

Die
Dimerisierungsoberfläche
des Lac Repressors
aus
Escherichia coli

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Stefanie Spott
aus Recklinghausen

Hundt Druck GmbH
Köln, 2002

Berichterstatter: Prof. Dr. Benno Müller-Hill
Prof. Dr. Börries Kemper

Tag der mündlichen Prüfung: 04.02.2002

*Für meinen Vater
Wolfgang Spott,
in Erinnerung,
und
für meine Mutter
Rosa Spott*

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Februar 1998 bis November 2001 am Institut für Genetik der Universität zu Köln unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Benno Müller-Hill angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Benno Müller-Hill möchte ich für das spannende Thema, zahlreiche Diskussionen sowie für das große Interesse an meiner Arbeit danken.

Frau Dr. Brigitte von Wilcken-Bergmann danke ich für die Korrektur dieses Manuskripts und ihre Unterstützung in allen experimentellen Fragen.

Bei Frau Dr. Brigitte Kisters-Woike bedanke ich mich für die zahlreichen Stunden vor dem Computer und ihre Hilfsbereitschaft, wenn es um die Bereitstellung und Berechnung von Strukturdaten ging.

Ein weiterer Dank geht an Karin Otto, die jederzeit einen Platz für meine Sequenzen hatte, und an Frau Helma Jänsch, die mit der Bereitstellung der Medien und Glaswaren den Fortgang dieser Arbeit immer unterstützt hat, und auch Sonderwünsche prompt erfüllt hat.

Meinen Laborkollegen sowie den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Dr. Peter Dröge danke ich für die stets gute Arbeitsatmosphäre.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Dr. Markus Hartung, der mich stets durch praktische Tipps unterstützt hat, und mir gerade in den letzten Wochen dieser Arbeit sehr geholfen hat.

Inhaltsverzeichnis:

1.	Einleitung	1
1.1.	Das Laktose Operon von <i>E. coli</i>	1
1.2.	Der Lac Repressor	2
1.2.1.	Die modulare Struktur des Lac Repressors	2
1.2.2.	Die DNA-Erkennung	4
1.2.3.	Tetramerisierung	5
1.2.4.	Das „core“ des Lac Repressors	6
1.2.4.1.	Die Induktorbindungstasche	7
1.2.4.2.	Die N-terminale Subdomäne	7
1.2.4.3.	Die C-terminale Subdomäne	8
1.3.	Die Familie der mit Lac Repressor verwandten Proteine	10
1.3.1.	Das Ribose bindende Protein (RBP)	12
1.4.	Ziele der Arbeit	13
2.	Material und Methoden	15
2.1.	Abkürzungen	15
2.1.1.	Aminosäuren	17
2.2.	Material	17
2.2.1.	Chemikalien	17
2.2.2.	Enzyme	18
2.2.3.	Medien, Puffer und Platten	18
2.2.4.	Synthetische Oligonukleotide	19
2.2.5.	Software	19
2.2.6.	Plasmide	20
2.2.7.	Lac Repressor exprimierende Plasmide	20
2.2.8.	Stämme	21
2.3.	Methoden	22
2.3.1.	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	22
2.3.2.	Enzymkatalysierte Reaktionen	22
2.3.3.	Sequenzierung	22
2.3.4.	Kompetente Zellen	23
2.3.5.	Transformation	23

2.3.6.	Elution der DNA aus Agarosegelen	24
2.3.7.	Konstruktion der 1 x I ⁺ -Stämme	24
2.3.8.	Konstruktion von pRBP-HP	26
2.3.9.	PCR-Mutagenese	27
2.3.10.	Messung der spezifischen β -Gal-Aktivität in <i>E. coli</i>	28
2.3.11.	Präparation von Lac Repressor Rohextrakten	28
2.3.12.	Retardierungsgele	29
2.3.13.	Reinigung von Lac Repressor	30
3.	Ergebnisse	31
3.1.	Die bisherigen Analysen der Dimerisierungsregion des Lac Repressors	31
3.1.1.	Das Testsystem	31
3.1.2.	Analyse der Mutanten im Monomer-Monomer-Interface	33
3.2.	Die Spezifitätsänderung D278L	37
3.2.1.	Negative Dominanz mit 5 x I ⁺ _{D278L-331Stop}	38
3.2.2.	Negative Dominanz mit 1 x I ⁺ _{D278L-tet}	39
3.3.	Die monomere Mutante L251A	41
3.3.1.	Repression über lange Distanzen	43
3.3.2.	L251A und tightbinder	46
3.4.	Heterodimerer Lac Repressor	50
3.4.1.	Kombinationen mit D278L	50
3.4.2.	Heterodimere mit D278E/K/R	52
3.4.3.	Heterodimere mit Doppelaustauschen	53
3.5.	Die potentielle Dimerisierungsregion von RBP	54
3.5.1.	Alignment von RBP und Lac Repressor	54
3.5.2.	Konstruktion von RBP mit dem „headpiece“ von Lac Repressor	57
3.5.3.	<i>In vivo</i> Test des RBP-HP-Fusionsproteins	57
3.5.4.	Einfügen von „Y282“ in das potentielle Dimerisierungsinterface von RBP	58
3.5.5.	Kombination mit dem tightbinder P3Y	59
3.5.6.	Kombination des Fusionsproteins mit einem „basictail“	60
3.5.7.	KRK-Sequenz und „four-helical-bundle“	61

3.5.8.	Negative Dominanz	62
4.	Diskussion	64
4.1.	Alignment der LacR-GalR-Familie	64
4.2.	Die Spezifitätsänderung D278L	66
4.2.1.	Mögliche Kontakte	67
4.2.2.	Ausrichtung der Seitenkette der Position 278	67
4.2.3.	Vermeidung von Heterodimerisierung	71
4.3.	Die Position L251	72
4.3.1.	Die monomere Mutante L251A	73
4.3.2.	Tetramerisierung von L251A	74
4.3.3.	L251A und tightbinder	76
4.4.	Das Dimerisierungsinterface von Lac Repressor	79
4.4.1.	Helix 10	80
4.4.2.	Helix 11	80
4.4.3.	Helix 12	82
4.4.4.	Der Dimerisierungsmechanismus	83
4.5.	Heterodimerer Lac Repressor	84
4.6.	Dimerisierung von RBP	85
4.6.1.	Das Ribose bindende Protein (RBP)	85
4.6.2.	Das Fusionsprotein	86
4.6.3.	Austausche an Position 282	87
4.6.4.	Verstärkung der DNA-Bindung	87
4.6.5.	RBP mit „basictail“, KRK-Sequenz und „four-helical-bundle“	88
4.6.6.	Analyse der bisherigen Ergebnisse	89
4.7.	Evolution von neuen Dimerisierungsoberflächen	92
5.	Zusammenfassung	93
6.	Literatur	94

Verzeichnis der Abbildungen:

1. Einleitung:

Abb. 1:	Organisation des <i>lac</i> Operons aus <i>E. coli</i>	2
Abb. 2:	Die modulare Struktur des Lac Repressors	3
Abb. 3:	Das „headpiece“ des Lac Repressors	4
Abb. 4:	Darstellung der Tetramerisierungsregion von Lac Repressor	5
Abb. 5:	Das „core“ des Lac Repressors	6
Abb. 6:	Die N-terminale Subdomäne des „core“ des Lac Repressors	8
Abb. 7:	Die C-terminale Subdomäne des „core“ des Lac Repressors	9
Abb. 8:	Vergleich der Kristallstrukturen von LacR und PurR	11
Abb. 9:	Vergleich der Struktur von CysB mit Lac Repressor	11
Abb. 10:	Vergleich der Strukturen des „core“ von Lac Repressor und RBP	13

2. Material und Methoden:

Abb. 11:	Schematische Darstellung des Plasmids pWB1000	21
Abb. 12:	Synthetischer Promoter, der die Sequenz des chromosomalen 1 x I ⁺ -Promotors enthält	24
Abb. 13:	Schematische Darstellung der verwendeten Plasmide	25
Abb. 14:	Schematische Darstellung des Plasmids pRBP-HP	27
Abb. 15:	Schematische Darstellung der PCR-Mutagenese	28
Abb. 16:	Die für Retardierungsgele verwendeten Hairpin-Targets	29

3. Ergebnisse

Abb. 17:	Schematische Darstellung der negativen Dominanz	32
Abb. 18:	Graphische Darstellung von der Fähigkeit der Dimerisierungsmutanten von Lac Repressor <i>in vivo</i> Homo- und Heterodimere zu bilden	35
Abb. 19:	Gelfoto der Produkte der Colony-PCR der chromosomalen Konstrukte	40
Abb. 20:	Retardierungsgel mit tightbinder Mutanten in Kombination mit der Mutation L251A	48
Abb. 21:	Retardierungsgel mit idealem Operator	51
Abb. 22:	Retardierungsgel mit idealem Operator	52

Abb. 23:	Zusammenfassung der <i>in vitro</i> Tests auf Heterodimere mit Doppelaustauschen an Position 251 und 278	54
Abb. 24:	Darstellung der Domänen von Lac Repressor und RBP	57
4.	Diskussion	
Abb. 25:	Alignment der Aminosäuren der Dimerisierungsoberfläche von Lac Repressor mit den analogen Resten einiger Mitglieder der LacR-GalR-Familie	64
Abb. 26:	Darstellung der Seitenketten der an Position 278 eingefügten Aminosäuren	68
Abb. 27:	Modell des Monomer-Monomer-Interface von Wildtyp Lac Repressor und der Mutante D278L	69
Abb. 28:	Modell des Monomer-Monomer-Interface von Wildtyp Lac Repressor und der Mutante D278L	70
Abb. 29:	Schematische Darstellung der Kontakte zwischen Position 251 und Position 278	72
Abb. 30:	Schematische Darstellung des Lac Repressor „headpiece“ mit DNA	78
Abb. 31:	Schematische Darstellung der Anordnung der Helices 10, 11 und 12 im Dimerisierungsinterface	79
Abb. 32:	Schematische Darstellung des Dimerisierungsinterface von Lac Repressor	83
Abb. 33:	Schematische Darstellung eines hypothetischen RBP-HP-Dimers	90

Verzeichnis der Tabellen:

3. Ergebnisse:

Tab. 1:	Tabellarische Darstellung der relativen Repressionswerte in % der in Abbildung 18 dargestellten Mutanten	34
Tab. 2:	β -Gal-Test auf negative Dominanz von 90 x $I_{331\text{Stop}}^{\text{d}}$ -Derivaten über 5 x $I_{331\text{Stop}}^{\text{+}}$ -Derivate	38
Tab. 3:	Test auf negative Dominanz durch Wildtyp Lac Repressor und die Mutante D278L	41
Tab. 4:	β -Gal-Test der 5 x $I^{\text{-}}$ und 90 x $I^{\text{+}}$ -Derivate der Mutante L251A im Vergleich zu Wildtyp Lac Repressor	42
Tab. 5:	Repression über lange Distanzen	44
Tab. 6:	Repression über lange Distanzen	46
Tab. 7:	β -Gal-Test der 90 x $I^{\text{+}}$ -Derivate der Mutante L251A in Kombination mit tightbinder Mutanten	47
Tab. 8:	β -Gal-Test der 90 x $I^{\text{+}}$ -Derivate mit geladenen Aminosäuren an Position 251 und der neutralen Mutation D278L	51
Tab. 9:	β -Gal-Test der 90 x $I^{\text{+}}$ -Derivate mit geladenen Aminosäuren an Position 278	53
Tab. 10:	Alignment der Aminosäuren der Dimerisierungsoberfläche von Lac Repressor mit den analogen Resten des Ribose bindenden Proteins (RBP)	55
Tab. 11:	β -Gal-Test des Fusionsproteins RBP-HP unter der Kontrolle des 90 x $I^{\text{+}}$ Promotors aus pWB1000	58
Tab. 12:	β -Gal-Test der RBP-HP-Mutanten mit Austausch in der zu Y282 von Lac Repressor entsprechenden Position	58
Tab. 13:	β -Gal-Test der RBP-HP-Mutanten in Kombination mit dem tightbinder P3Y	59
Tab. 14:	β -Gal-Test der RBP-HP-Mutanten mit „basictail“	60
Tab. 15:	β -Gal-Test der RBP-HP-Mutanten mit der KRK-Sequenz	61
Tab. 16:	β -Gal-Test der RBP-HP-Mutanten mit C-terminalen „four-helical-bundle“	62
Tab. 17:	β -Gal-Test auf negative Dominanz von RBP über Wildtyp Lac Repressor	63

1. Einleitung

Protein-Protein-Interaktionen sind essentiell für die meisten Stoffwechselfvorgänge in lebenden Organismen. Die Fähigkeit Homo- oder Heterodimere oder auch Multimere zu bilden ist für DNA-bindende Proteine von großer Bedeutung. Beispiele dafür sind die Heterodimerisierung von Jun und Fos in Eukaryoten (Johnson & McKnight, 1989), sowie die Oktamerisierung von Lambda cI Repressor (Senear *et al.*, 1993; Révet *et al.*, 1999) in *E. coli*. DNA-bindende Proteine in *E. coli* müssen in der Lage sein, eine Sequenz von mindestens 11 - 12 bp zu erkennen, um sicherzustellen, dass diese Sequenz statistisch nur einmal im Genom vorkommt. Da aber ein typisches Helix-Turn-Helix-Motiv nur 6 bp erkennt (Harrison & Aggarwal, 1990), ist die Fähigkeit Dimere zu bilden, eine Notwendigkeit.

Protein-Protein-Interaktionen folgen festen Regeln. So sind die Interaktionsflächen in Homodimeren in der Regel dichter gepackt und hauptsächlich hydrophob, was in einer hohen Stabilität des Komplexes resultiert. Heterodimere dagegen haben im allgemeinen eine glatte Oberfläche und enthalten mehr polare Reste, sind dafür aber wesentlich kurzlebiger (Jones & Thornton, 1996).

1.1. Das Laktose Operon von *E. coli*

Anhand des Laktose Operons von *E. coli* wurde 1961 von Jacob und Monod ein allgemein gültiges Modell für die Genregulation in Prokaryoten entwickelt (Jacob & Monod, 1961). In Bezug auf das *lac* Operon haben sich bis heute nur geringfügige Modifikationen des Operonmodells ergeben (Müller-Hill, 1996). Die Strukturgene des *lac* Operons, die β -Galaktosidase (*lacZ*), die Laktose Permease (*lacY*) und die Thiogalactosid Transacetylase (*lacA*) liegen unter der Kontrolle eines gemeinsamen Promotors und werden in einer polycistronischen mRNA transkribiert. Die Repression des Promotors erfolgt durch das Produkt des *lacI*-Gens, den Lac Repressor, der von seinem eigenen schwachen Promotor konstitutiv exprimiert wird (Abbildung 1).

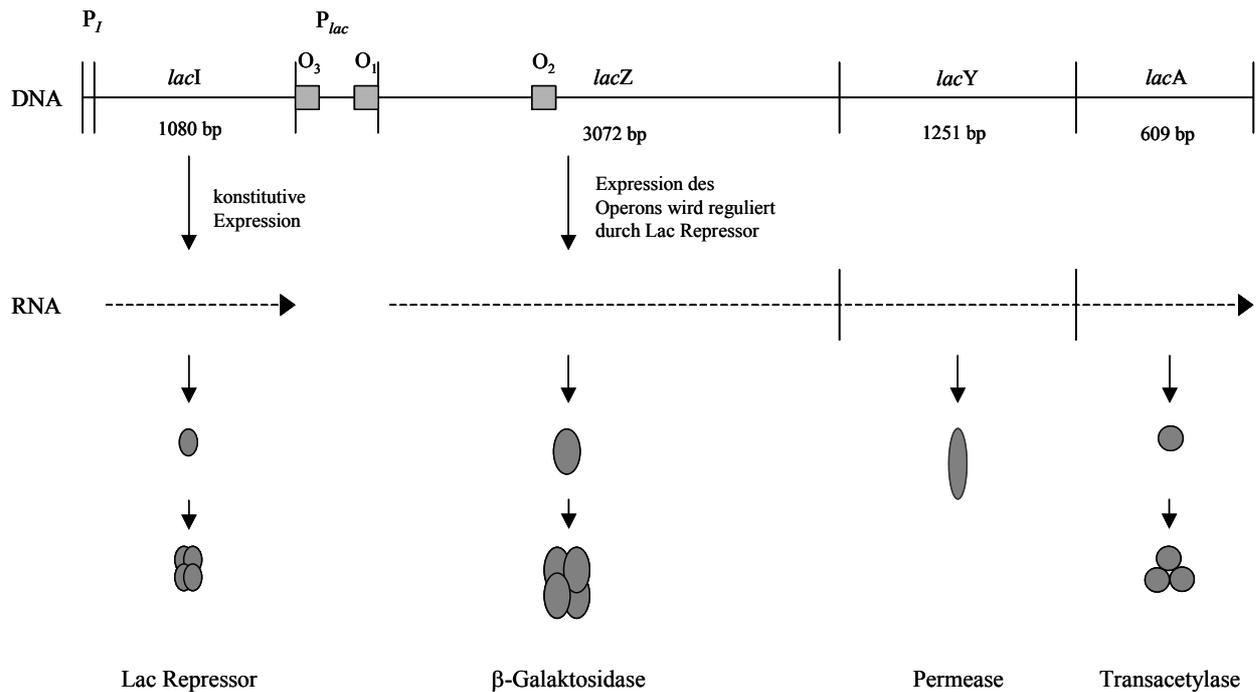


Abbildung 1: Organisation des *lac* Operons aus *E. coli*

1.2. Der Lac Repressor

Der Lac Repressor von *E. coli*, das regulatorische Protein des Laktose Operons, ist ein Tetramer aus vier identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von jeweils 38 kDa pro Untereinheit. Als Tetramer verfügt Lac Repressor über zwei Oberflächen zur Protein-Protein-Interaktion: das Monomer-Monomer-Interface, das den Zusammenschluss von zwei Monomeren zu einem Dimer ermöglicht, und das Dimer-Dimer-Interface, das die Tetramerisierung bewirkt. In Wildtyp *E. coli* kommen nur 10 Lac Repressor Tetramere pro Zelle vor.

1.2.1. Die modulare Struktur des Lac Repressors

Lac Repressor war 1966 das erste regulatorische Protein, das gereinigt werden konnte (Gilbert & Müller-Hill, 1966). Dabei wurde seine spezifische Bindung an IPTG ausgenutzt. 1973 konnte die Aminosäuresequenz von Lac Repressor bestimmt werden (Beyreuther *et al.*, 1973), die später durch die Sequenzierung des *lacI*-Gens bestätigt und vervollständigt wurde (Farabough, 1978).

In früheren Studien konnte der Phänotyp von mehr als 4000 verschiedenen Einzelaustauschen des Lac Repressors analysiert werden. Dazu wurden die Codons 2 bis 328 des *lacI*-Gens einzeln durch Amber-Codons ersetzt, und mit Hilfe von 12 bzw. 13 verschiedenen Supressor-Stämmen wurden die entsprechenden Austausche an den entsprechenden Positionen analysiert (Kleina & Miller, 1990; Markiewicz *et al.*, 1994). Auf der Basis dieser Daten in Zusammenhang mit den Kristallstrukturen der Lac Repressor-Komplexe mit IPTG oder Operator-DNA (Friedmann *et al.*, 1995; Lewis *et al.*, 1996), sowie der Kristallstrukturdaten von PurR (Schumacher *et al.*, 1994, 1995), konnte eine funktionelle Beschreibung aller Aminosäuren des Lac Repressors erstellt werden (Suckow *et al.*, 1996; Pace *et al.*, 1997).

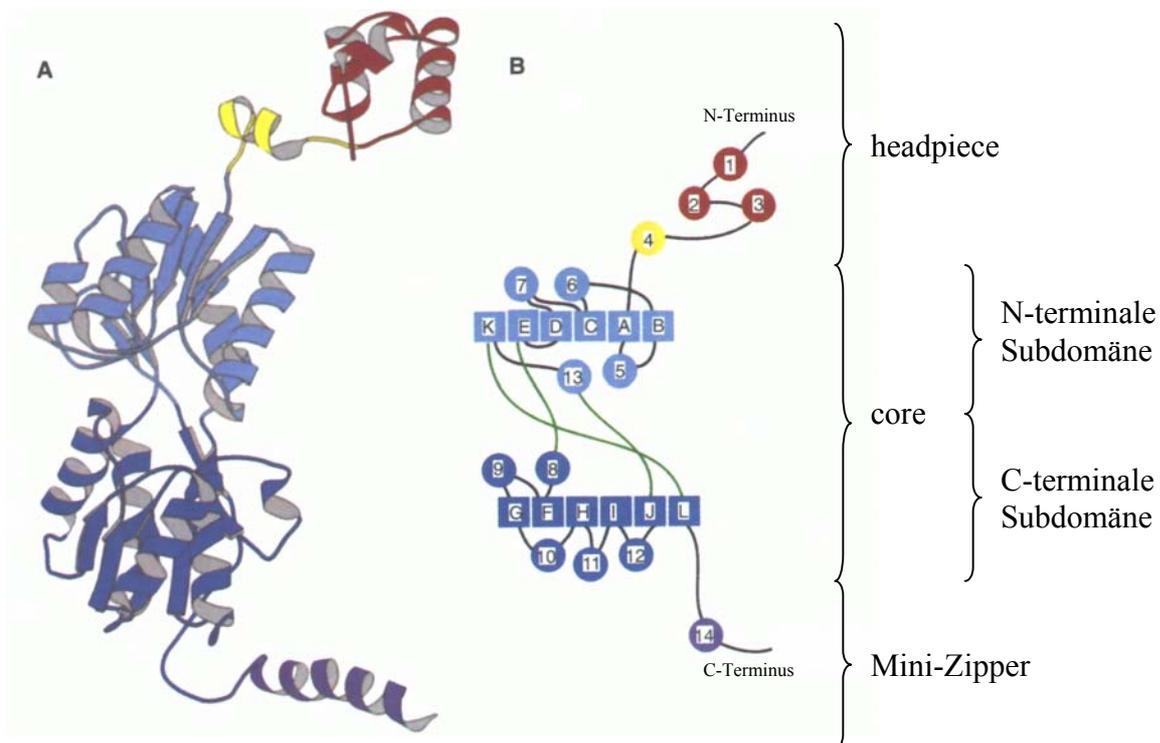


Abbildung 2: Die modulare Struktur des Lac Repressors (aus Lewis *et al.*, 1996). A) Darstellung eines Lac Repressor Monomers aus dem Komplex mit DNA, in dem die einzelnen Domänen farblich markiert sind. Rot: das Helix-Turn-Helix-Motiv der DNA-bindenden Domäne („headpiece“); Gelb: die „hinge“-Helix als Verbindungsstück zwischen dem „core“ und der DNA-bindenden Domäne; Hellblau: die N-terminale Subdomäne des „core“; Dunkelblau: die C-terminale Subdomäne des „core“; Lila: der Mini-Zipper der Tetramerisierungsdomäne. B) Schematische Darstellung eines Monomers aus dem Lac Repressor-DNA-Komplex. Die Farben sind wie in A), α -helices sind als Kreise dargestellt und nummeriert, Quadrate entsprechen β -Faltblattstrukturen. Die Verbindungen zwischen der N-terminalen und der C-terminalen Subdomäne des „core“ sind grün dargestellt. Die Beschreibung der einzelnen Domänen, sowie der entsprechenden α -Helices und β -Faltblätter erfolgt in den Abbildungen 3, 4 und 5.

