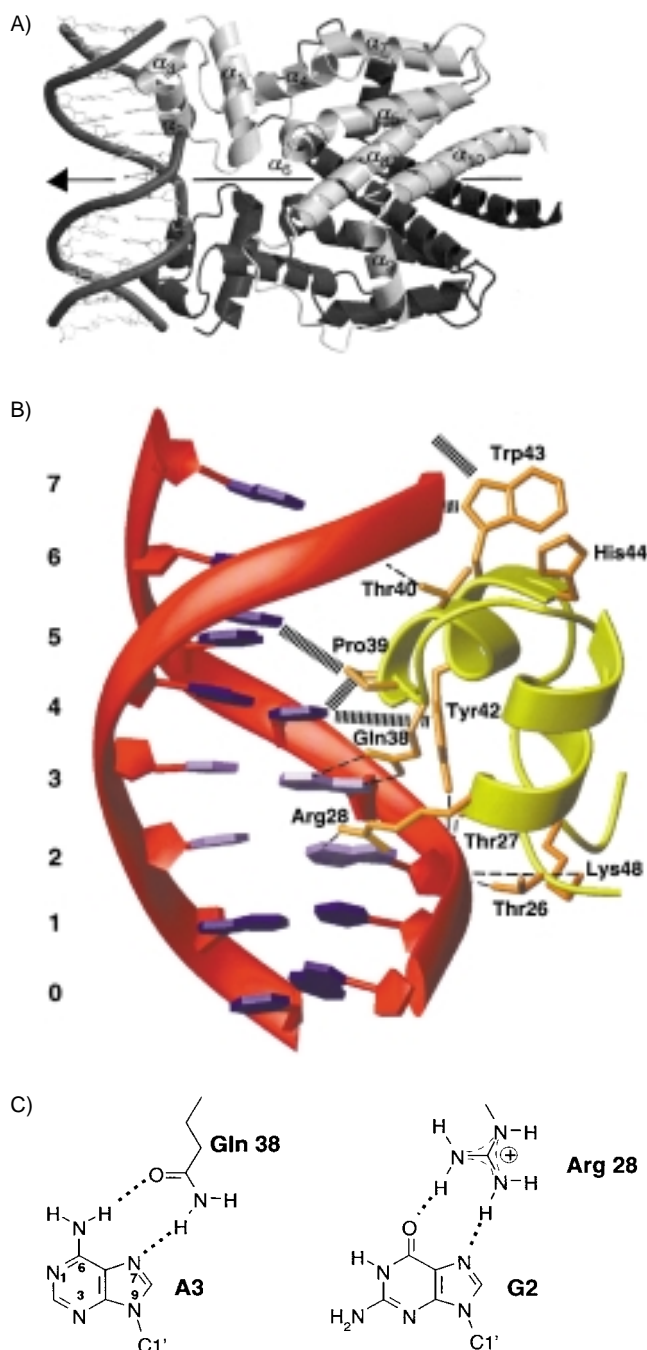
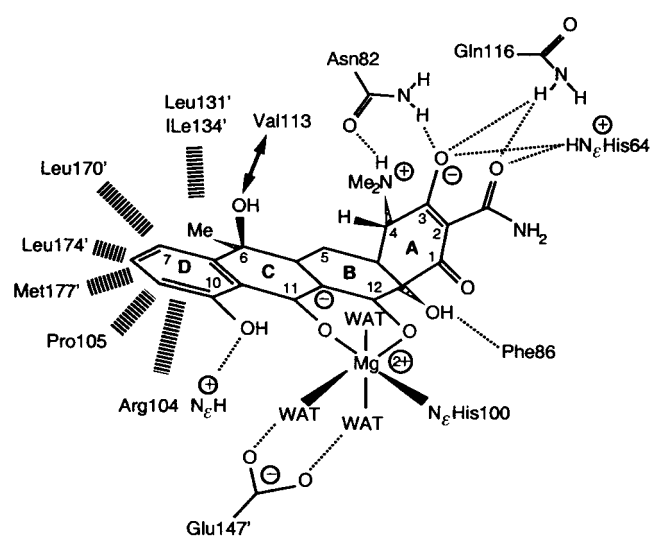


Abbildung 2. A) Kristallstruktur des zwischen (TetR^D)₂ und Operator-DNA *tetO1* gebildeten Komplexes. Die α -Helices von TetR sind schematisch durch Spiralen dargestellt (wie in Abbildung 1), und *tetO1* ist durch zwei Bänder mit den zugehörigen Basen beschrieben. Der Komplex hat zweizählige Rotationssymmetrie, die durch den Pfeil angedeutet ist. Bemerkenswert ist die Verkrümmung der DNA-Doppelhelix, die durch Knicke im Desoxyribosephosphat-Rückgrat sichtbar wird; siehe Text. B) Detailansicht der Wechselwirkungen, die zwischen einer Hälfte des Operators *tetO1* und dem HTH-Motiv (α_2 und α_3) gebildet werden. Mit gestrichelten Linien (---) sind spezifische Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den konservierten Aminosäuren Arg28 (N-Terminus von α_2), Gln38 (N-Terminus von α_3) und den Basen G2 bzw. A3 dargestellt und mit breiten gestrichelten Linien (|||||) van-der-Waals-Kontakte zwischen den konservierten Aminosäuren Pro39, Tyr42 sowie Trp43 und den Basen T4 auf dem einen und T5 auf dem anderen Strang von *tetO1*. C) Darstellung der Wasserstoffbrückenbindungen (••••) in den spezifischen Wechselwirkungen Arg28–G2 und Gln38–A3. Einige Atome im Purinring von A3 sind nummeriert.

plex $[(\text{TetR}^{\text{D}})_2 \cdot \text{tetO}]$.^[30] Dieser Vorgang erzwingt Konformationsänderungen in $(\text{TetR}^{\text{D}})_2$ (siehe Abschnitt 3.3.2), die alle spezifischen Wechselwirkungen zwischen $(\text{TetR}^{\text{D}})_2$ und *tetO* lösen und damit die Bindungsaffinität um 6–10 Größenordnungen herabsetzen.^[19] $(\text{TetR} \cdot [\text{MgTc}]^+)_2$ dissoziiert von *tetO*, sodass die Genexpression von *tetR* und *tetA* beginnen kann (siehe Schema 2).