Jedes Lac Repressor Monomer besteht aus drei Domänen: Die Aminosäuren 1 bis 59 sind für die spezifische Erkennung und Bindung der Operator Sequenzen zuständig; die Aminosäuren 60 bis 330 bilden das „core“ des Proteins, das die Dimerisierungs- und die Induktorbindungsregion enthält; und die Aminosäuren 331 bis 360 sind für den Zusammenschluss von zwei Dimeren zu einem Tetramer verantwortlich (Abbildung 2).

1.2.2. Die DNA-Erkennung

Wie bereits erwähnt findet die spezifische DNA Erkennung in der N-terminalen Domäne des Lac Repressors statt. Lac Repressor bindet spezifisch und kooperativ an die Operatorsequenzen O1 und O2 oder O3. O1 liegt in der Promotorregion des *lac* Operons (Gilbert & Maxam, 1973), O2 befindet sich 401 bp stromabwärts von O1 im *lacZ*-Gen, und O3 liegt 93 bp stromaufwärts von O1 am 3'-Ende des *lacI*-Gens (Reznikoff *et al.*, 1974).

Die Aminosäuren 1 bis 59 formen vier α -Helices, von denen die ersten beiden ein sogenanntes Helix-Turn-Helix (HTH) Motiv bilden (Matthews *et al.*, 1982). Das HTH-Motiv ist eines der am besten untersuchten DNA-Bindungsmotive und kommt in vielen Regulatorproteinen vor (Harrison & Aggarwal, 1990). Die zweite Helix des HTH-Motivs, die Erkennungshelix, legt sich in die große Grube der DNA, so dass sich spezifische Kontakte ausbilden können. Die vierte α -Helix, die sogenannte „hinge“-Helix, lagert sich in die kleine Grube der DNA und dient somit der Stabilisierung der spezifischen Bindung.

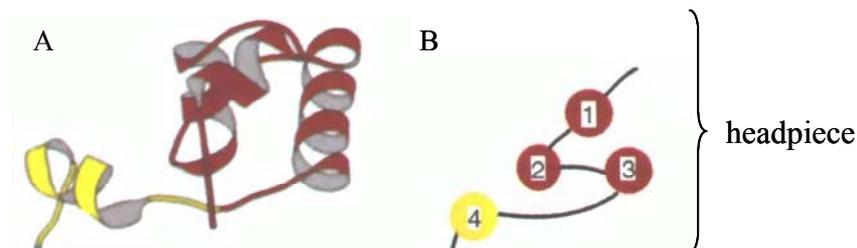


Abbildung 3: Das „headpiece“ des Lac Repressors (aus Lewis *et al.*, 1996). A) Darstellung eines einzelnen Lac Repressor Headpiece aus dem Komplex mit DNA, in dem die einzelnen Domänen farblich markiert sind. Rot: das Helix-Turn-Helix-Motiv der DNA-bindenden Domäne („headpiece“); Gelb: die „hinge“-Helix als Verbindungsstück zwischen dem „core“ und der DNA-bindenden Domäne. B) Schematische Darstellung eines „headpiece“ aus dem Lac Repressor-DNA-Komplex. Die Farben sind wie in A), α -helices sind als Kreise dargestellt und nummeriert.

„headpiece“:	α -Helices:	1	AS	6 – 12
		2	AS	17 – 25
		3	AS	32 – 45
		4	AS	50 – 58 (hinge-Helix)

Durch die Aufklärung der Kristallstrukturen des Lac Repressors mit und ohne Liganden fand man heraus, dass sich die „hinge“-Helix nur in Anwesenheit der Operator-DNA ausbildet. In Abwesenheit von DNA gibt es keine helikale Struktur, so dass die Verbindung zwischen DNA-Bindungsdomäne („headpiece“) und dem „core“-Protein außerordentlich flexibel ist.

1.2.3. Tetramerisierung

Die letzten 30 Aminosäuren des C-Terminus sind für die Tetramerisierung des Lac Repressors verantwortlich (Abbildung 4). Die Tetramerisierung erlaubt die gleichzeitige Bindung an zwei Operatoren und damit die Ausbildung von DNA-Schleifen. Durch kooperative Repression über DNA-Schleifenbildung wird maximale Repression mit schneller Induzierbarkeit vereint zu einer optimalen Regulation durch wenige Lac Repressor Moleküle (Oehler *et al.*, 1990).

Dass durch den Verlust der Tetramerisierungsfunktion die Dimerisierungsmöglichkeit nicht eingeschränkt wird, wurde durch die Entdeckung eines aktiven dimeren Lac Repressors gezeigt (Oehler *et al.*, 1990). Diese Mutante hat die volle Affinität für *lac* Operator, kann aber keine DNA-Schleifen mehr ausbilden.

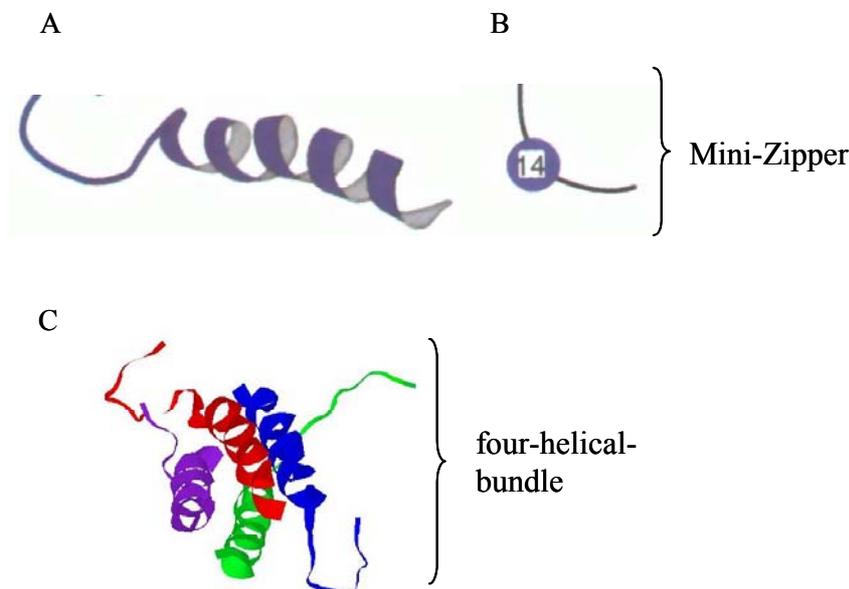


Abbildung 4: Darstellung der Tetramerisierungsregion von Lac Repressor (nach Lewis *et al.*, 1996). A) Darstellung eines einzelnen Mini-Zippers. B) Schematische Darstellung des Mini-Zippers. Die α -Helix ist als Kreis dargestellt, die Nummerierung entspricht Lewis *et al.* (1996). Die Tetramerisierungsregion umfasst die Aminosäuren 340 – 357. C) Schematische Darstellung des „four-helical-bundle“. Die Abbildung wurde mit Hilfe der Strukturdaten 1LBH (Lac Repressor mit IPTG, Lewis *et al.*, 1996) erstellt. Die unterschiedlichen Farben repräsentieren jeweils die Mini-Zipper der einzelnen Monomere. Jeweils der blaue und der grüne Mini-Zipper und der rote und der lila Mini-Zipper gehören zu einem Dimer.

Die Tetramerisierungsregion von Lac Repressor weist eine große Ähnlichkeit mit eukaryotischen bZip-Proteinen auf (Alberti *et al.*, 1991; Chakerian *et al.*, 1991). Die sogenannten Leucin-Zipper-Domänen der bZip-Proteine bestehen aus einer amphiphilen α -Helix, bei der jeder siebte Rest ein Leucin ist. Mindestens drei, meistens vier dieser Einheiten, die sogenannten „heptad repeats“ bilden einen Leucin-Zipper. Zwei derartiger Helices sind bei den eukaryotischen bZip-Proteinen nach Art eines „coiled coil“ umeinander gewunden (O'Shea *et al.*, 1989a; 1989b). Im Gegensatz dazu besitzt der Mini-Zipper des Lac Repressors von Aminosäure 342 bis 356 nur drei Leucin-Seitenketten im richtigen Abstand von jeweils sieben Aminosäuren, und damit nur zwei „heptad repeats“, die aber an den selben Positionen wie die eukaryotischen Zipper zusätzliche hydrophobe Reste enthalten. Bei der Tetramerisierung aggregieren vier identische Mini-Zipper zu einem antiparallelen Vier-Helix-Bündel (Alberti *et al.*, 1993, Abbildung 4), während die eukaryotischen Zipper parallel dimerisieren.

1.2.4. Das „core“ des Lac Repressors

Das sogenannte „core“ des Lac Repressors ist mit den Aminosäuren 60 bis 330 die größte der drei Domänen und hat zwei Funktionen: Die Dimerisierung (Schmitz *et al.*, 1976) und die Induktorbindung (Platt *et al.*, 1973).

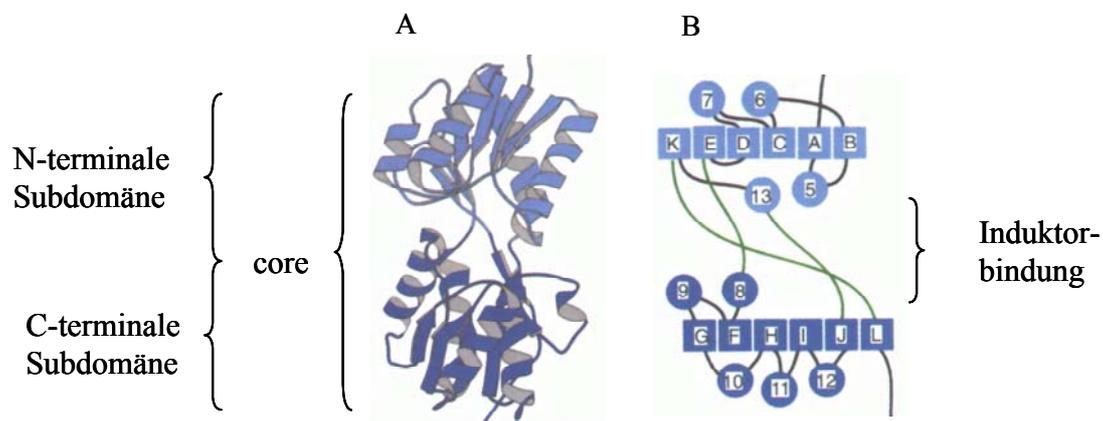


Abbildung 5: Das „core“ des Lac Repressors (aus Lewis *et al.*, 1996). A) Darstellung eines einzelnen Lac Repressor „core“ aus dem Komplex mit DNA, in dem die einzelnen Domänen farblich markiert sind. Hellblau: die N-terminale Subdomäne des „core“; Dunkelblau: die C-terminale Subdomäne des „core“. B) Schematische Darstellung eines einzelnen „core“ aus dem Lac Repressor-DNA-Komplex. Die Farben sind wie in A), α -helices sind als Kreise dargestellt und nummeriert, Quadrate entsprechen β -Faltblattstrukturen. Die Beschreibung der einzelnen Domänen, sowie der entsprechenden α -Helices und β -Faltblätter erfolgt in den Abbildungen 6 und 7. Die Verbindungen zwischen der N-terminalen und der C-terminalen Subdomäne des core sind grün dargestellt.

Strukturell kann man das „core“ in die N-terminale und die C-terminale Subdomäne unterteilen, die ähnlich aufgebaut sind (Friedman *et al.*, 1995; Lewis *et al.*, 1996). In dem Zwischenraum, der zwischen der N-terminalen und der C-terminalen Subdomäne liegt, befindet sich die Induktorbindungstasche (Abbildung 5).

1.2.4.1. Die Induktorbindungstasche

Die Induktorbindungstasche befindet sich zwischen den zwei Subdomänen des „core“ (siehe auch Abbildung 5). Bis zu 20 Aminosäuren, die in der Primärstruktur weit voneinander entfernt liegen, können an der Induktorbindung beteiligt sein. Eine nähere Charakterisierung der Aminosäuren, die für eine direkte Interaktion mit dem Induktor in Frage kommen, wurde von Suckow *et al.* (1996) anhand des Kristalls durchgeführt.

Lac Repressor Mutanten mit I^S-Phänotyp, d. h. Mutanten, die nicht mehr induzierbar sind, können helfen, wichtige Interaktionen zu identifizieren (Kleina & Miller, 1990; Markiewicz *et al.*, 1994; Suckow *et al.*, 1996; Pace *et al.*, 1997). Dabei muss allerdings beachtet werden, dass der I^S-Phänotyp nicht nur dadurch zustande kommen kann, dass der Kontakt zwischen dem Induktor und dem Protein behindert wird, sondern auch durch Mutationen in Bereichen des Lac Repressors, die für die allosterische Umlagerung nach der Induktorbindung verantwortlich sind.

Zwar zeigen sowohl die Kristallstruktur des Komplexes von Lac Repressor mit IPTG (Lewis, *et al.*, 1996) als auch die Kristallstruktur von Lac Repressor im Komplex mit idealem Operator und dem Anti-Induktor ONPF (o-Nitrophenyl-β-D-Fukosid) (Bell & Lewis, 2000; Bell & Lewis, 2001), der die Affinität von Lac Repressor zum Operator dreifach erhöht (Riggs *et al.*, 1970), deutlich die Lage des Zuckers in der Induktorbindungstasche sowie die möglichen Protein-Induktor-Kontakte, aber die Spezifität der Induktorbindung ist nach wie vor ungeklärt.

1.2.4.2. Die N-terminale Subdomäne

Die N-terminale Subdomäne schließt sich unmittelbar an die „hinge“-Helix der DNA-Erkennungsregion an (Abbildung 6). Sie besteht aus den Aminosäuren 60 bis 161 sowie 293 bis 318 und ist über drei Linker mit der C-terminalen Subdomäne verbunden (Lewis *et al.*, 1996). Viele Austausche in der N-terminalen Subdomäne resultieren in einem I^S-Phänotyp (Kleina & Miller, 1990; Markiewicz *et al.*, 1994; Suckow *et al.*, 1996; Pace *et al.*, 1997), was darauf hindeutet, dass in dieser Region allosterische Umlagerungen infolge der

Induktorbindung stattfinden. Diese Annahme bestätigt sich auch dadurch, dass eine Fixierung des N-terminalen Monomer-Monomer-Interfaces über Disulfidbrücken die allosterische Umlagerung verhindert (Falcon *et al.*, 1997). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich sowohl die Kontakte im N-terminalen Monomer-Monomer-Interface als auch die Kontakte zwischen dem „headpiece“ und der N-terminalen Subdomäne unterscheiden, je nachdem, ob ein Induktor gebunden ist oder nicht (Lewis *et al.*, 1996; Bell & Lewis, 2000; Bell & Lewis, 2001).

Trotzdem scheint das Monomer-Monomer-Interface der N-terminalen Subdomäne an der Dimerisierung des Lac Repressors beteiligt zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass ein einzelner Aminosäureaustausch an Position K84 gegen einen hydrophoben Rest ausreichend ist, um Lac Repressor zu stabilisieren (Nichols & Matthews, 1997; Gerk *et al.*, 2000).

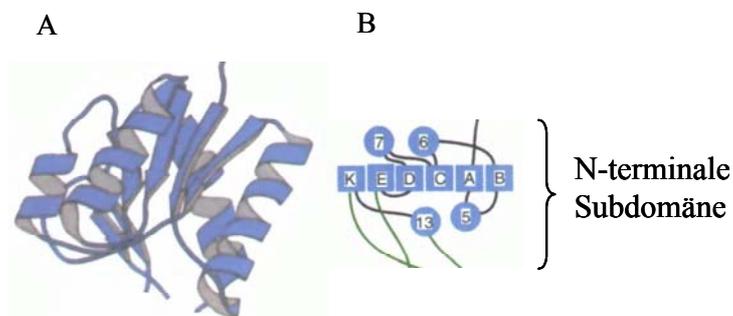


Abbildung 6: Die N-terminale Subdomäne des „core“ des Lac Repressors (aus Lewis *et al.*, 1996). A) Darstellung einer einzelnen N-terminalen Subdomäne des Lac Repressors aus dem Komplex mit DNA. B) Schematische Darstellung einer einzelnen N-terminalen Subdomäne aus dem Repressor-DNA-Komplex. α -Helices sind als Kreise dargestellt und nummeriert, Quadrate entsprechen β -Faltblattstrukturen.

N-terminale Subdomäne:	β -Faltblätter:	A	AS	63 – 68
		B	AS	92 – 98
		C	AS	121 – 124
		D	AS	145 – 149
		E	AS	158 – 161
		K	AS	316 – 318
	α -Helices:	5	AS	74 – 90
		6	AS	104 – 116
		7	AS	131 – 137
		13	AS	293 – 309

1.2.4.3. Die C-terminale Subdomäne

Die C-terminale Subdomäne wird von den Aminosäuren 164 bis 289 und 322 bis 330 gebildet (Lewis *et al.*, 1996; Suckow *et al.*, 1996; Abbildung 7). Sie ist der N-terminalen Subdomäne topologisch ziemlich ähnlich, und stellt ebenfalls einen Teil der Kontakte bei der

Induktorbindung. Im Gegensatz zur N-terminalen Subdomäne finden in der C-terminalen Subdomäne keine allosterischen Umlagerungen in Folge der Induktorbindung statt, die Kontakte zwischen den Sekundär-Strukturelementen bleiben unverändert (Lewis *et al.*, 1996). In der C-terminalen Subdomäne liegt auch die Interaktionsfläche, die den Zusammenschluss von zwei Monomeren zu einem Dimer ermöglicht. Dieses Interface wird im wesentlichen von drei α -Helices gebildet: Aminosäure 222 bis 243 (Helix 10 nach Lewis *et al.*, 1996, siehe auch Abbildung 2), Aminosäure 247 bis 259 (Helix 11) und Aminosäure 279 bis 281 (Helix 12) (Lewis *et al.*, 1996; Suckow *et al.*, 1996). Aus der Analyse von Suckow *et al.*(1996) geht hervor, dass insgesamt 15 Aminosäuren innerhalb und im Umfeld dieser Helices an der Monomer-Monomer-Interaktion direkt beteiligt sein könnten. Dabei handelt es sich um die Aminosäuren Ser 221, Ala 222, Met 223, Phe226, Leu 251, Met 254, Arg 255, Thr 258, Glu 259, Asp 278, Ser 280, Cys 281, Tyr 282, Ile 283 und Pro 285. Aber nur die Seitenketten der Aminosäuren Ala 222, Met 223, Phe226, Leu 251, Arg 255, Asp 278, Cys 281, Tyr 282 und Ile 283 sind in Richtung des gegenüberliegenden Monomers orientiert und damit wahrscheinlich eher an der Dimerisierung beteiligt. Die Seitenketten der übrigen Reste richten sich mehr in Richtung des „core“ des eigenen Monomers aus, und scheinen daher eher stabilisierende als interagierende Funktionen zu haben.

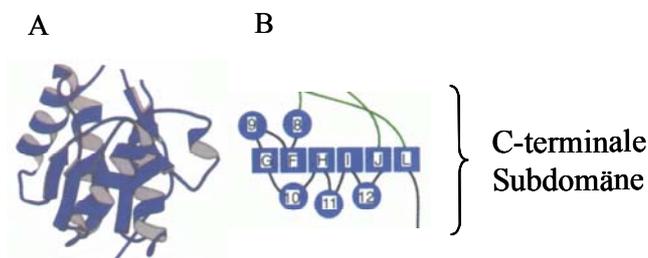


Abbildung 7: Die C-terminale Subdomäne des „core“ des Lac Repressors (aus Lewis *et al.*, 1996). A) Darstellung einer einzelnen C-terminalen Subdomäne des Lac Repressors aus dem Komplex mit DNA. B) Schematische Darstellung einer einzelnen C-terminalen Subdomäne aus dem Lac Repressor-DNA-Komplex. α -helices sind als Kreise dargestellt und nummeriert, Quadrate entsprechen β -Faltblattstrukturen.