Der Induktor $[\text{MgTc}]^+$ wird in den beiden tunnelartigen Vertiefungen in der regulatorischen Kerndomäne des Dimers $(\text{TetR}^{\text{D}})_2$ gebunden.^[24–26] Die Tunnel haben eine enge und eine weitere Öffnung, die durch α_5 und α_7 (α_5 und α_7) bzw. die Schleife α_6 – α_7 und α_9 (α_6 – α_7 und α_9) definiert werden.^[26] Kristallographische Studien haben ergeben, dass $[\text{MgTc}]^+$ mit Ring A vorneweg durch die weitere Öffnung in den Repressor gelangt, sodass sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den funktionellen Gruppen von Ring A und Aminosäuren nahe der engeren Öffnung des Tunnels bilden können (Schema 4). Nachdem $[\text{MgTc}]^+$ völlig eingebettet ist,



Schema 4. Darstellung der Wechselwirkungen zwischen $(\text{TetR})_2$ und dem Induktor $[\text{MgTc}]^+$. Aminosäuren des zweiten TetR -Monomer-Moleküls sind mit einem Strich (') gekennzeichnet, Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gestrichelte Linien (---) und van-der-Waals-Kontakte durch breite gestrichelte Linien (|||||) dargestellt. Mg^{2+} ist durch O11 und O12 von Tc, das His-100- N_ϵ -Atom und drei Wassermoleküle (WAT) oktaedrisch koordiniert. Bemerkenswert ist die ungewöhnliche $\text{O-H} \cdots \pi$ -Wechselwirkung zwischen einer OH-Gruppe von Tc und der aromatischen Seitenkette von Phe86.

wird α_9 (α_9) wie eine Schiebetür seitwärts bewegt und verschließt dadurch die Eingänge der beiden Tunnel.^[26] Der Komplex $(\text{TetR}^{\text{D}} \cdot [\text{MgTc}]^+)_2$ liegt nun in der „induzierten Form“ vor, die nicht in der Lage ist, an Operator-DNA zu binden.

3.3.2. Die Bindung von $[\text{MgTc}]^+$ erzwingt eine Sequenz von Konformationsänderungen in $(\text{TetR}^{\text{D}})_2$

Wenn die Kristallstrukturen des freien $(\text{TetR}^{\text{D}})_2$,^[26] des Komplexes $[(\text{TetR}^{\text{D}})_2 \cdot \text{tetO}]$ ^[35] und der induzierten Form $(\text{TetR}^{\text{D}} \cdot [\text{MgTc}]^+)_2$ ^[24–26] überlagert werden, sind die Aminosäuren, die mit Ring A von Tc wechselwirken, in identischen

Positionen. Größere Strukturänderungen treten nur bei den Aminosäuren auf, die hydrophobe Wechselwirkungen mit Tc eingehen, vor allem aber bei denen der Schiebetür α_9 (Leu170, Leu174 und Met177; siehe Schema 4). Die größten Konformationsänderungen, die zur Induktion von $(\text{TetR}^{\text{D}})_2$ führen, betreffen die Koordination von Mg^{2+} .

In Abwesenheit von $[\text{MgTc}]^+$ sind die Bindungstunnel in $(\text{TetR}^{\text{D}})_2$ mit (ungeordneten) Wassermolekülen gefüllt, die in der Elektronendichte nicht lokalisiert werden können. Die Helix α_6 ist nur zwei Windungen lang und wird von Gly⁹⁶-Ala-Lys-Val-His-Leu-Gly¹⁰² gebildet. In den sieben TetR-Klassen sind diese Aminosäuren Typ-konserviert (Lys98, Val99, Leu101; siehe Schema 3B). Nach dem Eintritt von $[\text{MgTc}]^+$ in den Tunnel ist α_6 um etwa 1.5 Å in Richtung des C-Terminus verschoben, die C-terminale Windung von α_6 wurde abgeschaltet und bildet einen β -Turn (Typ II), His¹⁰⁰-Leu-Gly-Thr¹⁰³ (Abbildung 3). Diese Konformationsände-