C-terminale Subdomäne:	β -Faltblätter:	F	AS	182 – 185
		G	AS	214 – 217
		H	AS	240 – 244
		I	AS	269 – 274
		J	AS	287 – 290
		L	AS	322 – 324
	α -Helices:	8	AS	164 – 175
		9	AS	192 – 205
		10	AS	222 – 234
		11	AS	247 – 259
		12	AS	279 – 281

1.3. Die Familie der mit Lac Repressor verwandten Proteine

Obwohl die Struktur des Lac Repressors erst 1995/1996 aufgeklärt werden konnte (Friedmann *et al.*, 1995; Lewis *et al.*, 1996), wurde schon anhand der Sequenzvergleiche von Lac Repressor (Beyreuther *et al.*, 1973) und Gal Repressor (von Wilcken-Bergmann & Müller-Hill, 1982) deutlich, dass eine Verwandtschaft auf der Ebene der Aminosäuresequenz, und daher vermutlich auch in der Struktur, gegeben ist (Müller-Hill, 1983).

Lac Repressor gehört zu der LacR-GalR-Familie von regulatorischen Proteinen (Weickert & Adhya, 1992a,b), die in *E. coli* 16 Mitglieder hat (Blattner *et al.*, 1997). Die meisten dieser Proteine arbeiten als Dimere, nur Lac Repressor (Müller-Hill *et al.*, 1971), Fru Repressor (Cortay *et al.*, 1994) und Raf Repressor (Jaenicke *et al.*, 1990) bilden Tetramere. Obwohl der Mechanismus der Tetramerisierung von Fru und Raf Repressor bisher nicht aufgeklärt werden konnte, liegt durch die Abwesenheit einer Homologie zu dem „heptad repeat“ von Lac Repressor (Weickert & Adhya, 1992b) die Entwicklung eines anderen Mechanismus nahe. Das eine Tetramerisierung nicht unbedingt notwendig ist für die Ausbildung von DNA-Schleifen, konnte am Beispiel des dimeren Gal Repressors gezeigt werden, der kooperativ an zwei Operatoren binden kann (Choy & Adhya, 1992; Lyubchenko *et al.*, 1997).

Die strukturelle Verwandtschaft innerhalb der LacR-GalR-Familie zeigt sich besonders deutlich im Vergleich der Kristallstrukturen von Pur Repressor und Lac Repressor (Abbildung 8). Der einzige Unterschied auf struktureller Ebene zwischen Lac Repressor und Pur Repressor besteht darin, dass Pur Repressor Hypoxanthin oder Guanin als Corepressor braucht (Meng & Nygard, 1990), während Lac Repressor durch Allolaktose oder IPTG induziert wird. Daher zeigt sich die Ähnlichkeit nicht nur in den DNA-bindenden Formen von Lac Repressor und Pur Repressor, sondern auch in der allosterischen Umlagerung durch die Induktorbindung bei Lac Repressor und die Dissoziation des Corepressors bei Pur Repressor (Schumacher *et al.*, 1994, 1995; Lewis *et al.*, 1996; Bell & Lewis, 2000).

Die kürzlich veröffentlichte Röntgenstrukturanalyse der „core“-Domäne von CysB, einem regulatorischen Protein der Cysteinbiosynthese aus *Klebsiella Aerogens*, bei dem es sich um ein Mitglied der LysR-Familie handelt, hat eine erstaunliche Verbindung zu den Mitgliedern der LacR-GalR-Familie hergestellt (Tyrell *et al.*, 1997). Die „core“-Domäne von CysB ist strukturell genauso aufgebaut wie die Mitglieder der LacR-GalR-Familie und die periplasmatischen zuckerbindenden Proteine, und ist genauso aufgeteilt in eine N-terminale und eine C-terminale Subdomäne.

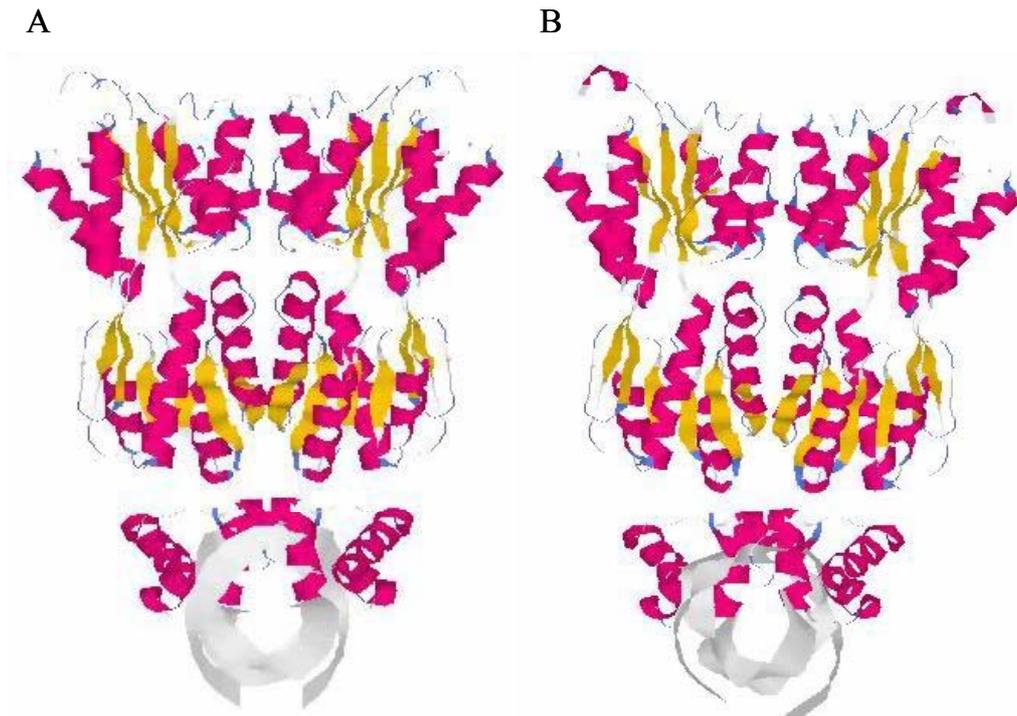


Abbildung 8: Vergleich der Kristallstrukturen von LacR und PurR. A) Lac Repressor Dimer ohne „four-helical-bundle“. Die Abbildung wurde mit Hilfe der Strukturdaten 1LBG (Lac Repressor im Komplex mit DNA, Lewis *et al.*, 1996) erstellt. B) Pur Repressor Dimer. Die Abbildung wurde mit Hilfe der Strukturdaten 1QQB (Pur Repressor im Komplex mit DNA, Glasfeld *et al.*, 1999) erstellt.

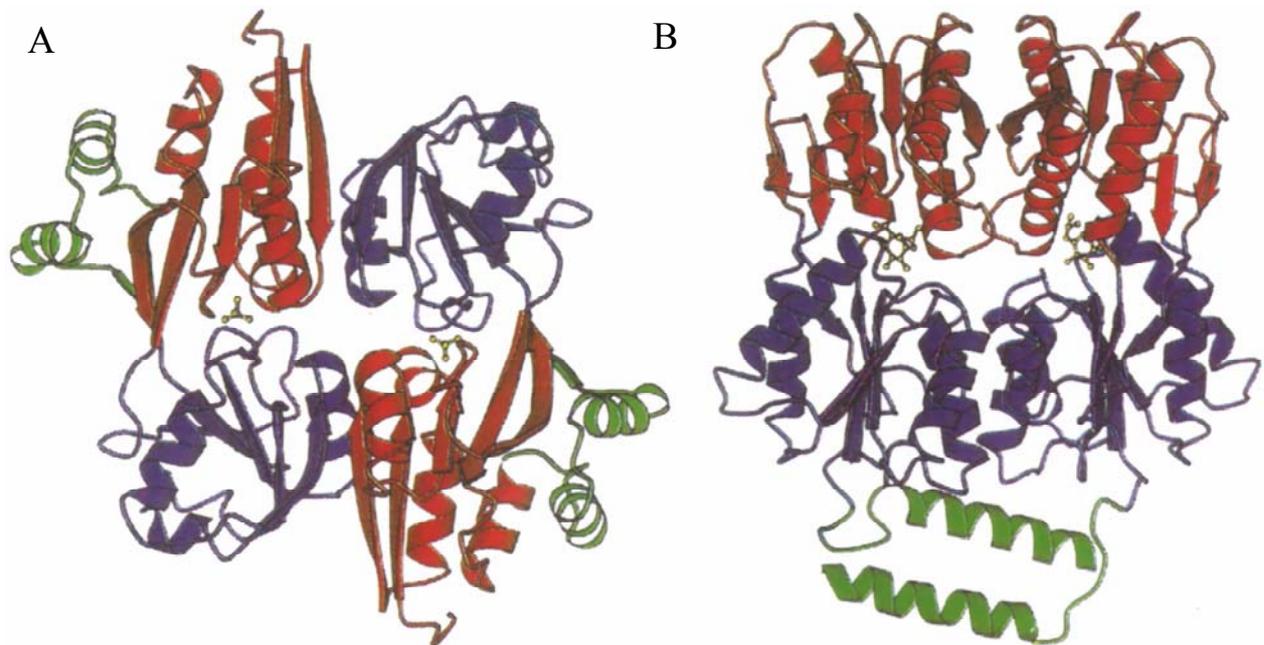


Abbildung 9: Vergleich der Struktur von CysB mit Lac Repressor. Die unterschiedlichen Subdomänen des „core“ sind jeweils rot bzw. blau gekennzeichnet, und die C-terminalen Reste sind in grün dargestellt. A) Ein CysB-dimer. Die Kristallstruktur von CysB enthält lediglich das Fragment von Aminosäure 88 bis 324. B) Ein Lac Repressor Dimer in der IPTG-gebundenen Form ohne „headpiece“ (aus Tyrell *et al.*, 1997).

Allerdings zeigt der Kristall einen wesentlichen Unterschied zwischen den Familien: Während sich in der LacR-GalR-Familie zwei Monomere parallel zu einem Dimer zusammenlagern, aggregieren die CysB-Monomere antiparallel (obwohl die Sekundärstruktur und die Tertiärstruktur erhalten geblieben ist) (Abbildung 9).

Trotz dieser engen Verwandtschaft innerhalb der LacR-GalR-Familie sowie zu anderen Protein-Familien wie der LysR-Familie oder den periplasmatischen zuckerbindenden Proteinen gibt es bisher keinen Hinweis auf eventuell vorkommende Heterodimerisierung zwischen den einzelnen Mitgliedern der LacR-GalR-Familie.

1.3.1. Das Ribose bindende Protein (RBP)

Dass die periplasmatischen zuckerbindenden Proteine wie RBP (*ribose binding protein*), GBP (*galactose binding protein*) und ABP (*arabinose binding protein*) eine Homologie auf der Ebene der Aminosäuresequenz zu den Mitgliedern der LacR-GalR-Familie aufweisen, wurde schon früh erkannt (Müller-Hill, 1983; Weickert & Adhya, 1992). Der Vergleich ihrer Kristallstrukturen (Newcomer *et al.*, 1981; Vyas *et al.*, 1988, 1991; Mowbray & Cole, 1992) mit den Kristallstrukturen von LacR (Friedmann *et al.*, 1995; Lewis *et al.*, 1996; Bell & Lewis, 2000, 2001) und PurR (Schumacher *et al.*, 1994, 1995) zeigt eine erstaunliche Ähnlichkeit auf der strukturellen Ebene.

Die periplasmatischen zuckerbindenden Proteine sind monomer in Lösung. Sie haben keine DNA-bindende Domäne. Das „core“ hat allerdings die gleiche Struktur wie das „core“ von LacR und PurR, unterteilt in eine N-terminale und eine C-terminale Subdomäne mit einer Bindungsstelle für Liganden zwischen den beiden Subdomänen.

RBP ist der periplasmatische Rezeptor für Ribose und verantwortlich für Chemotaxis und Transport von Ribose (Ames, 1986; Kondoh *et al.*, 1979). Es ist monomer in Lösung und bindet hochspezifisch β -D-Ribose in der Pyranose-Form. Die Kontakte zwischen Protein und Zucker sind durch die Kristallstruktur mit Ribose aufgeklärt (Mowbray & Cole, 1992). Die Struktur von RBP und die Struktur des Lac Repressors sind außerordentlich ähnlich, aber auch auf der Ebene der Aminosäuresequenz sind 20 % der Reste im „core“ identisch, und immerhin 60 % der Reste sind ähnlich (Weickert & Adhya, 1992) (Abbildung 10).

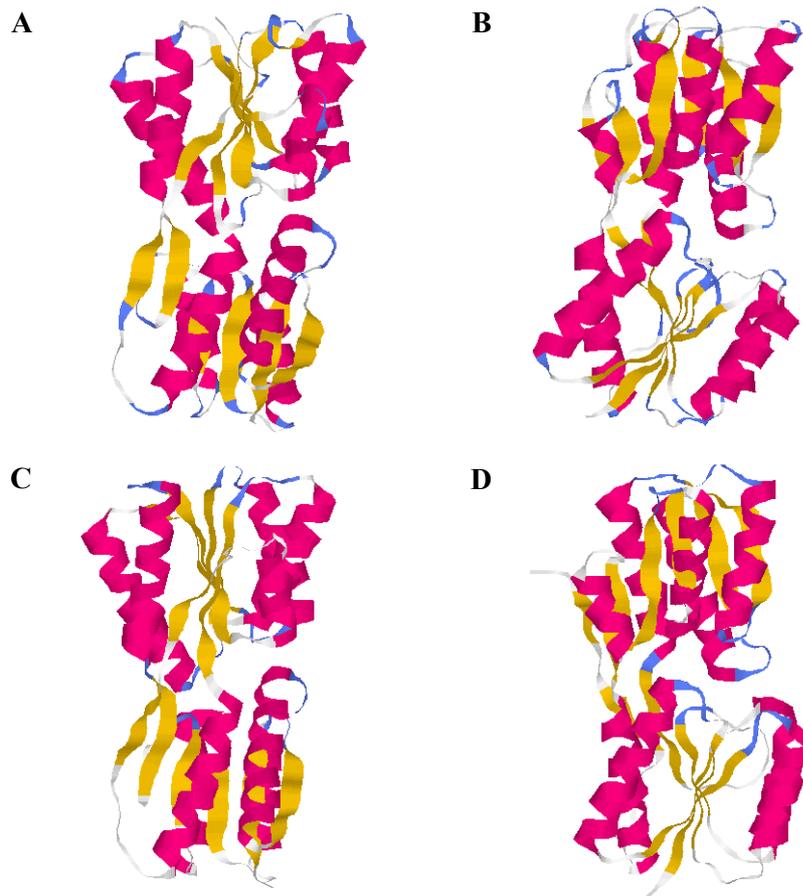


Abbildung 10: Vergleich der Strukturen des „core“ von Lac Repressor und RBP. A) Einzelnes Lac Repressor „core“ mit Sicht auf die Dimerisierungsregion. B) Einzelnes Lac Repressor „core“ in „Seitenansicht“. C) RBP-Monomer mit Sicht auf die Seite, die der Dimerisierungsregion entspricht. D) RBP-Monomer in „Seitenansicht“. Die Ansichten des Lac Repressor „core“ wurden mit Hilfe der Strukturdaten 1LBH (Lac Repressor mit IPTG, Lewis *et al.*, 1996) erstellt. Die Ansichten von RBP wurden mit Hilfe der Strukturdaten 2DRI (RBP mit Ribose, Mowbray & Cole, 1992) erstellt.

Unterschiede zwischen RBP und LacR sowie PurR gibt es allerdings in der Stärke der allosterischen Umlagerung. In der offenen Form, ohne gebundenen Liganden, ist die Kluft zwischen den beiden Subdomänen des „core“ bei RBP viel größer als bei Lac Repressor und Pur Repressor (Mowbray & Björkman, 1999).

1.4. Ziele der Arbeit

Wie in Abschnitt 1.2.4.3. beschrieben, besteht das Dimerisierungsinterface von Lac Repressor aus 3 α -Helices, und innerhalb dieser 3 α -Helices konnten insgesamt 15 Aminosäuren bestimmt werden, die an der Monomer-Monomer-Interaktion direkt beteiligt sein können (Lewis *et al.*, 1996; Suckow *et al.*, 1996). Im Rahmen dieser Arbeit soll auf der Basis der vorausgegangenen Studien (Dong, 1997; Zimmermann, 1997; Spott, 1998) eine Analyse

dieser 15 Positionen *in vivo* anhand von Austausch stattfinden. Eine Änderung der Dimerisierungsspezifität soll durch gezieltes Einfügen von Mutationen in die Dimerisierungsoberfläche von Lac Repressor erreicht werden, um den Mechanismus der spezifischen Dimerisierung des Lac Repressors aufzuklären.

Zusätzlich sollen durch eine weiterführende Analyse der monomeren Mutante L251A Ansätze entwickelt werden, wie aus einem monomeren Protein ein Dimer gemacht werden kann. Außerdem soll anhand von Experimenten mit L251A im tetrameren Hintergrund analysiert werden, ob in der Formation von Lac Repressor Tetrameren die höhere Priorität auf der Bildung von einem Dimer aus zwei Monomeren, oder von einem Tetramer aus zwei Dimeren liegt.

Über Austausche mit geladenen Aminosäuren an Position 251 und 278 des Lac Repressors sollten Heterodimere entstehen, die nicht mehr in der Lage sind, Homodimere auszubilden.

Auf der Basis der Erkenntnisse über die Dimerisierungsoberfläche von Lac Repressor soll versucht werden, durch gezielte Austausche aus dem monomeren periplasmatischen zuckerbindenden Protein RBP ein dimeres DNA-bindendes Protein zu machen.

2. Material und Methoden

2.1. Abkürzungen

A	A	Adenin
	AmpR	Ampicillin-Resistenz
	AS	Aminosäure
	<i>attP</i>	Integrationsstelle des Phagen Lambda in das <i>E. coli</i> Chromosom
	<i>attB</i>	Integrationsstelle von <i>E. coli</i> für den Phagen Lambda
B	β-Gal	β-Galaktosidase
	bp	Basenpaare
	bzw.	beziehungsweise
C	C	Cytidin
	ca.	circa
	camR	Chloramphenicol-Resistenz
	cm	Zentimeter
D	d. h.	das heißt
	dCTP	2'-Desoxycytosintriphosphat
	ddH ₂ O	doppeltdestilliertes Wasser
	dH ₂ O	deionisiertes Wasser
	DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>desoxyribonucleic acid</i>
	DTT	Dithiothreitol
E	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
	EMB	Eosin-Methylen-Blau
G	g	Gramm
	G	Guanin
	GCG	Genetics Computer Group
H	h	Stunde

I	IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid
K	kDa	Kilodalton
L	l	Liter
M	M	Molar
	μ g	Mikrogramm
	μ l	Mikroliter
	min	Minuten
	ml	Milliliter
	mM	Millimolar
	mRNA	Boten-RNA, <i>messenger ribonucleic acid</i>
N	ng	Nanogramm
O	O	Operator
	OD	Optische Dichte
	ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
	Ori	<i>Origin of replication</i>
P	PAA	Polyacrylamid
	PCR	Polymerase-Kettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>
	pMol	Picomol
R	RBP	<i>ribose binding protein</i>
	RNA	Ribonunukleinsäure, <i>ribonucleic acid</i>
	rpm	Umdrehungen pro Minute, <i>rounds per minute</i>
	RT	Raumtemperatur
S	sec	Sekunden

T	T	Thymin
	TetR	Tetrazyklin-Resistenz
	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	U	Unit (Enzymeinheit)
V	V	Volt
W	WT	Wildtyp
X	X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
Z	z. B.	zum Beispiel

2.1.1. Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

2.2. Material

2.2.1. Chemikalien

Sofern es nicht extra erwähnt wird, wurden Chemikalien des Reinheitsgrades „zur Analyse“ der folgenden Firmen verwendet:

Amersham Buchler (Braunschweig), Applied Biosystems (Pfungstadt), Bethesda Research Laboratories Inc. (Rockville, USA), Bio-Rad Laboratories (München), Boehringer Mannheim

GmbH (Mannheim), Difco Laboratories (Detroit, USA), Fluka AG (Buchs, Schweiz), FMC Corporation (Rockland, USA), Merck AG (Darmstadt), Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Schweden), Qiagen GmbH (Düsseldorf), Roth (Karlsruhe), Serva Feinbiochemica (Heidelberg), Sigma Chemie (München).

2.2.2. Enzyme

Enzyme wurden bezogen von:

Gibco BRL (Eggenstein), New England Biolabs GmbH (Schwalbach).

Alle Enzyme wurden, soweit es nicht anders angegeben wird, nach den Vorschriften der Hersteller in den mitgelieferten Puffern verwendet.

2.2.3. Medien, Puffer und Platten

YT- und dYT-Flüssigmedien, sowie YT-Agarplatten wurden nach Standardprotokollen zubereitet (Sambrook *et al.*, 1989). Für 1 Liter Minimalplatten wurden jeweils 16 g Agar in 800 ml H₂O autoklaviert. Dann wurden 100 ml 10 x A (Zusammensetzung siehe unten), 5 ml Glycerin (87 %), 1 ml MgSO₄ (1 M), 2 ml Thiamin (1 %) zugegeben und mit dH₂O auf 1 Liter aufgefüllt.

Die Puffer 10 x A (1 Liter enthält: 137,5 g K₂HPO₄ x 2 H₂O, 45 g KH₂PO₄, 10 g (NH₄)₂SO₄, 5 g Na-Citrat x 2 H₂O) und 10 x Z (1 Liter enthält: 105 g Na₂HPO₄, 55 g NaH₂PO₄, 100 mM KCl) für den β-Gal-Test wurden nach Miller (1972) erstellt.

Die Minimalmedien für den β-Gal-Test setzen sich wie folgt zusammen:

Für JMX8634R: 100 ml 10 x A, 5 ml Glycerin (87%), 2 ml Thiamin (1%), 1 ml MgSO₄ (1 M), 1 ml FeSO₄ (100 mM), 10 ml Tryptophan (2%), 10 ml Prolin (2%), 10 ml Casaminoacids (10%), 175 µl CaCl₂ (1 M), ad 1 Liter mit ddH₂O

Das Minimalmedium für die *in vivo* Tests der RBP-Konstrukte enthielt zusätzlich noch D-Ribose in einer Endkonzentration von 1 %.

Für CSH33 und für lysogene λ-Stämme:

100 ml 10 x A, 5 ml Glycerin (87%), 2 ml Thiamin (1%), 1 ml MgSO₄ (1 M), 1 ml FeSO₄ (100 mM), 10 ml Casaminoacids (10%), 175 µl CaCl₂ (1 M), ad 1 Liter mit ddH₂O

Die verwendeten Indikatorplatten setzen sich wie folgt zusammen (Miller, 1972):

McConkey-Platten: 20 g McConkey-Base auf 400 ml H₂O, autoklavieren, 25 ml Lactose (20 %), ad 500 ml mit dH₂O

EMB-Platten: 5 g Peptone, 0,5 g Hefe-Extrakt, 2,5 g NaCl, 8 g Agar, 1 g KH₂PO₄, auf 400 ml mit H₂O, autoklavieren, 5 ml Eosin gelb (4 %), 5 ml Methylblau (0,65 %), 25 ml Laktose (20 %), ad 500 ml mit dH₂O

Indikatorplatten reagieren auf eine Veränderung des pH-Wertes, wenn der eingesetzte Zucker als Kohlenstoffquelle metabolisiert wird. Auf McConkey-Platten mit Laktose färben *sich E. coli* Kolonien dunkelrot, wenn sie Laktose abbauen, während Kolonien, die Laktose nicht verwerten können, farblos bleiben. Auf EMB-Platten mit Laktose sind die Kolonien, die Laktose abbauen, tieflila eventuell mit grünem Schimmer, während *lac* negative weiß oder pinkfarbenen bleiben.

Je nach Bedarf wurden den Medien 300 µg/ml Ampicillin (für pWB₃₃₁Stop- und pWB1000-Derivate), 10 µg/ml Tetrazyklin (für pSO110-P1- und pSO1010-P1-Derivate), 40 µg/ml Kanamycin (für pLDR8), 50 µg/ml Chloramphenicol (für pLDR12), 10 µg/ml Chloramphenicol (für JMX8634R-1 x I⁺_{WT} und JMX8634R-1 x I⁺_{D278L}), und 60 µg/ml X-Gal zugegeben.

2.2.4. Synthetische Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide wurden auf einem DNA/RNA-Synthesizer Modell ABI 394A von Applied Biosystems, Pfungstadt nach der Phosphoamiditmethode synthetisiert und über 8 - 12 %ige PAA-Gele gereinigt. Des weiteren wurden Oligonukleotide von Eurogentec Corp, Seraing, Belgien, sowie von ARK Scientific GmbH Biosystems, Darmstadt, bezogen.

2.2.5. Software

Für die Analyse von Nukleotid-Sequenzen wurde das GCG-Sequence Analysis Software Package Version 8.0 und 8.1 der Wisconsin Genetic Computing Group (Devereux *et al.*, 1984) verwendet. Für die graphische Darstellung von Plasmiden wurde Vektor NTI Deluxe Version 4.0.3 verwendet. Die Visualisierung von Proteinstrukturen erfolgte durch Rasmol 2.6 von Roger Sayle, sowie mit Insight II. Darstellung und Auswertung der Retardierungsgele erfolgte mit dem Programm TINA 2.09 der Firma Raytest, Straubenhardt. Die Modellierungen von Lac Repressor erfolgte mit Insight II & Discover 2.9 (Biosym MSI inc., CA) an einer ESV Workstation.

2.2.6. Plasmide

pBR322	Bolivar <i>et al.</i> , 1977
pWB ₃₃₁ Stop	Oehler <i>et al.</i> , 1994
pWB-I ^d ₃₃₁ Stop	Lehming <i>et al.</i> , 1987
pWB1000	Lehming <i>et al.</i> , 1988
pWB1053	Andrew Barker, unveröffentlicht
pSO110-P1	Oehler <i>et al.</i> , 1990
pSO1010-P1	Oehler <i>et al.</i> , 1990
pLDR8	Diederich <i>et al.</i> , 1992
pLDR12	Assmann, 1992
pACYC184	Chang & Cohen, 1978; Rose, 1988
pFP2	Derivat von pAS8 (Simons <i>et al.</i> , 1984)
pRBP-HP	Andrew Barker, unveröffentlicht (siehe auch Abschnitt 2.3.8)

2.2.7. Lac Repressor exprimierende Plasmide

Die Expressionsplasmide, die für 90 x I⁺ codieren, basieren alle auf dem Plasmid pWB1000 (Lehming *et al.*, 1988)(Abbildung 11). Es verfügt über den ColEI-*Origin of replication* aus pBR322 (Bolivar *et al.*, 1977) und ebenfalls über die Ampicillin-Resistenz aus pBR322. Das *lacI*-Gen steht unter der Kontrolle eines synthetischen Promotors (Lehming *et al.*, 1988) und überexprimiert tetrameren Lac Repressor.

Das Expressionsplasmid pWB₃₃₁Stop codiert für dimeren Lac Repressor (Oehler *et al.*, 1994). Die Expression von dimerem Repressor wird durch das Einfügen eines doppelten ochre-Stopcodons an Position 331 des *lacI*-Gens erreicht (Abbildung 11). Die pWB-I^d₃₃₁Stop Plasmide (Lehming *et al.*, 1987) tragen ebenfalls das doppelte Stopcodon an Position 331. Zusätzlich sind die Aminosäuren 14 bis 60 im „headpiece“ des Lac Repressors deletiert (Abbildung 11). Auch das RBP-HP exprimierende Plasmid basiert auf diesem Grundgerüst (siehe auch Abschnitt 2.3.8.). Die Plasmide der pWB1053-Reihe (Andrew Barker, persönliche Mitteilung) sehen im Prinzip genauso aus, lediglich die Ampicillin-Resistenz ist gegen eine Tetrazyklin-Resistenz ausgetauscht worden.

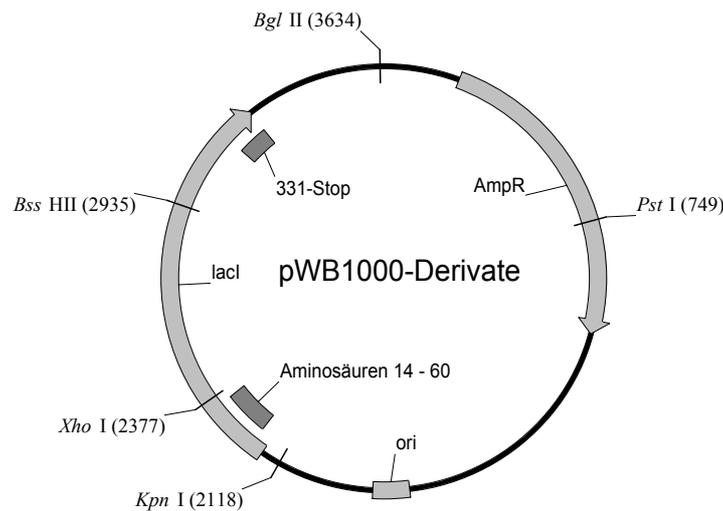


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Plasmids pWB1000 (Lehming *et al.*, 1988) und seiner Derivate. Die angegebenen Restriktionsstellen sind unique, aber nicht alle Einzelschnittstellen sind angegeben. Mit ori = *origin of replication*, lacI = lacI-Gen, AmpR = Ampicillin-Resistenz-Gen.

Die pSO-Plasmide dagegen haben den p15A-*origin of replication* und die Tetrazyklin-Resistenz aus pACYC184 (Chang & Cohen, 1978; Rose, 1988). Zudem liegt das lacI-Gen unter der Kontrolle eines schwächeren aber ebenfalls synthetischen Promotors (Oehler *et al.*, 1990).

2.2.8. Stämme

<i>E. coli</i> CSH33	F' <i>coIV</i> ⁺ B ⁺ <i>trp</i> ⁺ <i>cysB</i> ⁺ <i>thi</i> (Miller, 1972)
<i>E. coli</i> DH5α	F' <i>lac pro A</i> ⁺ B ⁺ <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_K</i> ⁻ , <i>m_K</i> ⁺), <i>supE44</i> , <i>thi</i> , <i>λ</i> ⁻ , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>Nal</i> ^R , <i>relA1</i> , ϕ 80 <i>dlacZΔM15</i> (Hanahan, 1985)
<i>E. coli</i> CSH50Δ1	<i>ara</i> , Δ (<i>lac pro</i>), Δ (<i>galR lys</i>), <i>StrA</i> ^R , <i>thi</i> (v. Wilcken-Bergmann, 1983)
<i>E. coli</i> JMX8634	Δ (<i>lac pro</i>), <i>thi</i> , <i>StrA</i> ^R , <i>trp</i> , ϕ 80 <i>dlacΔ(tonB lacI)</i> (Miller, 1978)
<i>E. coli</i> JMX8634R	JMX8634, <i>recA</i> ⁻ (Dong <i>et al.</i> , 1999)
<i>E. coli</i> JMX8634R-I ⁺ _{tet}	JMX8634, <i>recA</i> ⁻ , I ⁺ _{tet} , <i>cam</i> ^R (diese Arbeit; Spott <i>et al.</i> , 2000)
<i>E. coli</i> JMX8634R-I ⁺ _{D278L-tet}	JMX8634, <i>recA</i> ⁻ , I ⁺ _{D278L-tet} , <i>cam</i> ^R (diese Arbeit; Spott <i>et al.</i> , 2000)

<i>E. coli</i> BMH8117F'	$\Delta(lac\ pro)$, <i>gyrA</i> , NaI^R , <i>thi</i> , <i>supE</i> , λ^- , F' $\Delta(lacI^q-Y)$, <i>pro</i> ⁺ (Oehler <i>et al.</i> , 1990)
<i>E. coli</i> BMH8117F' λO_1	BMH8117F' mit λ -Prophage (Müller, 1995; Müller <i>et al.</i> , 1996)
<i>E. coli</i> BMH8117F' $\lambda O_{id1493,5O_1}$	BMH8117F' mit λ -Prophage (Müller, 1995; Müller <i>et al.</i> , 1996)

2.3. Methoden

Soweit es nicht näher erwähnt wird, wurden Standardmethoden nach Sambrook *et al.* (1989) verwendet.

2.3.1. Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Kleine Mengen (bis 10 μ g) an Plasmid-DNA wurden mit dem High Pure Plasmid Isolation Kit der Firma Roche, Mannheim, größere Mengen mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen, Hilden, nach der Anleitung des jeweiligen Herstellers aus Übernachtskulturen gewonnen.

2.3.2. Enzymkatalysierte Reaktionen

Alle enzymkatalysierten Reaktionen wurden nach Sambrook *et al.* (1989) oder den Protokollen der jeweiligen Hersteller in den für das verwendete Enzym optimierten Puffern durchgeführt.

Nach Kinasierungen wurde zur Inaktivierung der T4-Polynukleotid-Kinase zunächst der Reaktionsansatz für 20 min auf 70°C erhitzt, und danach eine Ethanol-fällung mit $1/10$ Volumen an 3 M $(NH_4)_2$ -Acetat durchgeführt.

2.3.3. Sequenzierung

Die Sequenzierung des *lacI* Gens erfolgte jeweils mit Sequenzprimern nach Sanger *et al.* (1977) mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynucleotiden auf Sequenzern der Firma Applied Biosystems, Pfungstadt, Modell A373 und A377.

Die verwendeten Primer haben folgende Sequenzen:

P1 5' - GTGCACCGCCGCTTTACAGGCTT - 3'
PS1 5' - GTCAGTGAGCGAGGAAGCGG - 3'
P2 5' - GCCGATCAACTGGGTGCCAGCG - 3'
P3 5' - GTGGAGCATCTGGTCGCATTGGG - 3'
P4 5' - CTGGGTGCAATGCGCGCCATTAC - 3'
P5 5' - GATGCTGGTTGCCAACGATC - 3'

Der Primer P1 sequenziert den Gegenstrang bis in die Promotorregion, der Start des Primers ist bei Aminosäure 112 im *lacI*-Gen. Die Primer PS1 sowie P2 bis P5 sequenzieren den Hinstrang. PS1 liegt außerhalb des 90 x I⁺-Promotors des *lacI*-Gens und sequenziert in das Gen hinein. Der Start von P2 ist bei Aminosäure 87, von P3 bei Aminosäure 171 und bei P4 bei Aminosäure 251 im *lacI*-Gen. P5 ist ein Ersatzprimer für P4, wenn in dem Bereich, in dem P4 normalerweise primt, Mutationen vorhanden sind, und sequenziert ab Aminosäure 242 im *lacI*-Gen. Alle Sequenzen überschneiden sich.

Für die Sequenzierung der RBP-Konstrukte wurden folgende Primer verwendet:

RBP0 5' - GACACCATCGCGCTGGTGGTC - 3'
RBP2 5' - GCAGTGGGTAATGCTGTG - 3'
RBP3 5' - GCCAGCCAGCCAGCAGATTTTG - 3'

Zusätzlich wurde noch der Primer PS1 verwendet, der außerhalb des 90 x I⁺-Promotors liegt, und in das Gen hineinsequenziert. Der Start von RBP0 ist bei Aminosäure 2, von RBP2 bei Aminosäure 70 und von RBP3 bei Aminosäure 158 von RBP.

2.3.4. Kompetente Zellen

Kompetente *E. coli* Zellen wurden nach der Methode von Hanahan (1983), elektrokompente *E. coli* Zellen nach der Methode von Dower *et al.* (1988) hergestellt.

2.3.5. Transformation

Die Transformation kompetenter *E. coli* Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte nach der Methode von Hanahan (1983), modifiziert nach Pope und Kent (1996) mit auf 37°C vorgewärmten Platten. Bei Transformationen kompetenter *E. coli* Zellen mit lysogenem Lambda-Phagen wurde auf den Hitzeschock verzichtet, und die Platten wurden nur auf 30°C vorgewärmt. Erholung erfolgte bei Raumtemperatur (RT). Elektrottransformationen erfolgten nach Dower *et al.* (1988).

2.3.6. Elution der DNA aus Agarosegelen

Für die Elution der DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das QiaexII Kit der Firma Qiagen, Hilden, nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

2.3.7. Konstruktion der 1 x I⁺-Stämme

Für die Konstruktion der 1 x I⁺-Insertionsplasmide wurde zunächst die Promotorregion von pWB1000 und pWB1000-D278L mit *KpnI/AatII* ausgeschnitten und die original chromosomale *lacI*-Promotorregion (Calos, 1978; Blattner *et al.*, 1997) wurde inseriert. Für den neuen Promotor wurden sechs Oligonukleotide ligiert, mit Hilfe des GELaseTM Agarose Gel-Digesting Kit (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf) aus einem Agarosegel gereinigt und zwischen die *KpnI*- und die *AatII*-sites von pWB1000 und pWB1000-D278L kloniert. Die Sequenz des neuen Promotors ist in Abbildung 12 dargestellt.

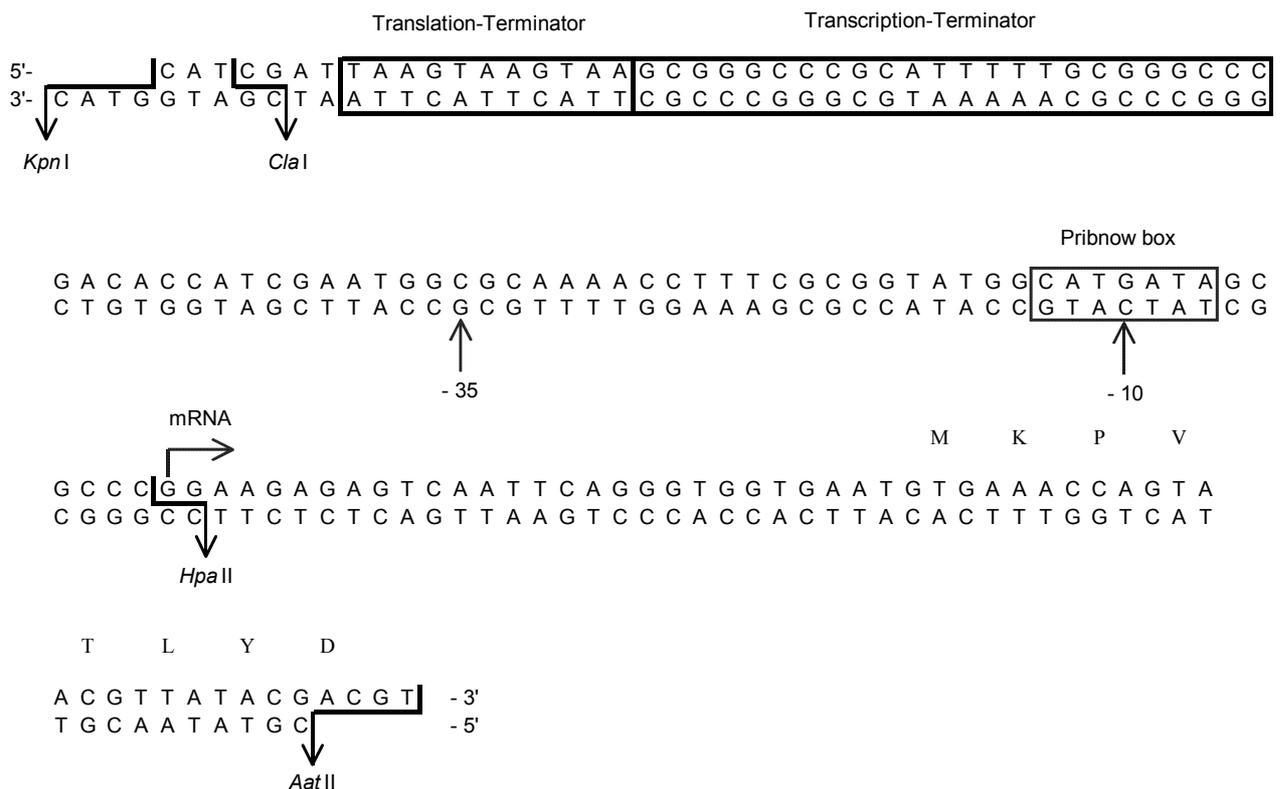


Abbildung 12: Synthetischer Promoter, der die Sequenz des chromosomalen 1 x I⁺-Promotors enthält (Calos, 1978; Blattner *et al.*, 1997). Zusätzlich zu der chromosomalen Promotorsequenz mit -35-Region, Pribnow-Box, Transkriptions- und Translationsstart, enthält der synthetische Promotor stromaufwärts sowohl eine Sequenz die als Transkriptionsterminator, als auch eine Sequenz, die als Translationsterminator fungiert. Diese beiden Sequenzen sollen verhindern, dass die Expression von chromosomalen Genen in der Nähe der Integrationsstelle Einfluss auf die Expression des Lac Repressors nimmt.

Die pWB1000-1 x I⁺-Derivate wurden dann in das Insertionsplasmid pLDR12 umkloniert. pLDR12 ist ein Derivat von pLDR9/10/11 (Diederich *et al.*, 1992) und enthält zusätzlich zu einer Tetrazyklin-Resistenz noch ein Chloramphenicol-Resistenzgen (Assmann, 1992). Die Umklonierung in das Insertionsplasmid erfolgte über das Einsetzen des *Cla*I (aufgefüllt) – *Bgl*II-Fragments der pWB1000-1 x I⁺-Derivate zwischen die *Xba*I (aufgefüllt) – *Bam*HI – sites des Polylinkers von pLDR12 (Abbildung 13).