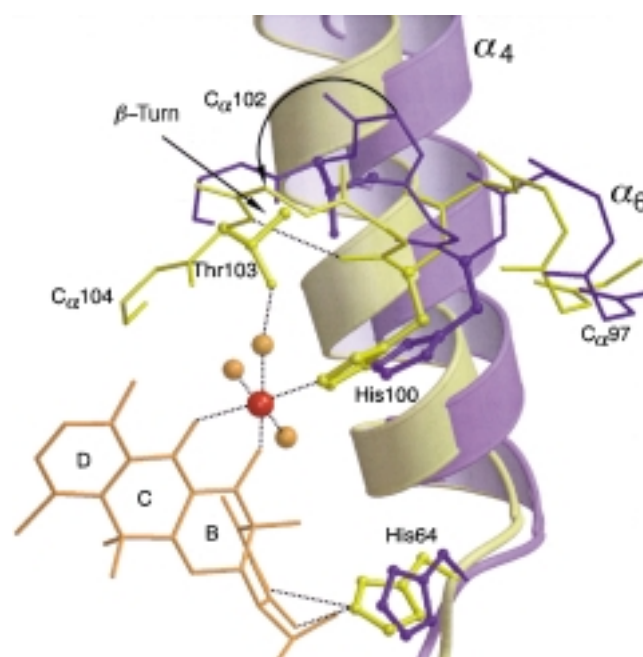


Abbildung 3. Ausschnitt der $[\text{MgTc}]^+$ -Bindungsstelle mit einigen der für die Induktion des Dimers $(\text{TetR})_2$ relevanten Aminosäuren, der zwei Windungen kurzen Helix α_6 und der langen Helix α_4 , die die Kerndomäne von $(\text{TetR})_2$ mit der durch Helices α_1 , α_2 und α_3 gebildeten DNA-Bindungsdomäne verknüpft. In Blau ist $(\text{TetR})_2$ im Komplex mit Operator-DNA dargestellt. Wenn $[\text{MgTc}]^+$ in die Bindungsstelle eindiffundiert, erfolgen Konformationsänderungen und die Aminosäuren des induzierten $(\text{TetR} \cdot [\text{MgTc}]^+)_2$ nehmen die in Gelb gezeichneten Lagen an. Bemerkenswert ist der C-Terminus von α_6 , von dem eine α -helikale Windung abgeschaltet ist und nun einen Typ-II- β -Turn bildet; zusätzlich ist α_6 um ca. 1.5 Å nach links (in Richtung des C-Terminus) verschoben.

rung wird durch die direkte Koordination von Mg^{2+} durch das His-100- N_ϵ -Atom ausgelöst, und gleichzeitig bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Thr-103- O_γ -Atom, einem Aqualiganden von Mg^{2+} und dem Peptidsauerstoffatom von His100. Dies hat zur Folge, dass die α_6 und α_7 verbindende Schleife um etwa 2.5 Å verschoben wird. Dadurch können die Methylseitenketten von Arg104 und Pro105 einen Teil der hydrophoben Tasche bilden, die mit den Tc-Ringen C und D wechselwirken.^[26, 35] Zusätzlich wird der

N-Terminus von α_7 aus der normalerweise vorliegenden α -Helix in eine 3_{10} -Helix gezwungen. Die hiermit verbundenen Änderungen der Positionen von Hauptketten- und Seitenkettenatomen des N-terminal an α_7 anschließenden Peptid-segments werden benötigt, um die unten beschriebene Kette von acht Wassermolekülen kooperativ zu binden.

3.3.3. Ein kooperativer Reißverschluss aus acht Wassermolekülen fixiert α_4 in der induzierten Position

Die Konformationsänderungen, die nach der Induktion von $(\text{TetR}^D)_2$ durch $[\text{MgTc}]^+$ stattfinden und zur Dissoziation des Komplexes $[(\text{TetR}^D)_2 \cdot \text{tetO}]$ führen, wurden auch durch immunologische und genetische Studien nachgewiesen.^[37, 38] Kristallographische Analysen zeigen, dass diese Änderungen durch zickzackförmige Ketten von je acht Wassermolekülen pro Monomer des $(\text{TetR} \cdot [\text{MgTc}]^+)_2$ -Komplexes stabilisiert werden (Abbildung 4).^[28] Die Wassermoleküle sind durch

che Wasserstoffbrückenbindungen mit TetR^D : auf einer Seite mit der Peptidgruppe von Arg104 in der α_6 und α_7 verbindenden Schleife sowie mit der Seitenkette von Gln109 in α_7 und dem Amidsubstituenten in Position 2 von Tc und auf der anderen Seite mit den Peptidsauerstoffatomen der Reste 53, 56, 57, 60 und 64 von α_4 . Diese funktionellen Gruppen werden von der Zickzack-Kette wie durch einen Reißverschluss fixiert. Verglichen mit dem $[(\text{TetR}^D)_2 \cdot \text{tetO}]$ -Komplex, in dem sich die funktionellen Gruppen von α_4 und von der α_6 und α_7 verbindenden Schleife in Abwesenheit von $[\text{MgTc}]^+$ in unterschiedlichen Positionen befinden, ist jetzt α_4 pendelartig um 5° verschoben (siehe Abbildung 3). Hierbei wirkt His64 am C-Terminus von α_4 als Scharnier, das durch $[\text{MgTc}]^+$ mit den Seitenketten der konservierten Aminosäuren Asn82 und Ser85 von α_5 fest verankert ist.

4. Die Regulation von $(\text{TetR}^D)_2$ erfolgt durch eine induzierte Rotation der DNA-Bindungsdomänen

Eine Überlagerung der dreidimensionalen Strukturen von $(\text{TetR}^D)_2$ im Komplex mit der Operator-DNA *tetO* und mit dem Induktor $[\text{MgTc}]^+$ lässt die wesentlichen Merkmale der $(\text{TetR}^D)_2$ -Regulation erkennen, die in Schema 5 zusammen-

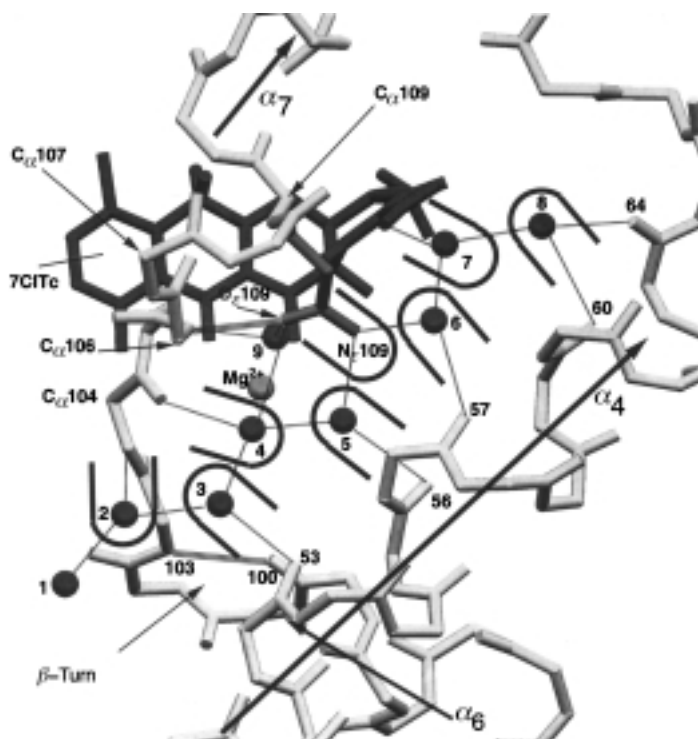
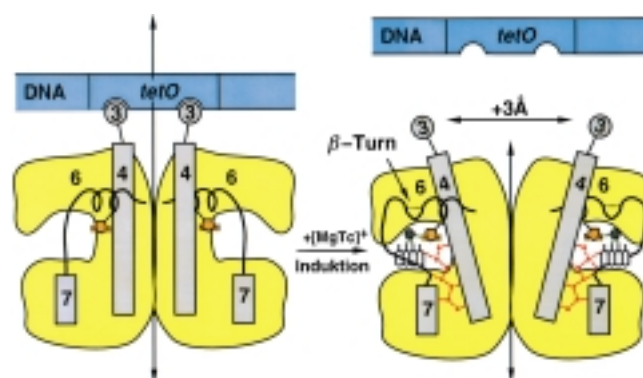


Abbildung 4. Im induzierten Komplex $(\text{TetR} \cdot [\text{MgTc}]^+)_2$, ist die Orientierung der Helix α_4 durch eine Kette von acht Wassermolekülen stabilisiert, die durch kooperative Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden sind. Diese sind mit 1–8 sowie durch U-förmige Haken markiert und dienen als „Reißverschluss“. Die Kette von Wassermolekülen (WAT) ist auf einer Seite an Hauptkettenatomen der α_6 und α_7 verbindenden Schleife gebunden (Arg-104-NH...WAT2 und Arg-104-O...WAT4, Gln-109-N...WAT5/WAT6, $[\text{MgTc}]^+$ -Amid-NH₂...WAT7) und auf der anderen Seite über Wasserstoffbrückenbindungen an die Peptidsauerstoffatome der Reste 53, 56, 57, 60 und 64 von α_4 .

kooperative Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden und verknüpfen α_4 , α_4 und die DNA-Bindungsdomänen in Positionen, sodass alle in Abbildung 2A beschriebenen spezifischen Wechselwirkungen mit Operator-DNA unterbunden oder verhindert werden. Die aus acht Wassermolekülen bestehende zickzackförmige Kette bildet zahlrei-



Schema 5. Die Struktur-Funktions-Beziehungen von $(\text{TetR})_2$ im Komplex mit Operator-DNA *tetO* (links) und mit dem Induktor $[\text{MgTc}]^+$ (rechts). $(\text{TetR})_2$ ist schematisch mit den Helices α_3 , α_4 , α_7 (als Zylinder) und α_6 (als Spirale) angedeutet, und His100 ist orangefarben hervorgehoben; Tc ist durch das Tetracengerüst dargestellt, Mg^{2+} durch einen grünen Kreis und der von acht Wassermolekülen gebildete Reißverschluss in Rot. In $[(\text{TetR})_2 \cdot \text{tetO}]$ sind α_3 und α_3 von $(\text{TetR})_2$ in benachbarte große Furchen von *tetO* eingelagert, α_6 ist zwei Windungen lang und die Helices α_4 und α_4 liegen vertikal. Wenn $[\text{MgTc}]^+$ in die Bindungstunnel von $(\text{TetR})_2$ eindiffundiert, koordiniert das His-100-N_ε-Atom das Mg^{2+} -Ion und die C-terminale Windung von α_6 schält sich ab, um einen Typ-II- β -Turn zu bilden. Diese Änderungen lösen pendelähnliche Bewegungen von α_4 und α_4 aus, die in der Endlage durch jeweils acht Wassermoleküle (Reißverschluss) über Wasserstoffbrückenbindungen fixiert werden. Diese Bewegungen vergrößern den Abstand zwischen α_3 und α_3 um ca. 3 Å, sodass *tetO* freigegeben wird und die Genexpression erfolgen kann. Die beiden Komplexe $[(\text{TetR})_2 \cdot \text{tetO}]$ und $(\text{TetR} \cdot [\text{MgTc}]^+)_2$ weisen zweizählige Rotationssymmetrie auf, die jeweils durch die vertikalen Pfeile zwischen den TetR-Monomeren gekennzeichnet ist.