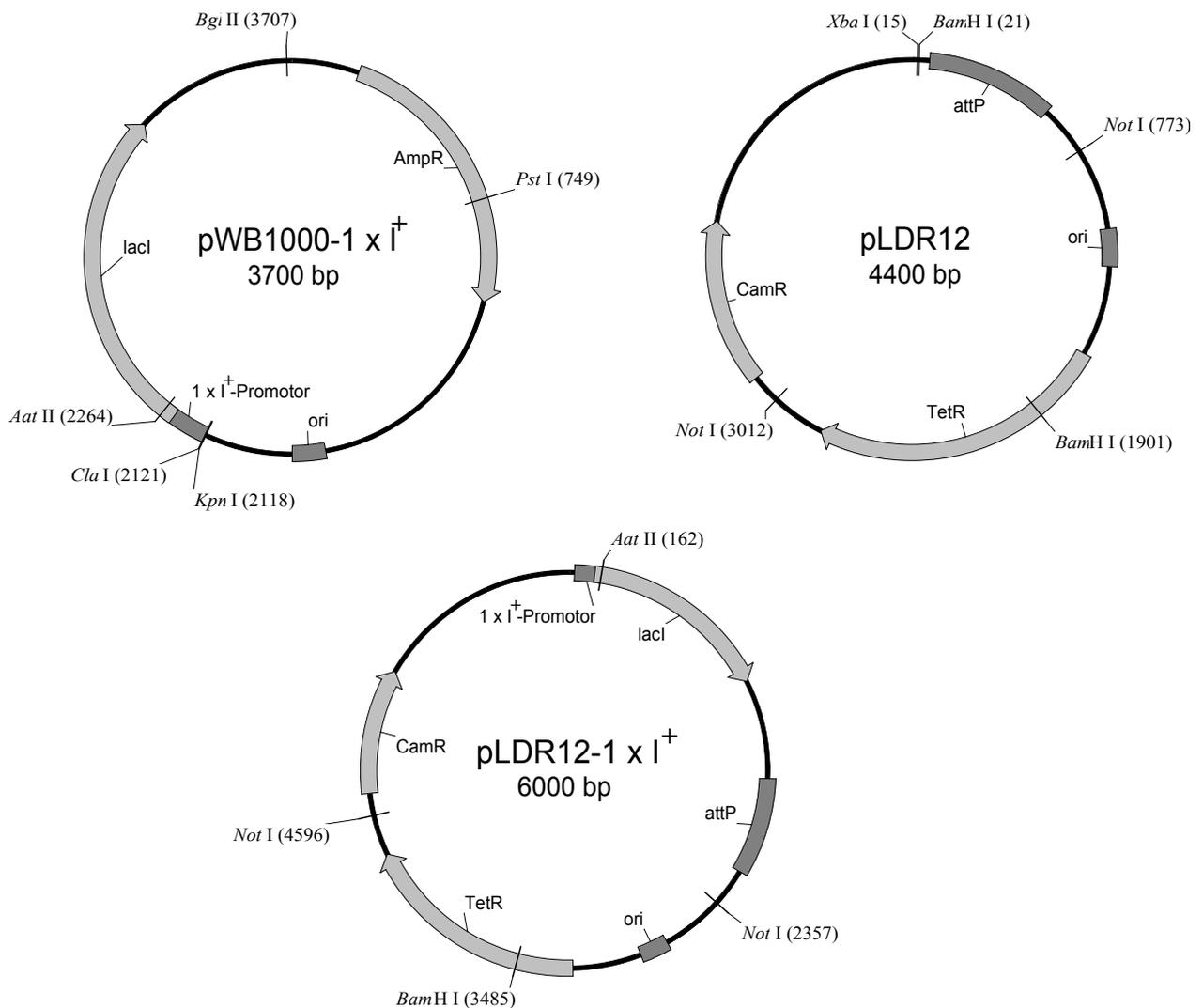


Abbildung 13: Schematische Darstellung der verwendeten Plasmide. Das Plasmid pWB1000-1 x I⁺ ist ein Derivat von pWB1000 (Lehming *et al.*, 1988), das statt des synthetischen 90 x I⁺-Promotors den chromosomalen 1 x I⁺-Promotor enthält (Calos *et al.*, 1978; Blattner *et al.*, 1997; siehe auch Abbildung 12). Das Plasmid pLDR12 ist ein Derivat von pLDR9/10/11 (Diederich *et al.*, 1992) und enthält zusätzlich zu einer Tetrazyklin-Resistenz noch ein Chloramphenicol-Resistenzgen (Assmann, 1992). Das Insertionsplasmid pLDR12-1 x I⁺ resultiert aus der Klonierung des *Cla*I-*Bgl*II-Fragmentes aus pWB1000-1 x I⁺, das den tetrameren Lac Repressor und den 1 x I⁺-Promotor enthält, zwischen die *Xba*I- und *Bam*HI-sites des polylinkers von pLDR12. Gekennzeichnet sind jeweils verschiedene Restriktionsschnittstellen, die für die Klonierung von pLDR12-1 x I⁺ verwendet wurden, bzw. die für die Insertion ins Chromosom von Bedeutung sind. Mit *ori* = *origin of replication*, *lacI* = *lacI*-Gen, *AmpR* = Ampicillin-Resistenz-Gen, *TetR* = Tetrazyklin-Resistenz-Gen, *CamR* = Chloramphenicol-Resistenz-Gen, *attP* = Integrations-Sequenz des Bakteriophagen Lambda.

Alle Konstrukte wurden durch Sequenzierung verifiziert.

Die Konstruktion von JMX8634R-I⁺_{tet} und *E. coli* JMX8634R-I⁺_{D278L-tet} wurde nach der Beschreibung von Diederich *et al.* (1992) durchgeführt. Von dem *E. coli*-Stamm JMX8634R, der bereits das Integrationsplasmid pLDR8 enthielt, wurden elektrokompente Zellen hergestellt. Das Integrationsplasmid pLDR8 kodiert für die Lambda-Integrase. Die pLDR12-Konstrukte wurden mit *NotI* geschnitten, das Fragment, welches das *lacI*-Gen sowie die Chloramphenicol-Resistenz enthält, aber nicht den Replikationsursprung und auch nicht das Tetrazyklin-Resistenzgen, wurde aus einem Agarosegel gereinigt, ligiert, und dann mittels Elektrotransformation in die elektrokompenten Zellen eingebracht. Das jeweilige *lacI*-Konstrukt und die Chloramphenicol-Resistenz wurden von der Lambda-Integrase über die *attP*-site in die chromosomale *attB*-site von JMX8634R eingefügt. Positive Kandidaten konnten als weiße Kolonien auf Chloramphenicol-X-Gal-Platten selektioniert werden, wachsen aber nicht mehr auf Tetrazyklin-Platten. Die positiven Kandidaten wurden mittels Colony-PCR mit Primern auf beiden Seiten der chromosomalen *attB*-site getestet. Die in der Colony-PCR verwendeten Primer *attb*-hin (Sequenz: 5'-GAAAATGTGTTACAGGTTGCTCC – 3') und *attb*-her (Sequenz: 5'-GTTCATTTCCACTCTCTGGCAAGC – 3') liegen 38 bp upstream bzw. 118 bp downstream der *attB*-Site des *E. coli*-Chromosoms. Die Identität der PCR-Produkte wurden über eine Sequenzanalyse verifiziert.

2.3.8. Konstruktion von pRBP-HP

Zur Konstruktion von pRBP-HP wurde das Gen von RBP mittels PCR aus dem *E. coli* Chromosom amplifiziert. Auf die Signal-Sequenz von 23/25 Aminosäuren, die benötigt wird, um das fertige Protein in den periplasmatischen Raum zu transportieren, wurde bei der Klonierung verzichtet.

Lediglich die Nukleotidsequenz, die für das reife Protein codiert von Aminosäure 2 -271, wurde an das „headpiece“ des Lac Repressors von Aminosäure 1 – 61 fusioniert, indem es anstelle des restlichen *lacI*-Gens in das Plasmid pWB1000 (Lehming *et al.*, 1988) kloniert wurde. Daher steht das Fusionsprotein unter der Kontrolle des synthetischen 90 x I⁺-Promotors aus pWB1000 (Lehming *et al.*, 1988). Die schematische Darstellung des Plasmids ist in Abbildung 14 zu sehen.

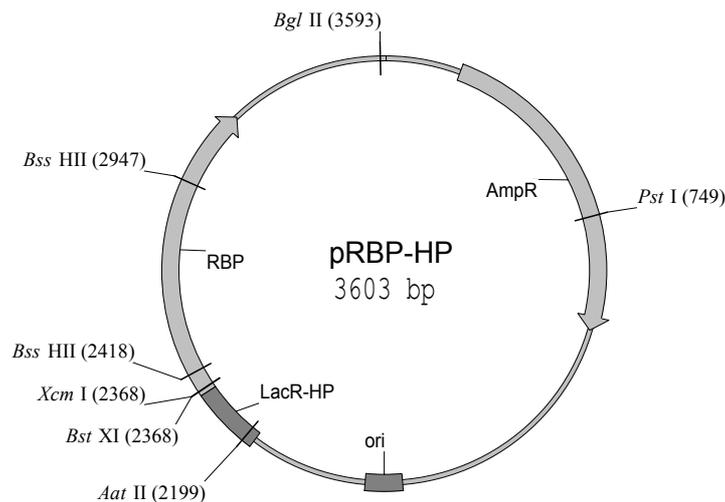


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Plasmids pRBP-HP (Andrew Barker, unveröffentlicht). Teilweise sind die Restriktionsstellen angegeben, die zum Klonieren verwendet wurden. Mit ori = *origin of replication*, LacR-HP = Aminosäure 1 bis 61 des Lac Repressors, RBP = Aminosäuren 2 bis 271 des nativen periplasmatischen ribose bindenden Proteins, AmpR = Ampicillin-Resistenz-Gen.

2.3.9. PCR-Mutagenese

Während die Mutationen innerhalb des *lacI*-Gens größtenteils über Kassettenmutagenese eingeführt wurden, wurden die Mutationen in das Gen für Fusionsprotein RBP-HP mangels Einzelschnittstellen mittels PCR-Mutagenese eingeführt (Kadowaki *et al.*, 1989; Hemsley *et al.*, 1989).

Der Reaktionsansatz von 100 μ l enthält:

100 ng Template (= Plasmid-DNA von pRBP-HP und Derivaten), jeweils 20 pMol PCR-Primer, 50 μ l *Taq* PCR Master Mix der Firma Qiagen, Hilden, aufgefüllt auf 100 μ l Gesamtansatz mit ddH₂O.

Der Gesamtansatz wurde in einem Thermocycler in 30 bis 35 Zyklen amplifiziert. Nach 5 min Denaturierung bei 95°C wurde jeder Zyklus folgendermaßen durchgeführt: 1 bis 1 ½ min Annealing bei 48 bis 55°C (je nach Primerpaar), 3 min Elongation bei 72°C (1 min Elongation pro 1 kb zu amplifizierende DNA), 1 min Denaturierung bei 95°C. Abschließend wurde noch eine Elongationsphase von 10 min bei 72°C durchgeführt, um unvollständige PCR-Produkte zu vervollständigen.

Die verwendeten Primer waren zur Plasmidsequenz des RBP-HP-Konstruktes komplementär, und enthielten in der Regel am 5'-Ende die einzufügende Mutation (siehe auch Abbildung 15), und wenn möglich auch eine neue Restriktionsschnittstelle, um eine Überprüfung der Klonierung zu vereinfachen.

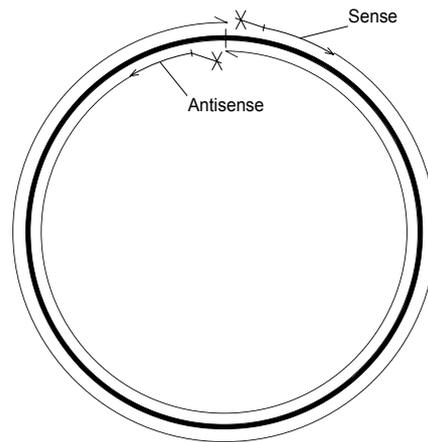


Abbildung 15: Schematische Darstellung der PCR-Mutagenese. Die verwendeten Primer enthielten an ihrem 5'-Ende die einzufügenden Mutationen, und waren ansonsten zur Plasmidsequenz komplementär. Es wurde jeweils das gesamte Plasmid amplifiziert und dann blunt end ligiert.

Die PCR-Produkte wurden anhand eines 1,5%igen Agarosegels kontrolliert. Um die Ligationseffizienz zu erhöhen wurde anschließend die restliche Template-DNA in dem Reaktionsansatzes mithilfe des Restriktionsenzym *DpnI* über Nacht abgebaut. *DpnI* schneidet spezifisch nur methylierte DNA, d. h. die Template-DNA wird geschnitten, das unmethylierte PCR-Produkt aber nicht (Lacks & Greenberg, 1975; 1977; Geier & Modrich, 1979). Im Anschluß wurde das PCR-Produkt mit dem PCR Purification Kit der Firma Roche gereinigt, kinasiert (siehe auch Abschnitt 2.3.2), und ligiert.

2.3.10. Messung der spezifischen β -Gal-Aktivität in *E. coli*

Die Messung der spezifischen β -Galaktosidase-Aktivität der einzelnen Lac Repressor Mutanten erfolgte nach Miller (1972). Die Bakterien wurden bis zu OD_{600} von 0,3 bis 0,7 in Minimalmedium herangezogen. Statt des Aufschlusses der *E. coli* Zellen mit Toluol wurde eine Minute bei 60 W und einer Wiederholungsrate von 0,7 sec sonifiziert.

Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte von 2 Messungen aus 3 unabhängigen Kolonien.

2.3.11. Präparation von Lac Repressor Rohextrakten

Modifiziert nach Alberti *et al.* (1991).

Wildtyp Lac Repressor und die zu testenden Mutanten wurden in dem *E. coli* Stamm CSH50 Δ 1 mit 90 x I⁺ überexprimiert. Die Zellen aus einer 200 ml Übernachtskultur wurden für 10 min bei 10000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Resuspendiert wurde in 2 ml 4°C kaltem Rohextraktbuffer pro g Pellet. Der Rohextrakt-/Bindungspuffer hat folgende Zusammensetzung: 40 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM KCl, 0,1 mM DTT, 5% Glycerin, 1

mM EDTA. Für den Zellaufschluss wurde 2 min bei 60 W und einer Wiederholungsrate von 0,7 sec sonifiziert. Zum Abtrennen der Zelltrümmer wurde der frische Rohextrakt erneut für 30 min bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert, und konnte danach für Retardierungsgele eingesetzt werden.

Die Rohextrakte der RBP-Konstrukte wurden auf dieselbe Art aufbereitet.

2.3.12. Retardierungsgele

Modifiziert nach Oehler *et al.* (1990).

Die verwendeten Targets sind in Abbildung 16 dargestellt. Sie enthalten jeweils einen G-Überhang, der mit Hilfe der Polymeraseaktivität des Klenow-Enzyms unter Verwendung von α -(32 P)-dCTP aufgefüllt und radioaktiv markiert wurde. Gereinigt wurden die Fragmente mit dem DyeEx Spin Kit der Firma Qiagen, Hilden, nach dem Protokoll des Herstellers.

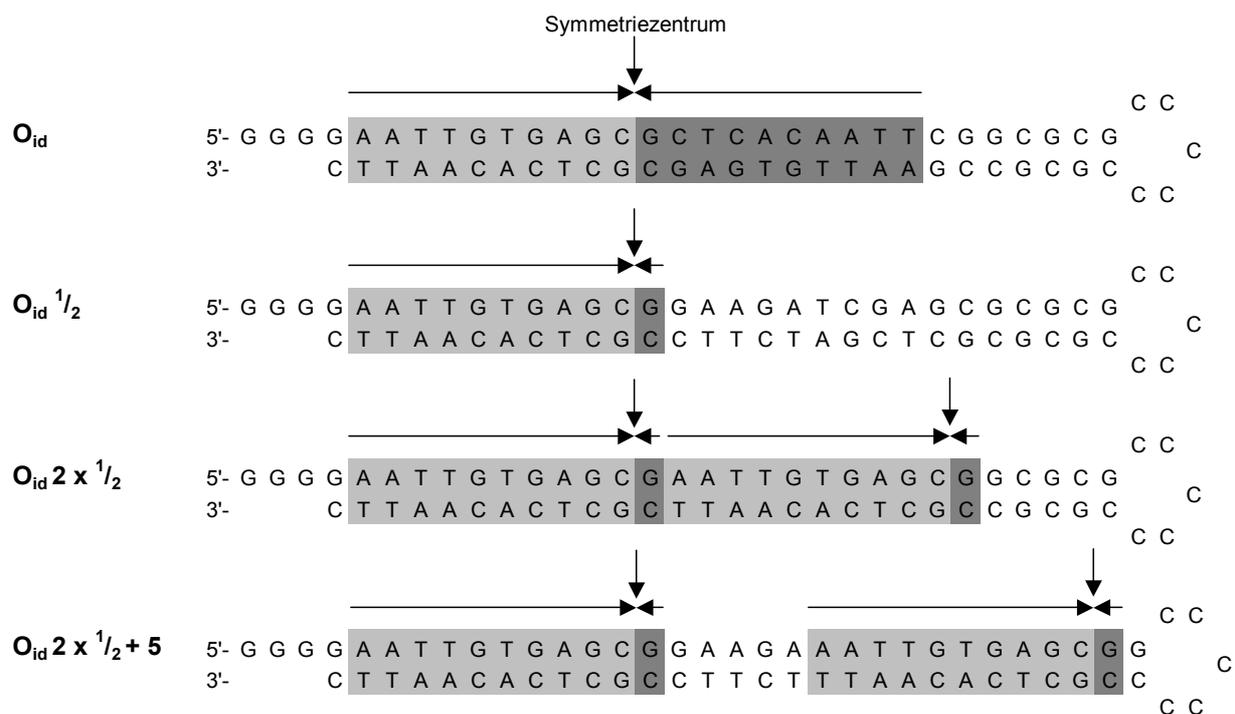


Abbildung 16: Die für Retardierungsgele verwendeten Hairpin-Targets. Für die meisten Retardierungsgele wurde lediglich O_{id} (oberste Zeile) verwendet. Für die Retardierungsgele mit den tightbinder-Mutanten in Kombination mit L251A wurden ebenfalls diverse Operator-Halbseiten-Targets verwendet. Die eine Seite des idealen Operators ist hellgrau unterlegt, die andere Seite dunkelgrau, das Symmetriezentrum ist zusätzlich durch einen Pfeil gekennzeichnet. In O_{id} ¹/₂ ist zusätzlich zu einer perfekten Halbseite die erste Base der zweiten Halbseite enthalten. In O_{id} 2 x ¹/₂ ist 2 mal die perfekte erste Halbseite, und jeweils die erste Base der zweiten Halbseite enthalten. In O_{id} 2 x ¹/₂ + 5 ist 2 mal die perfekte erste Halbseite, und jeweils die erste Base der zweiten Halbseite mit einem Spacing von 5 bp dazwischen enthalten. Die Basenaustausche, die den idealen Operator zerstören, wurden nach den Studien von Sartorius *et al.* (1989, 1991) ausgewählt.

Im Reaktionsansatz wurden die Operatorfragmente jeweils in einer Konzentration von 10^{-9} M eingesetzt und mit Lac Repressor Rohextrakt in der gewünschten Konzentration vermischt. Eine 1:10 Verdünnung des Rohextraktes entspricht ungefähr einer Proteinkonzentration von 10^{-8} M. Als Kompetitor wurden 0,5 μ g polydIdC eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde 5 min auf Eis inkubiert, und danach wurden 5 μ l Farbmarker bestehend aus 15 % Ficoll, 0,06 % Bromphenolblau, und 0,06 % Xylencyanol in Rohextrakt-/Bindungspuffer hinzugefügt.

Bei den Retardierungsexperimenten zum Test auf Heterodimere wurden die unverdünnten Rohextrakte der zu testenden Mutanten im Verhältnis 1:1 gemischt, und für $\frac{1}{2}$ h auf Eis inkubiert.

Die Reaktionsansätze der RBP-Konstrukte wurden jeweils doppelt angesetzt: einmal mit und einmal ohne D-Ribose. In den Reaktionsansätzen mit D-Ribose wurde D-Ribose in einer Endkonzentration von 1 % zugegeben.

25 μ l des Reaktionsansatzes wurden auf ein 6 %iges nicht denaturierendes PAA-Gel aufgetragen. Das Gel war für ca. 1 h bei einer Spannungsbegrenzung von 12 V/cm vorgelaufen. Als Laufpuffer diente 0,5 x TBE. Die Retardierungsgele mit den RBP-Konstrukten wurden jeweils mit und ohne D-Ribose laufen gelassen. D-Ribose wurde dabei dem Laufpuffer in einer Endkonzentration von 1 % zugesetzt, und der Laufpuffer über eine Pumpe in Bewegung gehalten. Unter denselben Bedingungen erfolgte jeweils die Auftrennung der Protein-DNA-Komplexe für ca. $1\frac{1}{2}$ h. Für die Autoradiographie wurden die Gele auf Whatman 3MM Papier getrocknet und dann mit Imaging-Platten des Phosphoimagersystems (FUJI BAS 1000, Raytest, Straubenhardt) für 1 bis 3 h exponiert.

2.3.13. Reinigung von Lac Repressor

Die 90 x I⁺-Plasmide mit den Lac Repressor Varianten wurden in den *E. coli* Stamm BMH8117 transformiert, dort exprimiert und nach dem Protokoll von Barker *et al.* (1998) gereinigt. Dazu wurden für die dimeren Lac Repressor Varianten Modifikationen der Pufferkonzentrationen vorgenommen, wie in Dong *et al.* (1999) beschrieben. Alle Proteinreinigungen wurden verifiziert, indem aus der Kultur eine Plasmid-Minipräparation gemacht wurde, und das *lacI* Gen sequenziert wurde.

3. Ergebnisse

3.1. Die bisherigen Analysen der Dimerisierungsregion des Lac Repressors

Wie bereits erwähnt (siehe Abschnitt 1.2.4.3.) besteht die Dimerisierungsoberfläche von Lac Repressor aus 15 Aminosäuren in drei Helices (Lewis *et al.*, 1996; Suckow *et al.*, 1996; Pace *et al.*, 1997). Zur Analyse der Dimerisierungsspezifität wurden verschiedene Mutationen in die Dimerisierungsregion des Lac Repressors eingefügt, und die daraus resultierenden Proteine analysiert (F. Dong, 1997; O. Zimmermann, 1997; S. Spott, 1998). Während F. Dong hauptsächlich versucht hat durch Einzel- und Mehrfachsubstitutionen das LacR „interface“ in ein GalR „interface“ zu überführen und dadurch eine Spezifitätsänderung zu erreichen, hat O. Zimmermann die Dimerisierungsregion anhand von Einzelsubstitutionen charakterisiert. Dabei wurden für die Austausch soweit möglich Aminosäuren gewählt, die bei anderen verwandten Proteinen an der entsprechenden Position vorkommen. Im Rahmen der vorausgegangenen Diplomarbeit wurden diese bereits vorhandenen Mutationen *in vivo* charakterisiert. Diese Analyse bildet die Basis dieser Arbeit.