gefasst sind. In diesen Strukturen sind die regulatorischen Kerndomänen nahezu identisch mit Ausnahmen der Helices α_6 , α_6 , α_9 und α_9 . Die letzteren bewegen sich und schließen die Bindungstunnel wie Schiebetüren nach der Bindung von

$[\text{MgTc}]^+$, während die C-terminalen Windungen von α_6 und α_6' bei der Induktion abgeschält werden, um die Koordination des Mg^{2+} -Ions der beiden gebundenen Induktoren $[\text{MgTc}]^+$ zu ermöglichen. Hierdurch wird eine pendelartige Lageänderung der Helices α_4 und α_4' ausgelöst und die an die Helices befestigten DNA-Bindungsdomänen werden in entgegengesetzte Richtungen verschoben. Diese Bewegung gehorcht notwendigerweise dem Diktat der inhärenten zweizähligen Rotationssymmetrie des $(\text{TetR}^D)_2$ -Homodimers.

Im induzierten Komplex $(\text{TetR}^D \cdot [\text{MgTc}]^+)_2$ sind die Helices α_4 und α_4' durch die beiden kooperativen Ketten aus jeweils acht Wassermolekülen fest in ihrer Position verankert. Wir nehmen an, dass dies die benötigte Energie liefert, um α_4 und α_4' zu drehen und die daran befestigten DNA-Bindungsdomänen zu fixieren, sodass der Abstand zwischen den Mittelpunkten der DNA-Erkennungshelices α_3 und α_3' von 36.6 Å im Komplex $[(\text{TetR}^D)_2 \cdot \text{tetO}]$ auf 39.6 Å im induzierten Komplex $(\text{TetR}^D \cdot [\text{MgTc}]^+)_2$ vergrößert wird. Da dieser Abstand zu groß ist, um die Bindung von α_3 und α_3' in benachbarten großen Furchen von B-DNA zu ermöglichen, muss *tetO* abdissoziieren und die Expression der Gene *tetR* und *tetA* kann erfolgen.

5. Punktmutationen stützen und erweitern die Strukturstudien über TetR^B

Ein Satz von etwa 100 verschiedenen Punktmutationen von *tetR^B* diente dazu, die Bindung des Operators *tetOI* und die Induktion durch $[\text{MgTc}]^+$ in vivo zu analysieren.^[39, 40] Für diese Untersuchungen wurde *tetOI* in die Promotorregion des β -Galactosidase kodierenden Gens *lacZ* kloniert, sodass die Bindung und Dissoziation der $(\text{TetR}^B)_2$ -Varianten leicht durch die Aktivität der exprimierten β -Galactosidase verfolgt werden konnten. In den verschiedenen Varianten waren die Aminosäure-Substitutionen fast gleichmäßig über die gesamte Polypeptidkette von TetR^B verteilt, ausgenommen die durch α_1 , α_2 und α_3 gebildete DNA-Bindungsdomäne. Dies deutet darauf hin, dass die Assoziation von $(\text{TetR}^B)_2$ mit *tetOI* sehr empfindlich auf jeglichen Aminosäureaustausch in der DNA-Bindungsdomäne reagiert. Verschiedene andere Modifikationen entlang der Polypeptidkette hatten einen großen Einfluss auf die Erkennung und Bindung von $[\text{MgTc}]^+$. Die Varianten von TetR^B zeigen, dass bei nichtinduzierbaren Phänotypen die Affinität des Induktors $[\text{MgTc}]^+$ vermindert und die für die Induktion erforderlichen Konformationsänderungen gestört sind.

Die Bindung von $[\text{MgTc}]^+$ an $(\text{TetR}^B)_2$ wird um mehrere Größenordnungen herabgesetzt, wenn die Aminosäuren His64, Asn82, Phe86, His100 und Gln116, die alle über Wasserstoffbrückenbindungen oder durch Mg^{2+} -Koordination an $[\text{MgTc}]^+$ gebunden sind (siehe Schema 4), durch andere Aminosäuren ausgetauscht werden. Folglich sind diese Varianten nicht mehr induzierbar, aber sie binden immer noch an den Operator *tetOI*. Dagegen wird durch Austausch von Aminosäuren, die van-der-Waals-Kontakte zu $[\text{MgTc}]^+$ bilden, wie Arg104, Pro105, Leu113 und Leu117, die Affinität zu $[\text{MgTc}]^+$ nur unwesentlich herabgesetzt, während die Induktion dennoch weitgehend oder sogar vollständig ver-

hindert werden kann. Dies weist darauf hin, dass die Konformationsänderungen, die mit einer erfolgreichen Induktion einhergehen müssen, teilweise oder sogar völlig inhibiert sind.

Ein weiterer Satz von Mutationen betraf einige Aminosäuren, die die regulatorische Kerndomäne und die DNA-Bindungsdomänen intramolekular über Wasserstoffbrückenbindungen verknüpfen, wie Asp23, Asp95, Lys98 und Glu150. Die Substitution dieser Aminosäuren verringert (aber verhindert nicht) die Fähigkeit zur Induktion und hat keinen Einfluss auf die Affinität von $(\text{TetR}^B)_2$ zu $[\text{MgTc}]^+$. In einem ähnlichen Ansatz wurde der Monomer-Monomer-Kontakt in $(\text{TetR}^B)_2$ durch Austausch von Aminosäuren des Vier-Helix-Bündels $\alpha_8/\alpha_{10}/\alpha_8'/\alpha_{10}'$, die auf das benachbarte Monomer gerichtet sind, weiter untersucht. Diese Varianten weisen eine ähnliche Affinität zu $[\text{MgTc}]^+$ auf wie Wild-Typ- $(\text{TetR}^B)_2$, aber sie binden selbst in Gegenwart von $[\text{MgTc}]^+$ an *tetOI*, d.h., die Induzierbarkeit ist weitgehend verloren; dieses Verhalten hängt vom sterischen Anspruch der Seitenketten der ausgetauschten Aminosäuren ab.

Diese und andere^[38] Mutationsstudien an TetR^B bestätigen nicht nur die biologische Bedeutung der kristallographischen Arbeiten, sondern liefern weitere Beiträge zum Verständnis der Prozesse, die während der Induktion durch $[\text{MgTc}]^+$ ablaufen.

6. Die Verwendung von TetR als regulierbarer Schalter in der eukaryontischen Genexpression

Die Transkription von DNA in komplementäre mRNA wird durch Promotoren kontrolliert, an die RNA-Polymerase in Gegenwart einer wohldefinierten Zahl von Transkriptionsfaktoren bindet. Da „starke“ Promotoren das Wachstum von Bakterien verlangsamen, wurden Schalter eingeführt wie in dem viel verwendeten *tac*-Promotor, um die Transkription zu einem Zeitpunkt auszulösen, der für die Produktion von Protein in großen Mengen günstig ist. Dieser Promotor besteht aus einer DNA-Sequenz, die für eine verstärkte Bindung von RNA-Polymerase optimiert ist, und aus einer Operator-DNA, die für den Lac-Repressor spezifisch ist.^[41] Die Coexpression des Lac-Repressors in einem den *tac*-Promotor tragenden Bakterium schaltet die Expression des Gens, das sich hinter dieser Operator-DNA befindet, aus, da diese den Lac-Repressor bindet und damit die Transkription verhindert. Bei Zugabe des Induktors Isopropyl- β -D-thiogalactosylpyranosid (IPTG) dissoziiert der Lac-Repressor von seinem Operator und die Genexpression wird angeschaltet.

Dieses System kann sehr gut in Prokaryonten angewandt werden, doch erfordern Eukaryonten IPTG in mehrere 100-mal höheren Konzentrationen,^[42] die das Wachstum der eukaryontischen Zellen stören. Diese ungünstigen Effekte werden mit TetR vermieden, da die Affinität des Induktors $[\text{MgTc}]^+$ 1000-fach stärker ist als die von IPTG zum Lac-Repressor.^[21, 22] Die Konzentrationen von $[\text{MgTc}]^+$, die für die Induktion benötigt werden, sind damit so niedrig, dass sie für die Zelle nicht toxisch wirken. Ein weiterer Vorteil von Tc ist, dass es auch ohne Transportmoleküle die eukaryontische Zellmembran passieren kann.

Es erwies sich als möglich, das TetR-System zu verwenden, um die Genexpression an- oder abzuschalten, wenn $[MgTc]^+$ zugegeben wurde.^[22] Für die *Anschaltung* der Genexpression wurde *tetO* in einen Promotor in der Nähe der TATA-Box eines Zielgens insertiert (siehe Schema 3 A). Durch die Bindung von $(TetR)_2$ wird nun die Transkription verhindert, bis diese durch Zugabe von $[MgTc]^+$ angeschaltet wird. Für die *Abschaltung* wird ein Fusionsprotein benutzt, das aus TetR und einer eukaryontischen Aktivator-domäne besteht. In Abwesenheit von $[MgTc]^+$ bindet die TetR-Domäne des Fusionsproteins an *tetO*, der oberhalb der TATA-Box eines Zielgens insertiert ist, sodass die Transkription aktiviert wird. Wenn $[MgTc]^+$ zugegeben wird, dissoziiert dieses Fusionsprotein von *tetO* und die Transkription wird abgeschaltet, da der Aktivator jetzt entfernt wurde.

Eine andere interessante Anwendung von TetR zur Genregulation wurde durch den „reversen TetR“ eröffnet, der die Bindung der Tc-Analoga Anhydrotetracyclin oder Doxycyclin (in denen die OH-Gruppe an C6 fehlt) erfordert, um eine optimale und feste Bindung an *tetO* zu erzielen.^[43] Im „reversen TetR“ sind vier Aminosäuren ersetzt, von denen die beiden in den Positionen 95 und 102 in der TetR-Familie konserviert sind (siehe Schema 3 B): Glu71 Lys, Asp95 Asn, Leu101 Ser, Gly102 Asp. Da bisher keine Kristallstrukturen eines „reversen TetR“ bestimmt werden konnten, sind die molekularen Mechanismen, die diesen Phänotyp steuern, noch unbekannt. Aus den verfügbaren Strukturinformationen über TetR^D und dessen Komplexe mit *tetO*1 und $[MgTc]^+$ geht jedoch klar hervor, dass die Substitution Gly102 Asp sehr wichtig ist. Wie in Abschnitt 3.3.2. dargelegt wurde, beruht die Induktion von TetR auf der Bildung des Typ-II- β -Turns His¹⁰⁰-Leu-Gly-Thr¹⁰³. Aus stereochemischen Gründen kann dieser β -Turn nur mit Glycin, nicht aber mit Aspartat in Position 102 gebildet werden, sodass der „reverse TetR“ nicht induzierbar ist. Dieser Effekt wird durch die Substitution Asp95 Asn unterstützt, da die nun mögliche Wasserstoffbrückenbindung zwischen Asn95 und Glu23 die relativen Orientierungen zwischen α_1 (Glu 23) und der regulatorischen Domäne (Asn95) stabilisieren kann, sodass die Induktion weniger günstig wird. Der Grund, warum der „reverse TetR“ in Gegenwart von Anhydrotetracyclin und Doxycyclin sogar *stärker* an *tetO* bindet als bei Abwesenheit dieser Tc-Analoga, ist noch unklar.