3.1.1. Das Testsystem

Die Fähigkeit zur Tetramerisierung kann möglicherweise Effekte durch Mutationen in der Dimerisierungsoberfläche überdecken. Um Komplikationen durch die Tetramerisierung zu vermeiden, wurde ein aktiver dimerer Lac Repressor (pWB₃₃₁Stop) verwendet (Oehler *et al.*, 1994), dem die C-terminalen „heptad repeats“ fehlen. Dieser Lac Repressor wurde überexprimiert (90 x I⁺). Um die zahlreichen Lac Repressor Mutanten in der Dimerisierungsoberfläche zu testen, wurden zwei verschiedene Strategien genutzt. Zuerst wurde anhand eines *in vivo* Systems geprüft, ob der mutierte Lac Repressor noch in der Lage ist Homodimere zu bilden. Können keine Homodimere mehr gebildet werden, kann die Mutante trotz Überexpression das *lac* Operon nicht mehr reprimieren. Für diesen Test wurde der Genotyp I⁻p⁺O⁺Z⁺Y⁺ gewählt.

In einem zweiten Test wurden die Mutanten auf ihre Fähigkeit getestet, Heterodimere mit Wildtyp Lac Repressor zu bilden. Dieser sogenannte Negative Dominanz Test (Müller-Hill *et al.*, 1968) funktioniert folgendermaßen: Man verwendet den Genotyp I⁻p⁺O⁺Z⁺Y⁺, der den Wildtyp Lac Repressor exprimiert, d. h. 10 Tetramere bzw. 40 Untereinheiten pro Zelle. In diesen Hintergrund fügt man ein Plasmid mit der Dimerisierungsmutante ein, der sowohl die C-terminalen „heptad repeats“ fehlen als auch das „headpiece“ mit der DNA-bindenden Domäne. Zusätzlich wird die Mutante überexprimiert (90 x I⁺). Kann der Wildtyp Lac

Repressor mit der Mutante keine Heterodimere bilden, so wird das chromosomale *lac* Operon normal reprimiert. Heterodimerisiert der Wildtyp Lac Repressor aber mit der Dimerisierungsmutante, so kommen keine intakten Tetramere mehr in der Zelle vor, und das chromosomale *lac* Operon wird abgelesen und β -Galaktosidase wird exprimiert. Je nach der Fähigkeit zur Heterodimerisierung findet Repression in Abstufungen statt (siehe Abbildung 17).

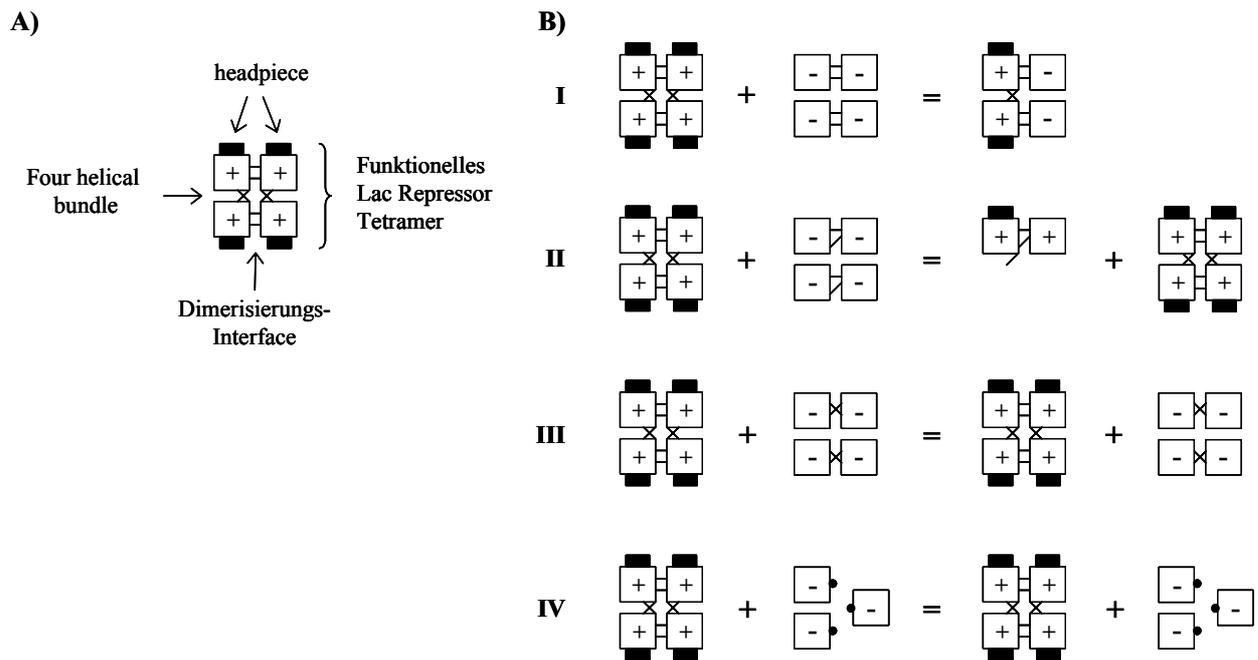


Abbildung 17: Schematische Darstellung der negativen Dominanz. A) Schematische Darstellung eines Wildtyp Lac Repressor Tetramer inklusive „headpiece“ und „four-helical-bundle“. B) Die verschiedenen Stufen der negativen Dominanz. Dargestellt ist jeweils ein Wildtyp Lac Repressor Tetramer mit „headpiece“ und „four-helical-bundle“ sowie eine Dimerisierungsmutante, die ohne „headpiece“ nicht mehr an DNA binden kann und ohne „four-helical-bundle“ nicht mehr tetramersieren kann.

I. Die Mutante in der Dimerisierungsregion ist in der Lage mit Wildtyp Lac Repressor zu dimerisieren. Dadurch entstehen nur nicht-funktionelle Dimere und möglicherweise Tetramere in der Zelle, die nicht mehr in der Lage sind das *lac* Operon zu reprimieren. Dies ist definiert als 100 % negative Dominanz.

II. Die Mutante in der Dimerisierungsregion ist trotz Austausch noch in der Lage mit Wildtyp Lac Repressor zu dimerisieren, allerdings nicht mehr gut. Es entstehen sowohl Heterodimere zwischen dem Wildtyp Lac Repressor und der Dimerisierungsmutante als auch funktionelle Wildtyp Lac Repressor Tetramere. Damit ist die Repression des *lac* Operons wenigstens zum Teil gegeben.

III. Die Mutante in der Dimerisierungsregion bildet Dimere mit sich selbst, aber das „interface“ ist so stark verändert, dass keine Heterodimerisierung mit Wildtyp Lac Repressor mehr stattfinden kann. In der Zelle liegen daher nur funktionelle Wildtyp Lac Repressor Tetramere vor, und das *lac* Operon ist voll reprimiert. Dieser Zustand ist definiert als 0 % negative Dominanz.

IV. Der Phänotyp dieser Variante gleicht dem von III. Man erhält keine negative Dominanz, da die Mutante in der Dimerisierungsregion so stark verändert ist, dass sie weder in der Lage ist mit sich selbst zu dimerisieren noch mit Wildtyp Lac Repressor.

Bei vollständiger negativer Dominanz (100 %) erhält man in diesem Testsystem 0 % Repression des *lac* Operons, d. h. die Strukturgene werden exprimiert. Liegt vollständige Repression (100 %) des *lac* Operons vor, so findet keine negative Dominanz statt (0 %). Erhält man im Test für negative Dominanz eine Repression von 50 %, so würde das bedeuten, dass statistisch gesehen noch fünf intakte Tetramere vorhanden sind, die in der Lage sind, normal zu reprimieren. In diesem Fall werden nur 20 der Untereinheiten des Wildtyp Lac Repressor von der Mutante in der Dimerisierungsregion, von der durch die Überexpression immerhin ca. 3600 Untereinheiten in der Zelle vorliegen, gebunden. Eine relative Repression von 50 % und damit auch 50 % negative Dominanz bedeuten in diesem Testsystem also, dass fast gar keine Heterodimerisierung stattfindet.

Die ideale Spezifitätsänderung in Folge eines Austauschs in der Dimerisierungsoberfläche ist folgendermaßen definiert: Sie dimerisiert mit sich selbst, d. h. sie reprimiert unter gleichen Bedingungen wie Wildtyp Lac Repressor das *lac* Operon zu 100 %. Zusätzlich ist die Dimerisierungsoberfläche durch den Austausch so stark verändert, dass keine Heterodimerisierung mit Wildtyp Lac Repressor mehr möglich ist, d. h. im Test auf negative Dominanz erhält man ebenfalls 100 % Repression bzw. 0 % negative Dominanz. Eine solche Spezifitätsänderung würde Aufschluss über den Dimerisierungs-Mechanismus von Lac Repressor geben.

Mit diesen beiden Testsystemen wurden sowohl die bereits vorhandenen Mutanten als auch die auf der Basis der bekannten Daten neu entwickelten Austausche in der Dimerisierungsregion analysiert.

3.1.2. Analyse der Mutanten im Monomer-Monomer-Interface

In Tabelle 1 sind die Werte für alle Dimerisierungsmutanten zusammengefasst, die in beiden Testsystemen analysiert wurden. In Abbildung 18 sind dieselben Werte, die die Fähigkeit der einzelnen Mutanten zur Homodimerisierung mit sich selbst und zur Heterodimerisierung mit Wildtyp Lac Repressor beschreiben, graphisch gegeneinander aufgetragen.

Die Mutante mit dem Einzelaustausch D278 zu Leucin zeigt in den beiden Testsystemen die Eigenschaften, die man von einer idealen Spezifitätsänderung erwarten würde. Die nähere Analyse dieser Mutante folgt in Abschnitt 3.2.

Die Bedeutung, die der Position 278 zukommt, wird auch durch die Analyse aller weiteren Mutanten von D278 deutlich. Tatsächlich zeigen alle Austausche an dieser Position so gut wie keine Heterodimerisierung mit Wildtyp Lac Repressor.

90 x I ⁺	Fähigkeit zur Homodimerisierung Repression in JMX8634R (I ⁺ O ⁺ Z ⁺)	Fähigkeit zur Heterodimerisierung Repression in CSH33 (I ⁺ O ⁺ Z ⁺)	90 x I ^d
	%	%	
ohne Lac Repressor	0%	100%	ohne Lac Repressor
+ 1mM IPTG	0,1%	0%	+ 1mM IPTG
Wildtyp	100%	1,9%	Wildtyp
A222S	68%	5%	A222S
M223A	81%	4%	M223A
M223S	106%	6%	M223S
F226W	97%	7%	F226W
L251A	0,5%	100%	L251A
L251C	8%	64%	L251C
L251M	49%	67%	L251M
R255G	9%	39%	R255G
R255H	8%	34%	R255H
R255Y	18%	48%	R255Y
T258K	32%	29%	T258K
T258Q	70%	3%	T258Q
E259D	45%	15%	E259D
D278A	48%	50%	D278A
D278I	20%	71%	D278I
D278L	97%	85%	D278L
D278V	11%	87%	D278V
S280R	56%	4%	S280R
C281A	10%	98%	C281A
C281F	29%	0,5%	C281F
C281Y	36%	0,6%	C281Y
Y282F	106%	1%	Y282F
Y282L	1%	97%	Y282L
M223A/F226W	53%	30%	M223A/F226W
M223A/C281Y	34%	67%	M223A/C281Y
M223S/C281Y	28%	40%	M223S/C281Y
F226W/C281Y	20%	1%	F226W/C281Y
L251M/Y282F	30%	59%	L251M/Y282F
S280R/C281Y	13%	0,9%	S280R/C281Y
C281Y/Y282F	89%	0,5%	C281Y/Y282F
C281Y/Y282L	3%	51%	C281Y/Y282L
M223A/D278V/C281Y	23%	107%	M223A/D278V/C281Y
M223S/D278V/C281Y	6%	94%	M223S/D278V/C281Y
L251M/C281Y/Y282F	16%	27%	L251M/C281Y/Y282F
D278I/C281Y/Y282L	33%	89%	D278I/C281Y/Y282L
M223S/R255G/C281Y/I283R	12%	95%	M223S/R255G/C281Y/I283R

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der relativen Repressionswerte in % der in Abbildung 18 dargestellten Mutanten. In der linken Spalte sind die Werte für die Möglichkeit zur Homodimerisierung zu sehen. Eine Repression von 100 % bedeutet, dass die Mutante fast ausschließlich aus Dimeren besteht. Die relative Repression von 100 % in *E. coli* JMX8634R durch Wildtyp Lac Repressor bedeutet eine absolute Repression von 1700 und eine spezifische Aktivität der β -Galaktosidase von 2,1 im reprimierten Zustand. Im nicht reprimierten Zustand beträgt die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität 3600. Daher bedeutet eine relative Repression von 0,5 % in *E. coli* JMX8634R mit der Mutante L251A eine absolute Repression von 9 und eine spezifische Aktivität von 390.

In der rechten Spalte sind die Werte für die Heterodimerisierungsfähigkeit der Mutanten in der Dimerisierungsregion mit Wildtyp Lac Repressor aufgeführt. In diesem Test bedeutet 100 % Repression, dass die entsprechende Mutante nicht in der Lage ist, mit Wildtyp Lac Repressor zu heterodimerisieren. Die relative Repression von 100 % in *E. coli* CSH33 bedeutet eine absolute Repression von 1100 und eine spezifische β -Galaktosidase-Aktivität von 6,3 im reprimierten Zustand. Im durch 1 mM IPTG vollständig induzierten Hintergrund beträgt die spezifische Aktivität der β -Galaktosidase 6800. Daher bedeutet eine relative Repression von 1,9 % in *E. coli* CSH33 mit dem Wildtyp Lac Repressor ohne DNA-bindende Domäne eine absolute Repression von 21 und eine spezifische β -Galaktosidase-Aktivität von 320.

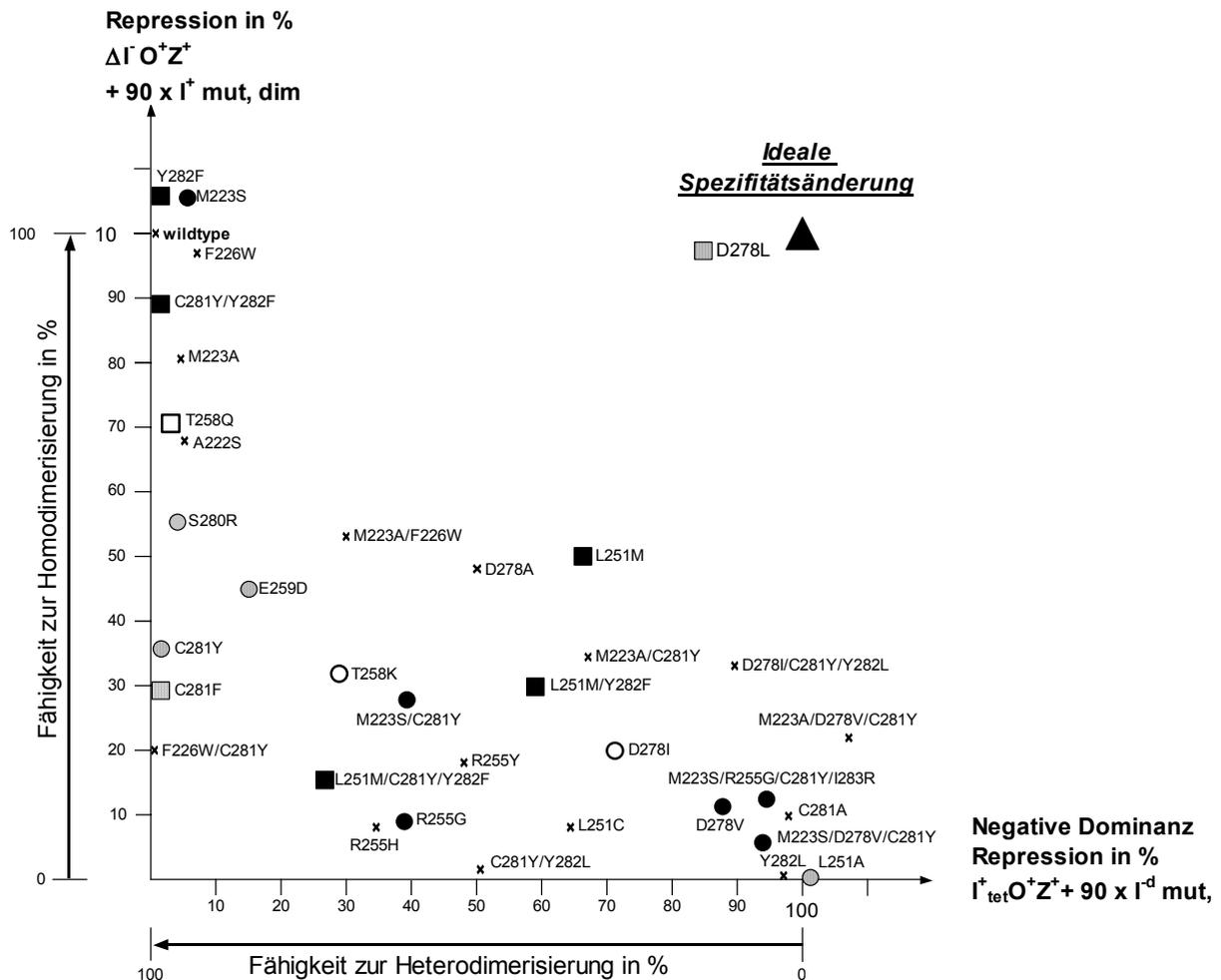


Abbildung 18: Graphische Darstellung von der Fähigkeit der Dimerisierungsmutanten von Lac Repressor *in vivo* Homo- und Heterodimere zu bilden. Die relative Repression in % bezieht sich auf die Repression von Wildtyp Lac Repressor, die auf 100 % gesetzt wurde. Auf der y-Achse ist die relative Repression dargestellt, die die Ausbildung von Homodimeren durch die Mutanten in der Dimerisierungsregion von Lac Repressor beschreibt. Auf der x-Achse ist die Negative Dominanz dargestellt, das heißt die Fähigkeit der Mutanten Heterodimere mit Wildtyp Lac Repressor auszubilden. Starke Repression in diesem Test bedeutet keine Heterodimerisierung zwischen dem chromosomal exprimierten Wildtyp Lac Repressor und der überexprimierten Mutante in der Dimerisierungsregion, der die DNA-bindende Domäne fehlt. Niedrige Repression in diesem Test bedeutet komplette Titration des Wildtyp Lac Repressor durch die Mutante (negative Dominanz). Die Lac Repressor Mutante mit einer Spezifitätsänderung in der Dimerisierung (\blacktriangle) würde als Homodimer zu 100 % reprimieren und keine Heterodimere mit dem Wildtyp eingehen, das heißt 100 % Repression im Test auf Negative Dominanz. Die meisten Reste in der Dimerisierungsregion wurden in Homologie zu anderen Mitgliedern der LacR-GalR-Familie basierend auf dem Alignment von Suckow *et al.* (1996) ausgetauscht. Die homologen Substitutionen sind folgendermaßen gekennzeichnet: \bullet GalR, \circ GalS, \odot GalR/GalS, \blacksquare PurR, \square RafR, \blacksquare CytR. Ein Kreuz (X) bedeutet, dass keine Homologie zu einem Mitglied der LacR-GalR-Familie vorliegt.

Die Mutante D278V zeigt 87 %, D278I zeigt 71 % und D278A zeigt immerhin noch 50 % Repression im Test auf negative Dominanz. Diese Austausche stören aber die Homodimerisierung, so reprimiert D278V lediglich mit 11 % und D278I mit 20 % (siehe auch Tabelle 1 und Abbildung 18). Daher erfüllen sie nicht die Kriterien, die an eine Spezifitätsänderung gestellt werden. Die Mutante D278A mit einer Repression von 48 %

allerdings kommt recht nah an die Definition der Spezifitätsänderung heran, obwohl man annehmen muss, dass bei einer Repression von 50 % nur die Hälfte des vorhandenen Proteins als Dimer vorliegt.

Eine weitere Position, der anscheinend eine entscheidende Rolle innerhalb der Dimerisierung zukommt, ist Y282. Bereits früher konnte gezeigt werden, dass diese Position sehr empfindlich auf Austausche reagiert (Schmitz *et al.*, 1976; Chakerian & Matthews, 1991; Daly & Matthews, 1992; Chen & Matthews, 1992; Markiewicz *et al.*, 1994; Suckow *et al.*, 1996). Auch in dieser Arbeit wurden mehrere Austausche an dieser Position eingefügt, die alle in dem Verlust der Dimerisierungsfunktion resultierten (nur die Mutante Y282L ist in Tabelle 1 und Abbildung 18 enthalten). Lediglich die Substitution von Tyrosin durch Phenylalanin (Y282F) ist neutral. Die Mutante Y282F repräsentiert als Homodimer wie Wildtyp Lac Repressor und zeigt volle negative Dominanz (siehe auch Tabelle 1 und Abbildung 18). Der Phänotyp von Y282F lässt darauf schließen, dass für die Funktion der Position 282 lediglich die sterische Anordnung und Ausrichtung der Seitenkette von Bedeutung ist, nicht aber die funktionelle OH-Gruppe.