Ein Fusionsprotein, das aus dem „reversen TetR“ und einem Transkriptionsaktivator besteht, wurde konstitutiv in HeLa-Zellen exprimiert. In Gegenwart von Anhydrotetracyclin und Doxycyclin band dieses Konstrukt fest an oberhalb eines Zielgens insertiertes *tetO* und verstärkte die Expression mehr als 1000-fach.^[43] Diese Experimente haben gezeigt, dass der „reverse TetR“ wie auch TetR für die Expression in transgenen Tieren und möglicherweise in der Gentherapie geeignet sind, um die gezielte Expression von Genen zu regulieren.

Eine Kombination von Genen für TetR und für den „reversen TetR“ in derselben Zell-Linie ermöglicht es, zwei Gene gleichzeitig zu regulieren;^[44] weiterhin werden spezielle Konstrukte entwickelt, um die Expression von Zielgenen minimal zu halten.^[45] Eine sehr wertvolle Eigenschaft des TetR-Systems ist die sehr präzise Schaltfunktion, die prak-

tisch nicht leckt. Aus diesem Grund wird TetR häufig zur Regulation der Genexpression in transgenen Organismen verwendet. Zurzeit ist TetR eines der am besten verstandenen Repressor-Operator-Systeme und dient als wichtige Grundlage für weitere Studien, die sich mit Struktur-Funktions-Beziehungen befassen.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Unsere kristallographischen Studien über das System $(TetR^D)_2/tetO/2[MgTc]^+$ haben gezeigt, wie die Bindung von zwei Induktormolekülen $[MgTc]^+$ an den $[(TetR^D)_2 \cdot tetO]$ -Komplex zur Freisetzung von *tetO* führt, sodass die Transkription der Gene *tetR* und *tetA* erfolgen kann. Der Schlüssel zu diesen Vorgängen, die die hohe Affinität des $(TetR^D)_2/tetO$ -Komplexes von $K_{ass} \approx 10^{11} M^{-1}$ um etwa 10 Größenordnungen herabsetzen, ist die Einlagerung von zwei Chelatmolekülen $[MgTc]^+$ in zwei spezifische Bindungstunnel in der regulatorischen Kerndomäne des Dimers $(TetR^D)_2$, gefolgt von einer direkten Koordination des Mg^{2+} -Ions durch das His-100-N ϵ -Atom, die mehrere Konformationsänderungen in $(TetR^D)_2$ auslöst und eine pendelartige Rotation der Helices α_4 und α_4' bewirkt. Dadurch werden die beiden angehefteten DNA-Bindungsdomänen etwa 3 Å voneinander weg bewegt und lösen sich von *tetO*. Diese induzierte Konformation des TetR^D wird teilweise durch die Bildung von zwei kooperativen Ketten aus jeweils acht Wassermolekülen (Reißverschluss) stabilisiert, die insgesamt 2×17 Wasserstoffbrückenbindungen beinhalten. Dies sollte genügend Energie liefern, um die Konformationsänderungen des Systems $(TetR \cdot [MgTc]^+)_2$ zu begünstigen und die Ablösung von *tetO* zu erzwingen. Die angegebene Zahl von Wasserstoffbrückenbindungen ist nur als Anhaltspunkt zu sehen, da dies nicht die einzigen Wasserstoffbrückenbindungen sind, die während der Induktion des Dimers $(TetR^D)_2$ gebildet oder modifiziert werden.

Das $(TetR^D)_2/tetO/2[MgTc]^+$ -System ist einzigartig, da die eindeutig definierte Repression der *tetA*- und *tetR*-Gene selbst bei niedrigen, subtoxischen Konzentrationen von $[MgTc]^+$ aufgehoben wird. Diese sehr günstige Eigenschaft wurde in transgenen Organismen verwendet, um die Expression von bestimmten Zielgenen zu regulieren. In Form von Fusionsproteinen aus TetR und Transkriptionsaktivatoren kann $(TetR)_2$ auch verwendet werden, um die Genexpression nach Zugabe von $[MgTc]^+$ auszuschalten. Eine zusätzliche Variation dieses Themas ist der „reverse TetR“, der in Gegenwart von $[MgTc]^+$ fester an *tetO* bindet als in Abwesenheit. Mit TetR steht damit ein vielfältiges Werkzeug zur Verfügung, das bereits erfolgreich für die Regulation von Genen in verschiedenen transgenen Pflanzen und Versuchstieren verwendet wurde.^[46] Es hat außerdem neue Wege in der Gentherapie eröffnet, da Tc in für die Säugetierzelle subtoxischen Konzentrationen anwendbar ist und die Sicherheit der pharmakologischen Anwendung von Tc beim Menschen in umfangreichen Dokumentationen beschrieben wurde.

Die Autoren danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Sfb 344 (Berlin) und Sfb 473 (Erlangen)) und dem Fonds der

Chemischen Industrie für die langjährige Unterstützung der Arbeiten, die in diesem Artikel beschrieben sind.

Eingegangen am 4. Oktober 1999 [A364]

- [1] J. S. Parkinson, E. C. Kofoed, *Annu. Rev. Genet.* **1992**, 26, 71–112.
- [2] J. S. Parkinson, *Cell* **1993**, 73, 857–871.
- [3] R. Johnson, J. Adams, *Tree* **1992**, 7, 295–299.
- [4] H. C. Neu, *Science* **1992**, 257, 1064–1072.
- [5] S. B. Levy in *Antimicrobial Drug Resistance* (Hrsg.: L. E. Bryan), Academic Press, New York, **1984**, S. 191–240.
- [6] S. B. Levy, *ASM News* **1988**, 54, 418–421.
- [7] A. Wissmann, W. Hillen, *Forum Mikrobiol.* **1989**, 292–299.
- [8] B. Epe, P. Wolley, *EMBO J.* **1984**, 3, 121–126.
- [9] V. Burdett, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 2872–2877.
- [10] R. Sanchez-Pescador, J. T. Brown, J. T. Roberts, M. S. Urden, *Nucl. Acids Res.* **1988**, 16, 1218.
- [11] B. Mendez, C. Tachibana, S. B. Levy, *Plasmid* **1980**, 3, 99–108.
- [12] K. Tovar, A. Ernst, W. Hillen, *Mol. Gen. Genet.* **1988**, 215, 76–80.
- [13] J. Zhao, T. Aoki, *Microbiol. Immunol.* **1992**, 36, 1051–1060.
- [14] D. Schnappinger, W. Hillen, *Arch. Microbiol.* **1996**, 165, 359–369.
- [15] B. S. Speer, A. A. Salyers, *J. Bacteriol.* **1989**, 171, 148–151.
- [16] B. Eckert, C. F. Beck, *J. Bacteriol.* **1989**, 171, 3557–3559.
- [17] M. D. Marger, M. H. Saier, *Trends Biochem. Sci.* **1993**, 18, 13–20.
- [18] B. Eckert, C. F. Beck, *J. Biol. Chem.* **1989**, 11 663–11 670.
- [19] T. Lederer, M. Takahashi, W. Hillen, *Anal. Biochem.* **1995**, 232, 190–196.
- [20] W. Hillen, C. Gatz, L. Altschmied, K. Schollmeier, I. Meier, *J. Mol. Biol.* **1983**, 169, 707–721.
- [21] C. Gatz, A. Kaiser, R. Wendenburg, *Mol. Gen. Genet.* **1991**, 227, 229–237.
- [22] S. Freundlieb, U. Baron, A. L. Bonin, M. Gossen, H. Bujard, *Methods Enzymol.* **1997**, 283, 159–173.
- [23] E. Wirtz, C. Clayton, *Science* **1995**, 268, 1179–1183.
- [24] W. Hinrichs, C. Kisker, M. Düvel, A. Müller, K. Tovar, W. Hillen, W. Saenger, *Science* **1994**, 264, 418–420.
- [25] C. Kisker, W. Hinrichs, K. Tovar, W. Hillen, W. Saenger, *J. Mol. Biol.* **1995**, 247, 260–280.
- [26] P. Orth, F. Cordes, D. Schnappinger, W. Hillen, W. Saenger, W. Hinrichs, *J. Mol. Biol.* **1998**, 279, 439–447.
- [27] P. Orth, W. Saenger, W. Hinrichs, *Biochemistry* **1999**, 38, 191–198.
- [28] P. Orth, D. Schnappinger, P. E. Sum, G. A. Ellestad, W. Hillen, W. Saenger, W. Hinrichs, *J. Mol. Biol.* **1999**, 285, 455–462.
- [29] K. H. Jogun, J. J. Stezowski, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 6018–6026.
- [30] J. Degenkolb, M. Takahashi, G. A. Ellestad, W. Hillen, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1991**, 35, 1591–1595.
- [31] W. Hillen, C. Berens, *Annu. Rev. Microbiol.* **1994**, 48, 345–369.
- [32] R. Baumeister, V. Helbl, W. Hillen, *J. Mol. Biol.* **1992**, 226, 1257–1270.
- [33] S. C. Harrison, *Nature* **1992**, 353, 715–719.
- [34] P. Orth, C. Alings, D. Schnappinger, W. Saenger, W. Hinrichs, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1998**, 54, 99–101.
- [35] P. Orth, Dissertation, Freie Universität Berlin, **1998**.
- [36] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer, New York, **1983**.
- [37] E. Pook, S. Grimm, A. Bonin, T. Winkler, W. Hillen, *Eur. J. Biochem.* **1998**, 258, 915–922.
- [38] B. Tiebel, L. M. Aung-Hilbrich, D. Schnappinger, W. Hillen, *EMBO J.* **1998**, 17, 5112–5119.
- [39] L. D. Smith, K. P. Bertrand, *J. Mol. Biol.* **1988**, 203, 949–959.
- [40] G. Müller, B. Hecht, V. Helbl, W. Hinrichs, W. Saenger, W. Hillen, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, 2, 693–703.
- [41] H. A. De Boer, L. J. Comstock, M. Vasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, 80, 21–25.
- [42] J. Figge, C. Wright, C. J. Collins, T. M. Roberts, D. M. Livingstone, *Cell* **1988**, 52, 713–722.
- [43] M. Gossen, S. Freundlieb, G. Bender, G. Müller, W. Hillen, H. Bujard, *Science* **1995**, 268, 1766–1769.
- [44] U. Baron, D. Schnappinger, M. Gossen, W. Hillen, H. Bujard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 96, 1013–1018.
- [45] K. Forster, V. Helbl, T. Lederer, S. Urlinger, N. Wittenberg, W. Hillen, *Nucl. Acids Res.* **1999**, 27, 708–710.
- [46] H. B. Blau, F. M. V. Rossi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 797–799.