Nahezu im Zentrum des Dimerisierungsinterfaces in der Mitte der zweiten Helix liegt die dritte Position, die von enormer Wichtigkeit für die Dimerisierung von Lac Repressor zu sein scheint, L251. Die Seitenkette von L251 ist in Richtung des anderen Monomers ausgerichtet und wie bereits gezeigt wurde, werden nur zwei von zwölf möglichen Austauschen (und zwar L251A und L251C) an dieser Position im Tetramer toleriert (Suckow *et al.*, 1996; Pace *et al.*, 1997). Für eine dieser Mutanten L251A wurde im Detail gezeigt, dass sie auch bei hohen Konzentrationen in Lösung monomer ist (Dong *et al.*, 1999). Dasselbe scheint auch für den Austausch L251C zuzutreffen (siehe auch Tabelle 1 und Abbildung 18). Beide Mutanten zeigen keine Heterodimerisierung mit Wildtyp Lac Repressor und kaum Repression als Homodimer. Weitere Analysen der Mutante L251A folgen in Abschnitt 3.3. Trotzdem ist aus den Untersuchungen an dieser Position eine Mutante, und zwar L251M, hervorgegangen, die nicht von Suckow *et al.* (1996) untersucht wurde. L251M repräsentiert als Homodimer mit 50 % und zeigt mit 70 % Repression im Test auf Heterodimerisierung mit Wildtyp Lac Repressor so gut wie keine negative Dominanz (siehe auch Tabelle 1 und Abbildung 18). Zusammen mit D278A kommt L251M der Spezifitätsänderung D278L am nächsten, was zusätzlich die Bedeutung dieser beiden Positionen für die Dimerisierung unterstreicht.

Wenn man Abbildung 18 betrachtet, so gibt es einige Mutanten, die aus den bisher beschriebenen Kategorien herausfallen. Betrachtet man die weiteren Einzelaustausche der 15 als dimerisierungsrelevant beschriebenen Positionen, so fällt eine Reihe von Mutanten auf, die

noch relativ hohe Repressionswerte, 20 bis 100 % in Bezug auf Wildtyp Lac Repressor, als Homodimere zeigen, sowie eine starke negative Dominanz über den Wildtyp, d. h. 0 bis 10 % Repression. Die Möglichkeit zur Heterodimerisierung mit Wildtyp Lac Repressor deutet darauf hin, dass diese Positionen womöglich nicht direkt an der Dimerisierung beteiligt sind, sondern eher strukturelle und stabilisierende Funktion haben. Diese Reste sind A222, M223, F226 in Helix 10, T258 in Helix 11 sowie S280 und C281 in Helix 12 (die Nummerierung der Helices entspricht Lewis *et al.*, 1996). Mutationen an diesen Positionen haben nur dann Auswirkungen auf die Dimerisierungsfähigkeit von Lac Repressor, wenn die strukturelle Anordnung zerstört wird, z. B. durch den Austausch eines geladenen Restes durch einen hydrophoben bzw. umgekehrt. So scheint zum Beispiel die negative Ladung an Position 259 innerhalb der LacR-GalR-Familie stark konserviert zu sein (siehe auch Abschnitt 4.1. und Abbildung 25, Seite 64). Tauscht man nun die Glutaminsäure von Lac Repressor gegen Asparaginsäure aus, so ist kein großer Effekt auf die Dimerisierungseigenschaft der Mutante festzustellen (siehe Tabelle 1 und Abbildung 18). Fügt man stattdessen einen hydrophoben Rest ein, z. B. D259L, D259I und D259A, so ist keine Dimerisierung mehr möglich (Spott, 1998; Kaup, 2001), was vermutlich strukturelle Gründe hat. Den gleichen Effekt hat der Austausch von großen Seitenketten gegen kleine Reste und umgekehrt. So sinkt die Fähigkeit zur Homodimerisierung z. B. bei den Mutante C281F und C281Y, die Fähigkeit zur Heterodimerisierung mit Wildtyp Lac Repressor wird dadurch aber überhaupt nicht beeinträchtigt (siehe Tabelle 1 und Abbildung 18).

Eine weitere Kategorie an Mutanten sind die Mehrfachaustausche in der Dimerisierungsoberfläche (siehe Tabelle 1 und Abbildung 18). Über diese Mutanten kann man zusammenfassend folgendes sagen: 1. Je mehr Austausche in der Dimerisierungsregion enthalten sind, um so mehr nimmt die Fähigkeit zur Homodimerisierung ab; 2. ebenso nimmt die Fähigkeit zur Heterodimerisierung mit Wildtyp Lac Repressor mit der Anzahl der Austausche ab. Beide Beobachtungen sind durchaus nachvollziehbar, da eine erhöhte Anzahl von Austauschen auch eine stärkere Veränderung der Struktur einer Oberfläche zur Folge hat.

3.2. Die Spezifitätsänderung D278L

Nach den beiden *in vivo* Analysen (siehe Abschnitt 3.1.2.) sieht es so aus, als wäre die Mutante D278L die gesuchte Spezifitätsänderung im Monomer-Monomer-Interface. Um zu überprüfen, ob es sich tatsächlich um eine Spezifitätsänderung handelt, wurde ein Experiment durchgeführt, in dem das Testsystem auf negative Dominanz umgekehrt wurde.

3.2.1. Negative Dominanz mit 5 x I⁺_{D278L-331Stop}

Um zu zeigen, dass nicht nur die Mutante D278L nicht negativ dominant über den Wildtyp Lac Repressor ist, sondern auch der Wildtyp nicht negativ dominant über die Mutante, wurde zunächst ein Zwei-Plasmid-System verwendet. Da bereits früher gezeigt wurde, dass der Test auf negative Dominanz nicht funktioniert, wenn man 5 x I⁺ tetrameren Wildtyp Lac Repressor als Grundlage verwendet (Zimmermann, 1997), wurde für diesen Test die 5 x I⁺_{331Stop} Variante als Basis ausgewählt, die von dem Plasmid pSO110P1 codiert wird (Oehler *et al.*, 1990). Für den Hintergrund wurde der *E. coli* Stamm JMX8634R mit dem relevanten Genotyp I^p⁺O⁺Z⁺Y⁺ gewählt. Das zweite verwendete Plasmid codiert für die 90 x I^d_{331Stop} Variante.

Der Wildtyp Lac Repressor sowie die Mutante D278L wurden, soweit sie noch nicht vorhanden waren, jeweils in die entsprechenden Expressionsplasmide umklontiert. Die Ergebnisse des β-Gal-Tests sind in Tabelle 2 dargestellt.

	spezifische β-Galactosidase Aktivität	Repression
ohne LacR	3000	1
5 x I ⁺ _{WT-331Stop}	15	200
5 x I ⁺ _{WT-331Stop} + 1mM IPTG	2700	1
5 x I ⁺ _{WT-331Stop} + 90 x I ^d _{WT331Stop}	31	100
5 x I ⁺ _{WT-331Stop} + 90 x I ^d _{D278L-331Stop}	18	170
5 x I ⁺ _{D278L-331Stop}	130	24
5 x I ⁺ _{D278L-331Stop} + 1mM IPTG	2750	1
5 x I ⁺ _{D278L-331Stop} + 90 x I ^d _{WT331Stop}	170	18
5 x I ⁺ _{D278L-331Stop} + 90 x I ^d _{D278L-331Stop}	180	17

Tabelle 2: β-Gal-Test auf negative Dominanz von 90 x I^d_{331Stop}-Derivaten über 5 x I⁺_{331Stop}-Derivate. Die spezifische Aktivität ist ein Mittelwert aus jeweils 3 Kolonien mit jeweils 2 unabhängigen Messungen. Die Repression ist der Quotient aus der spezifischen Aktivität ohne Repressor und der spezifischen Aktivität mit der jeweiligen Repressorvariante. 5 x I⁺_{331Stop} wird von dem Plasmid pSO110P1 (Oehler *et al.*, 1990), 90 x I^d_{331Stop} wird von dem Plasmid pWB-I^d_{331Stop} (Lehming *et al.*, 1987) codiert.

Deutlich erkennbar ist, dass die negative Dominanz von Wildtyp Lac Repressor ohne „headpiece“ über den Wildtyp Lac Repressor mit „headpiece“ kaum noch gegeben ist. Es sind immer noch 50 % der funktionellen Dimere vorhanden, die das *lac* Operon reprimieren können. Sobald die 90 x I^d_{331Stop} Variante von D278L ebenfalls vorhanden ist, steigt die Repression wieder an. Die Tatsache, dass die negative Dominanz des Wildtyp Lac Repressor

über sich selbst nur mit einem Faktor 2 gegeben ist, beinhaltet, dass dieser Test mit dimerem Lac Repressor als Basis nicht aussagekräftig ist.

Der zweite Punkt, der diese Daten beeinträchtigt, ist das Verhalten der Mutante D278L im $5 \times I_{331\text{Stop}}^+$ Hintergrund. Während die $90 \times I_{331\text{Stop}}^+$ -Mutante das *lac* Operon noch zu 100 % in Bezug auf Wildtyp Lac Repressor reprimiert, geht mit der Reduktion der Repressorkonzentration im $5 \times I_{331\text{Stop}}^+$ Hintergrund auch die Repression runter, nur noch 10 % in Bezug auf 100 % Repression des *lac* Operons durch den Wildtyp Lac Repressor sind vorhanden. Aufgrund dieser niedrigen Grundrepression sind die Effekte, die durch die negative Dominanz entstehen sollten, nicht zu erkennen.

3.2.2. Negative Dominanz mit $1 \times I_{\text{D278L-tet}}^+$

Um zu zeigen, dass es sich bei der Mutante D278L um eine echte Spezifitätsänderung in der Dimerisierung handelt, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, in dem gezeigt wird, dass der Wildtyp Lac Repressor ohne „headpiece“ auch keine Heterodimere mehr mit der Mutante eingehen kann. Zunächst wurde die Mutation D278L in einen tetrameren Hintergrund überführt, und daraufhin unter der Kontrolle eines $1 \times I^+$ -Promotors in die *attB*-site des Stammes *E. coli* JMX8634R inseriert (siehe auch Material und Methoden, Abschnitt 2.3.7.). *E. coli* JMX8634R hat eine Deletion des Lac Repressors, ansonsten aber ein intaktes *lac* Operon. Als Kontrolle wurde ebenfalls das entsprechende chromosomale Konstrukt mit dem Wildtyp Lac Repressor hergestellt.

Die positiven Kandidaten, die die chromosomale Lac Repressor Variante enthielten, zeigten weiße Kolonien auf X-Gal-Chloramphenicol-YT-Platten. Nach der Selektion wurden 3 positive Kandidaten von JMX8634R- $1 \times I_{\text{tet}}^+$ und sowie 2 positive Kandidaten von JMX8634R- $1 \times I_{\text{D278L tet}}^+$ mittels Colony-PCR getestet, ob das Integrat tatsächlich vorhanden ist, und ob es sich um ein Einzelintegrat handelt. Die verwendeten Primer liegen rechts und links der chromosomalen *attB*-Site, so dass man ohne Integrat ein Fragment von ca. 250 bp Länge erhält. Mit Integrat sollte das PCR-Produkt eine Länge von ca. 3800 bp aufweisen. Abbildung 19 zeigt die entsprechenden PCR-Produkte aus der Colony-PCR.

Die PCR-Produkte wurden anschließend durch Sequenzierung des *lacI* Gens überprüft. Die auf diese Weise erhaltenen und verifizierten chromosomalen Konstrukte wurden mit den entsprechenden I^{d} -Plasmiden transformiert, und ihre negative Dominanz wurde mittels β -Gal-Test bestimmt (siehe Tabelle 3).

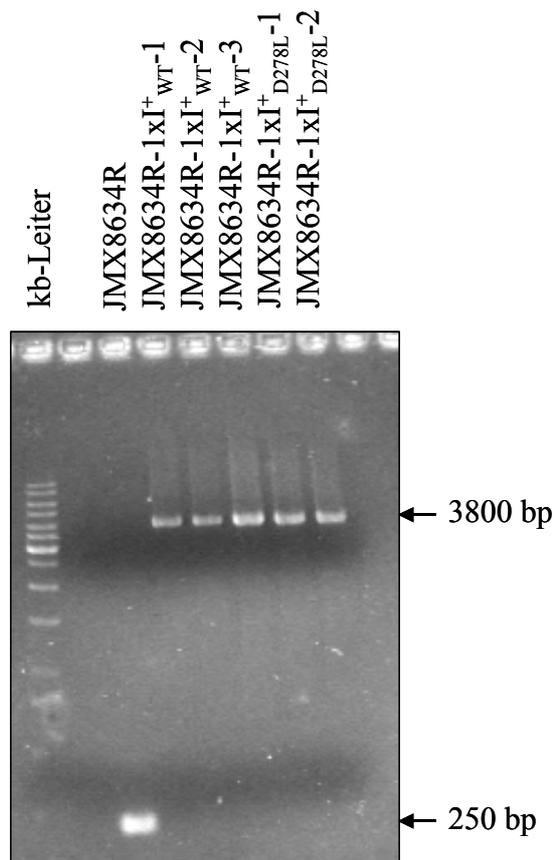


Abbildung 19: Gelfoto der Produkte der Colony-PCR der chromosomalen Konstrukte.

Das chromosomale Konstrukt mit 1 x I^+ Wildtyp Lac Repressor reprimiert 1750fach und ist komplett induzierbar. Der 90 x I^d dimere Wildtyp zeigt hohe negative Dominanz über den 1 x I^+ Wildtyp Lac Repressor auf dem Chromosom, während die 90 x I^d dimere D278L-Mutante so gut wie keine Heterodimerisierung mit dem Wildtyp aufweist, so dass wieder 900fache Repression vorhanden ist.

Das chromosomale Konstrukt mit 1 x I^+ D278L reprimiert 1550fach, also fast genauso gut wie Wildtyp Lac Repressor, und ist ebenfalls komplett induzierbar. Wie erwartet zeigt die 90 x I^d dimere Mutante eine hohe negative Dominanz über das 1 x I^+ D278L auf dem Chromosom, während der 90 x I^d dimere Wildtyp Lac Repressor so gut wie keine Heterodimere mit der D278L-Mutante eingeht, so dass wieder 900fache Repression vorhanden ist.

	spezifische β-Galactosidase Aktivität	Repression
$lacI^- p^+ O^+ Z^+ Y^+ + I_{tet}^+$	2.2	1750
$lacI^- p^+ O^+ Z^+ Y^+ + I_{tet}^+ + 1 \text{ mM IPTG}$	3800	1
$lacI^- p^+ O^+ Z^+ Y^+ + I_{tet}^+ + 90 \times I_{dim}^d$	50	80
$lacI^- p^+ O^+ Z^+ Y^+ + I_{tet}^+ + 90 \times I_{D278L dim}^d$	4.4	900
$lacI^- p^+ O^+ Z^+ Y^+ + I_{D278L tet}^+$	1.9	1550
$lacI^- p^+ O^+ Z^+ Y^+ + I_{D278L tet}^+ + 1 \text{ mM IPTG}$	3000	1
$lacI^- p^+ O^+ Z^+ Y^+ + I_{D278L tet}^+ + 90 \times I_{dim}^d$	3.5	900
$lacI^- p^+ O^+ Z^+ Y^+ + I_{D278L tet}^+ + 90 \times I_{D278L dim}^d$	45	70

Tabelle 3: Test auf negative Dominanz durch Wildtyp Lac Repressor und die Mutante D278L. Die Konstrukte sind ins Chromosom des Stammes JMX8634R integriert mit dem relevanten Genotyp $lacI^- p^+ O^+ Z^+ Y^+$ (Dong *et al.*, 1999) nach der Methode von Diederich *et al.* (1992) wie in Material und Methoden Abschnitt 2.3.7. beschrieben. Die chromosomalen Konstrukte kodieren für tetrameren Lac Repressor unter der Kontrolle des Wildtyp $1 \times I^+$ -Promotors (Calos *et al.*, 1978; Blattner *et al.*, 1997). Die I^d -Plasmide exprimieren 3600 LacR Monomere pro Zelle, sie sind Derivate von $pWB_{331}Stop$, d. h. ihnen fehlt die Tetramerisierungsregion, und sie haben durch eine Deletion der Aminosäuren 14 bis 60 kein funktionelles „headpiece“ (Lehming *et al.*, 1987). Hohe Repression in diesem Test bedeutet wenig bzw. keine Interaktion zwischen dem chromosomalen LacR und der I^d -Variante; niedrige Repressionswerte deuten auf eine Titration des chromosomalen LacR durch die LacR-Variante ohne „headpiece“ hin. Die spezifische β-Galaktosidase-Aktivität ist jeweils ein Mittelwert aus drei Kolonien und zwei voneinander unabhängigen Messungen. Es wurden jeweils zwei voneinander unabhängig hergestellte chromosomale Konstrukte verwendet.

3.3. Die monomere Mutante L251A

Die Position L251 nimmt eine zentrale Stellung im Monomer-Monomer-Interface ein. Ziemlich genau in der Mitte der Helix 11 (nach Lewis *et al.*, 1996), der 2. Helix des Dimerisierungsinterface von Lac Repressor, ist die Seitenkette in Richtung des anderen Monomers ausgerichtet. Durch diese zentrale Lage besteht eine Vielzahl von Kontaktmöglichkeiten. So liegen die Abstände zu den Aminosäuren D278, C281 und Y282 des anderen Monomers um ca. 4 Å, was durchaus im Interaktionsbereich liegen könnte. Ein Kontakt von L251 mit sich selbst über das Interface kommt bei einer Distanz von über 6 Å allerdings nicht in Frage (Lewis *et al.*, 1996).

Von den 15 Positionen der potentiellen Dimerisierungsregion zeigen L251 zusammen mit Y282 die geringste Toleranz gegenüber Austausch; nur 2 von 12 möglichen Austausch werden im tetrameren Hintergrund toleriert, die meisten Substitutionen führen allerdings zu einem konstitutiven Phänotyp (Suckow *et al.*, 1996; Pace *et al.*, 1997). Für Austausch von Y282 konnte bereits früher gezeigt werden, dass die Mutanten monomer in Lösung vorliegen

und daher auch nicht mehr in der Lage sind an *lac* Operator DNA zu binden (Schmitz *et al.*, 1976; Daly & Matthews, 1986; Chakerian & Matthews, 1991).

Der Austausch L251A wurde gewählt, um vorhandene Kontakte zum anderen Monomer zu unterbinden, und durch Veränderungen innerhalb der entsprechenden Reste des anderen Monomers neue Kontakte herzustellen. Frühere Studien hatten keine Beeinträchtigung des Repressionsverhaltens von tetramerem Lac Repressors durch die Substitution L251A gezeigt (Suckow *et al.*, 1996). Um Komplikationen durch Tetramerbildung zu vermeiden, wurde die Mutante L251A in dimerem Hintergrund ohne die C-terminale Tetramerisierungsregion getestet. Die Repressionswerte dieser Mutante *in vivo* sind in Tabelle 4 aufgeführt.

	- IPTG		+ IPTG	
	spezifische β -Galaktosidase Aktivität	Repression	spezifische β -Galaktosidase Aktivität	Repression
ohne LacR	3600	1	-	-
$5 \times I_{dim}^+$	10	360	3600	1
$5 \times I_{dim-L251A}^+$	2200	1,6	2200	1,6
$5 \times I_{tet}^+$	0,3	12000	2400	1,5
$5 \times I_{tet-L251A}^+$	2,8	1300	2100	1,7
$90 \times I_{dim}^+$	2,1	1700	2100	1,7
$90 \times I_{dim-L251A}^+$	390	9	2800	1,3
$90 \times I_{tet}^+$	0,2	18000	780	5
$90 \times I_{tet-L251A}^+$	2	1800	2500	1,4

Tabelle 4: β -Gal-Test der $5 \times I^-$ und $90 \times I^-$ -Derivate der Mutante L251A im Vergleich zu Wildtyp Lac Repressor jeweils mit (rechte Spalte) und ohne 1 mM IPTG (linke Spalte). Die spezifische Aktivität ist ein Mittelwert aus jeweils 3 Kolonien mit jeweils 2 unabhängigen Messungen. Die Repression ist der Quotient aus der spezifischen Aktivität ohne Repressor und der spezifischen Aktivität mit der jeweiligen Repressorvariante. Eine Repression von 1 bedeutet keine Repression. $5 \times I_{dim}^+$ und $5 \times I_{dim-L251A}^+$ werden von dem Plasmid pSO110-P1 (Oehler *et al.*, 1990), $5 \times I_{tet}^+$ und $5 \times I_{tet-L251A}^+$ von dem Plasmid pSO1010-P1 (Oehler *et al.*, 1990), $90 \times I_{dim}^+$ und $90 \times I_{dim-L251A}^+$ von dem Plasmid pWB₃₃₁Stop (Oehler *et al.*, 1994), und $90 \times I_{tet}^+$ und $90 \times I_{tet-L251A}^+$ von dem Plasmid pWB1000 (Lehming *et al.*, 1988) codiert.

Obwohl bei einer Expression von $90 \times I^+$ ungefähr 3600 Untereinheiten pro Zelle vorliegen, zeigt die Mutante L251A im dimeren Hintergrund eine 200fach niedrigere Repression des *lac* Operons als der dimere Wildtyp Lac Repressor. Senkt man die Anzahl verfügbarer Untereinheiten pro Zelle im dimeren Hintergrund auf $5 \times I^+$, also auf ungefähr 200, so ist diese 9fache Restrepression, die bei höheren Konzentrationen noch sichtbar war, vollends verschwunden (Tabelle 4). Im tetrameren Hintergrund ist die Repression der Mutante L251A allerdings, sowohl bei einer Expression von $90 \times I^+$ als auch bei einer Expression von $5 \times I^+$, lediglich 10fach niedriger als die vergleichbare Repression des Wildtyp Lac Repressors

(Tabelle 4). Die Wiederholung des β -Gal-Tests unter Zugabe von 1 mM IPTG zeigt, dass die Einfügung der Mutation L251A keine Auswirkungen auf die Induktorbindung des Lac Repressors hat. Die Restaktivität ist sowohl im tetrameren als auch im dimeren Hintergrund voll induzierbar (Tabelle 4).

Zusätzlich ergab der Test auf negative Dominanz, dass die Mutante L251A nicht mehr in der Lage ist, Heterodimere mit Wildtyp Lac Repressor auszubilden (siehe auch Tabelle 1, Seite 34 und Abbildung 18, Seite 35).

Trotz der niedrigen *in vivo* Aktivität zeigt die Mutante L251A im dimeren Hintergrund *in vitro* bei hohen Proteinkonzentrationen Bindung an den idealen *lac* Operator (Dong, 1997; Spott, 1998; Dong *et al.*, 1999). Das ist umso erstaunlicher, da nähere Untersuchungen der gereinigten Mutante L251A ergaben, dass sie auch in hohen Konzentrationen monomer in Lösung vorliegt (Dong *et al.*, 1999).

3.3.1. Repression über lange Distanzen

Die Mutante L251A ist zwar monomer in Lösung, kann aber durchaus *in vitro* auf der DNA dimerisieren. Das bedeutet allerdings auch, dass sich die Dimere erst auf der DNA ausbilden. Die Frage, die sich dadurch ergibt, ist, ob sich die Tetramere auch erst auf der DNA ausbilden, und dann stabil sind, oder ob die Tetramere bereits in Lösung zusammenfinden. Die Repressionswerte belegen (siehe Tabelle 4), dass die Mutante L251A mit „four-helical-bundle“ durchaus als Tetramer an die DNA bindet.

Für Lambda Repressor konnte gezeigt werden, dass sich höherwertige Komplexe erst auf der DNA ausbilden (Révet *et al.*, 1999), und dadurch eine Repression über große Distanzen möglich machen. Für Wildtyp Lac Repressor, der ja bereits in Lösung als Tetramer vorliegt, wurde gezeigt, dass die Fähigkeit zur Repression über die Loop-Bildung zweier Operatoren abnimmt, wenn die Distanz zwischen den Operatoren zunimmt (Müller *et al.*, 1996). Die lokale Konzentrationserhöhung, die die Bindung zweier Operatoren auf kurzen Distanzen begünstigt (Oehler *et al.*, 1990), erreicht ihr Optimum bei einer Distanz von 70,5 bp zwischen den Symmetriezentren der Operatoren, und nimmt danach kontinuierlich ab (Müller, 1995; Müller *et al.*, 1996). Ab einer Distanz von 600 bp zwischen den Operatoren ist der kooperative Effekt zweier Operatoren nicht mehr vorhanden (Müller, 1995).

Bei Lambda Repressor gibt es in Lösung nur Dimere, die nur durch kooperative Bindung an zwei benachbarte Operatoren ein „Tetramer“ bilden. Zwei derartige Tetramere können sich dann auch ohne lokale Konzentrationserhöhung zum Oktamer zusammenlagern, weil sie die einzigen Tetramere sind. Sie finden sich *in vivo*, weil die Dimere unter den gleichen

Bedingungen keine Oktamere bilden (Révet *et al.*, 1999). Wenn nun die Mutante L251A *in vivo* in Lösung monomer wäre, und nur auf dem Operator dimerisiert, dann wäre ebenfalls eine Loop-Bildung über große Distanzen möglich. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde die Mutante L251A als 5 x I⁺-Variante sowohl mit als auch ohne „four-helical-bundle“ in den Stämmen BMH8117F'λO₁ sowie BMH8117F'λO_{id}1493,5O₁ (Müller, 1995; Müller *et al.*, 1996) auf Repression getestet (Tabelle 5).

	Stamm BMH8117F'	spezifische β-Galaktosidase Aktivität	Repression
ohne LacR	λO ₁	7200	1
	λO _{id} 1493,5 O ₁	5500	1
5 x I ⁺ _{tet}	λO ₁	65	110
	λO _{id} 1493,5 O ₁	17	320
5 x I ⁺ _{tet-L251A}	λO ₁	150	50
	λO _{id} 1493,5 O ₁	40	140
5 x I ⁺ _{dim}	λO ₁	50	120
	λO _{id} 1493,5 O ₁	60	110
5 x I ⁺ _{dim-L251A}	λO ₁	1000	6
	λO _{id} 1493,5 O ₁	1400	5

Tabelle 5: Repression über lange Distanzen. Die Stämme BMH8117F'λO₁ sowie BMH8117F'λO_{id}1493,5O₁ (Müller, 1995; Müller *et al.*, 1996) enthalten einen λ-Prophagen, mit dem folgendes Konstrukt ins Chromosom des *E. coli* Stammes BMH8117F' integriert wurde: ein *lacZ*-Gen mit inaktiviertem O₂ unter der Kontrolle eines *lacUV5*-Promotors mit O₁, die CAP-Bindungsstelle ist ebenfalls inaktiviert, im Falle von BMH8117F'λO_{id}1493,5O₁ befindet sich upstream von O₁ im Abstand von 1493,5 bp zusätzlich O_{id}. Der Abstand ist von Symmetriezentrum zu Symmetriezentrum definiert. Die 5 x I⁺-Konstrukte sind Derivate von pSO110-P1 und pSO1010-P1 (Oehler *et al.*, 1990). Die spezifische β-Galaktosidase-Aktivität ist jeweils ein Mittelwert aus drei Kolonien und zwei voneinander unabhängigen Messungen. Die Repression ist der Quotient der spezifischen Aktivität ohne Plasmid und der spezifischen Aktivität mit der entsprechenden Lac Repressor Variante.

Der dimere Wildtyp Lac Repressor zeigt wie erwartet in beiden Stämmen, mit und ohne zweiten Operator, die selben Repressionswerte von 120fach. Der tetramere Wildtyp Lac Repressor zeigt nur mit O₁ ebenfalls eine Repression von 120fach, mit dem zusätzlich O_{id} im Abstand von 1493,5 bp allerdings erhöht sich die Repression auf 320fach (Tabelle 5). Diese Ergebnisse decken sich innerhalb der Fehlergrenzen mit den bereits vorhandenen Daten (Müller, 1995; Müller *et al.*, 1996). Fügt man nun die Mutante L251A ohne „four-helical-bundle“, also in monomerer Form, in denselben Hintergrund ein, so ergibt sich ebenfalls das erwartete Bild. Die Repressionswerte liegen sowohl mit O₁ als auch mit O_{id} und O₁ bei 6 bzw. 5fach. Die tetramere Mutante L251A zeigt mit O₁ allein 50fache Repression. Dies entspricht ungefähr 50 % der Repression des tetrameren Wildtyp Lac Repressors (Tabelle 5).

Die Repressionswerte der verschiedenen L251A-Mutanten in den Lambda-Stämmen unterscheiden sich von den in JMX8634R ermittelten (siehe auch Tabelle 4, Seite 42) aufgrund der unterschiedlichen Expression der β -Galaktosidase. Daher kann man die Werte nur innerhalb dieses Systems miteinander vergleichen. Die ermittelten Repressionswerte in diesem Testsystem (Tabelle 5) lassen darauf schliessen, dass keine Kooperativität bei der monomeren Mutante vorliegt, und dass, wenn das „four-helical-bundle“ vorhanden ist, auch direkt schon in Lösung Tetramere gebildet werden. Damit hätte die Mutation L251A lediglich Einfluss auf die Dimerisierungs-, nicht aber auf die Tetramerisierungsfunktion.

Da die Mutante L251A in der Lage ist auf der DNA zu dimerisieren, und das *lac* Operon noch 9fach reprimiert (siehe auch Tabelle 4, Seite 42), könnte sie durchaus noch andere Eigenschaften haben, die Mutanten fehlen, die nicht mehr in der Lage sind auf der DNA zu dimerisieren. Deshalb wurde der Test noch mal mit der Mutante Y282A wiederholt. Für die Mutante Y282A konnte gezeigt werden, dass sie im dimeren Hintergrund nicht mehr in der Lage ist an DNA zu binden (Dong, 1997). Ebenso fehlt ihr die Fähigkeit zur Repression des *lac* Operons im tetrameren Hintergrund, wenn sie nur schwach exprimiert wird (Suckow *et al.*, 1996). Aus diesen Gründen wurde für den Test, ob Repression über lange Distanzen stattfinden kann, die tetramere Mutante Y282A gewählt, die mit Hilfe des Plasmids pWB1053 (Andrew Barker, unveröffentlicht) mit $90 \times I^+$ überexprimiert wird. Das Plasmid pWB1053 unterscheidet sich insofern von dem Plasmid pWB1000 (Lehming *et al.*, 1988), dass es anstatt der Amp-Resistenz eine Tet-Resistenz trägt. Die Amp-Resistenz konnte aufgrund der *E. coli*-Stämme BMH8117F' λ O₁ sowie BMH8117F' λ O_{id}1493,5O₁ (Müller, 1995; Müller *et al.*, 1996) nicht verwendet werden, da die ins bakterielle Genom integrierten Lambda-Prophagen eine Amp-Resistenz mitbringen. Die Ergebnisse dieses zweiten Tests auf Repression über lange Distanzen sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Die Ergebnisse dieses Experimentes sind identisch mit denen für die Mutante L251A (siehe Tabelle 5, Seite 44). Die Überexpression der Mutante Y282A im tetrameren Hintergrund bewirkt zwar eine Repression des *lac* Operons, die Steigerung der Repression über lange Distanzen entspricht aber lediglich einem Faktor von 3, der auch bei überexprimierten tetrameren Wildtyp Lac Repressor zu sehen ist.

	Stamm BMH8117F'	spezifische β -Galaktosidase Aktivität	Repression
ohne LacR	λO_1	7200	1
	$\lambda O_{id} 1493,5 O_1$	7600	1
90 x I ⁺ _{tet}	λO_1	16	300
	$\lambda O_{id} 1493,5 O_1$	9,5	800
90 x I ⁺ _{tet-Y282A}	λO_1	38	120
	$\lambda O_{id} 1493,5 O_1$	24	320

Tabelle 6: Repression über lange Distanzen. Die Stämme BMH8117F' λO_1 sowie BMH8117F' $\lambda O_{id}1493,5O_1$ (Müller, 1995; Müller *et al.*, 1996) enthalten einen λ -Prophagen, mit dem folgendes Konstrukt ins Chromosom des *E. coli* Stammes BMH8117F' integriert wurde: ein *lacZ*-Gen mit inaktiviertem O_2 unter der Kontrolle eines *lacUV5*-Promotors mit O_1 , die CAP-Bindungsstelle ist ebenfalls inaktiviert, im Falle von BMH8117F' $\lambda O_{id}1493,5O_1$ befindet sich upstream von O_1 im Abstand von 1493,5 bp zusätzlich O_{id} . Der Abstand ist von Symmetriezentrum zu Symmetriezentrum definiert. Die 90 x I⁺-Konstrukte sind Derivate von pWB1053 (Andrew Barker, unveröffentlicht). Die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität ist jeweils ein Mittelwert aus drei Kolonien und zwei voneinander unabhängigen Messungen. Die Repression ist der Quotient der spezifischen Aktivität ohne Plasmid und der spezifischen Aktivität mit der entsprechenden Lac Repressor Variante.

3.3.2. L251A und tightbinder

Die Möglichkeiten, wie die Mitglieder der LacR-GalR-Familie die DNA als Dimer oder Tetramer erkennen und binden, bieten Vorteile für die Regulation von Genen. Die Bildung von Proteinkomplexen in Lösung ist aber nur eine Möglichkeit, diesen Vorteil zu nutzen. Viele Protein-Protein-Interaktionen finden erst nach der Bindung an DNA statt, wie z. B. die Aktivierung der RNA-Polymerase durch CAP (*Catabolite activating protein*) (Busby & Ebright, 1999). Dies gilt vor allem für Komplexe aus verschiedenen Proteinen. Es gibt allerdings auch Beispiele für regulative Proteine, die erst auf der DNA kooperativ dimerisieren, eins davon ist LexA (Kim & Little, 1992). Obwohl erst kürzlich gezeigt werden konnte, dass LexA durchaus in der Lage ist bereits in Lösung zu dimerisieren (Mohana-Borges *et al.*, 2000) so scheint sich doch die Struktur des Dimers auf der DNA zu verändern (Chattopadhyaya *et al.*, 2000).

Wie die vorausgegangenen Studien gezeigt haben, liegt die Mutante L251A-adi *in vivo* als Monomer vor (Dong *et al.*, 1999). Dass es möglich ist, tetrameren Lac Repressor, der durch Austausch in der Dimerisierungsregion nicht mehr in der Lage ist, funktionelle Tetramere zu bilden, durch Austausch in anderen Bereichen des Proteins zu stabilisieren, konnte ebenfalls gezeigt werden (Swint-Kruse *et al.*, 2001). Inwieweit man die monomere Mutante L251A im Hintergrund ohne die Tetramerisierungsregion stabilisieren kann, ohne ausgleichende Austausch in das Dimerisierungsinterface einzufügen, sollte durch die Kombination mit tightbinder-Mutanten getestet werden.

Tightbinder sind Mutanten im „headpiece“ des Lac Repressors, die wesentlich fester an DNA binden als der Wildtyp Lac Repressor (Kolkhof, 1992). Diese festere Bindung geht zum Teil einher mit einer unspezifischeren Bindung an DNA und/oder verminderter Induzierbarkeit des Lac Repressors. Um zu testen, inwieweit eine festere Bindung an DNA die Fähigkeit zur Repression des *lac* Operons durch die monomere Mutante L251A verbessern kann, wurden die Austausche P3Y, V4A, Y17H, S61L, V4A/S61L und P3Y/S61L im „headpiece“ mit L251A kombiniert. Die Ergebnisse des *in vivo* Tests sind in Tabelle 7 dargestellt.

			+ IPTG	
	spezifische β-Galaktosidase Aktivität	Repression	spezifische β-Galaktosidase Aktivität	Repression
ohne LacR	3400	1	n.g.	n.g.
90 x I ⁺ _{dim}	2,1	1500	2400	1
90 x I ⁺ _{dim-L251A}	390	9	2800	1
90 x I ⁺ _{dim-P3Y}	0,0013	2600000	6,6	590
90 x I ⁺ _{dim-S61L}	0,0008	4250000	160	25
90 x I ⁺ _{dim-P3Y/S61L}	110	40	n.g.	n.g.
90 x I ⁺ _{dim-V4A/L251A}	9,2	380	n.g.	n.g.
90 x I ⁺ _{dim-Y17H/L251A}	2200	2	n.g.	n.g.
90 x I ⁺ _{dim-S61L/L251A}	11	320	n.g.	n.g.
90 x I ⁺ _{dim-P3Y/L251A}	0,001	3400000	20	140
90 x I ⁺ _{dim-V4A/S61L/L251A}	14	260	n.g.	n.g.
90 x I ⁺ _{dim-P3Y/S61L/L251A}	n.g.	n.g.	0,0012	2800000

Tabelle 7: β-Gal-Test der 90 x I⁺-Derivate der Mutante L251A in Kombination mit tightbinder Mutanten im Vergleich zu Wildtyp Lac Repressor jeweils mit (rechte Spalte) und ohne 1 mM IPTG (linke Spalte). Als Hintergrund wurde der *E. coli* Stamm JMX8634R verwendet. Die spezifische Aktivität ist ein Mittelwert aus jeweils 3 Kolonien mit jeweils 2 unabhängigen Messungen. Die Repression ist der Quotient aus der spezifischen Aktivität ohne Repressor und der spezifischen Aktivität mit der jeweiligen Repressorvariante. Eine Repression von 1 bedeutet keine Repression.

Die tightbinder P3Y und S61L zeigen im dimeren Hintergrund schon eine sehr hohe Repression. Die Kombination der monomeren Mutante L251A mit dem tightbinder P3Y führt zu einer sehr starken Repression des *lac* Operons, die weit über der Repression liegt, die mit Wildtyp Lac Repressor zu erreichen ist. Die Kombination von S61L mit L251A erhöht die Repression der dimeren Mutante L251A ebenso wie die Kombination mit V4A ca. 40fach. Die Kombination des Monomers L251A mit dem Austausch Y17H dagegen verhindert selbst die schwache Repression, die die Mutante L251A alleine aufweist. Für den Dreifachaustausch P3Y/S61L/L251A konnten keine reproduzierbaren Werte im β-Gal-Test ermittelt werden. Obwohl die Messung mehrmals wiederholt wurde, schwanken die Werte für die spezifische

β -Galaktosidase-Aktivität zwischen 1,7 und 20 U. Beobachtet werden konnte allerdings, dass die Bakterien vom *E. coli* Stamm JMX8634R, die diesen Dreifachaustausch exprimierten, in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit eingeschränkt waren. Diese Beobachtung hängt wahrscheinlich mit der erhöhten unspezifischen DNA-Bindung der Mutante zusammen. Zweifelsfrei konnte dagegen in der Messung mit 1 mM IPTG festgestellt werden, dass es sich bei dieser Dreifachsubstitution um eine reverse Mutante handelt, die unter Zugabe von Induktor fester an *lac* Operator bindet als ohne.

Die extrem starke Repression des *lac* Operons durch die Mutante P3Y/L251A führte zu der Fragestellung, ob diese Mutante immer noch als Monomer vorliegt, auf der DNA dimerisiert und dann durch P3Y stabilisiert wird, oder ob diese Mutante in der Lage ist als Monomer an eine einzelne Operatorhalbseite zu binden. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Operortargets konstruiert, die jeweils einen halben Operator oder zwei halbe Operatoren mit unterschiedlichem Spacing enthielten (siehe auch Material und Methoden, Abschnitt 2.3.12., und Abbildung 16, Seite 29). Das Ergebnis des *in vitro* Tests mit idealem Operator und einer Operatorhalbseite ist in Abbildung 20 dargestellt.

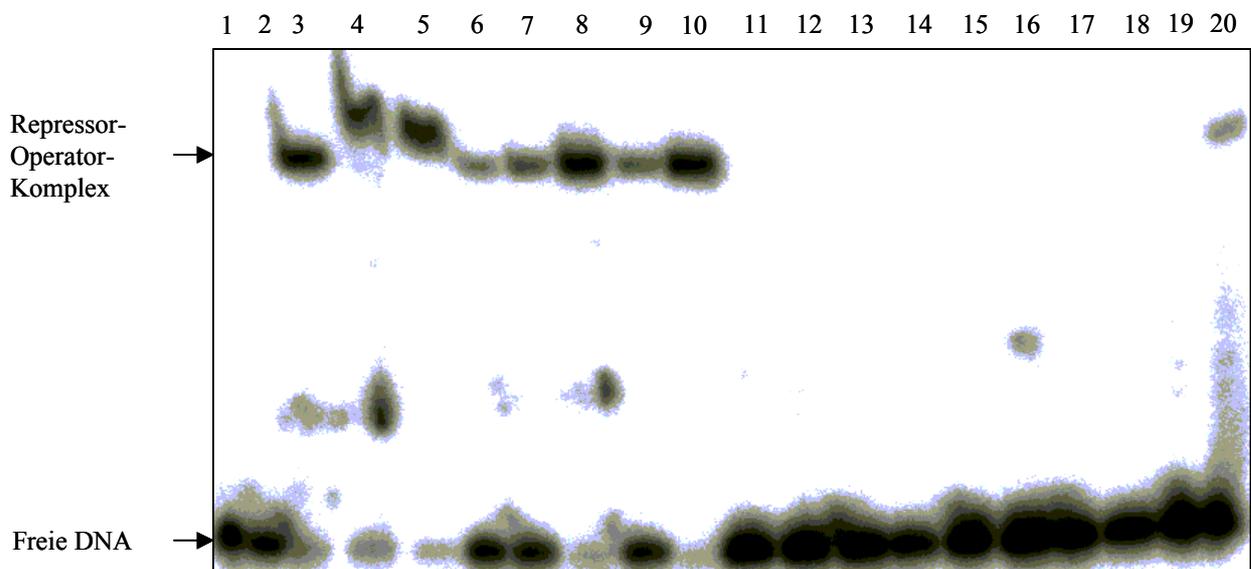


Abbildung 20: Retardierungsgel mit tightbinder Mutanten in Kombination mit der Mutation L251A. Spuren 1-10: idealer Operator, Spuren 11-20: Operator-Halbseite (Sequenz siehe auch Abbildung 16, Seite 29). Die Spuren enthalten: 1) Idealer Operator in Rohextrakt puffer, 2) Rohextrakt ohne Lac Repressor, 3) Wildtyp Lac Repressor, 4) L251A, 5) V4A/L251A, 6) Y17H/L251A, 7) S61L/L251A, 8) P3Y/L251A, 9) V4A/S61L/L251A, 10) P3Y/S61L/L251A, 11) Operator-Halbseite in Rohextrakt puffer, 12) Rohextrakt ohne Lac Repressor, 13) Wildtyp *Lac* Repressor, 14) L251A, 15) V4A/L251A, 16) Y17H/L251A, 17) S61L/L251A, 18) P3Y/L251A, 19) V4A/S61L/L251A, 20) P3Y/S61L/L251A. Die Proteinkonzentration beträgt ca. 10^{-8} M, die Konzentration an idealem Operator bzw. der Operator-Halbseite beträgt ca. 10^{-9} M. Als Kompetitor wurde 0,5 μ g polydIdC pro Ansatz verwendet. Allen Mutanten und Wildtyp Lac Repressor fehlt die Tetramerisierungsregion (331Stop).

In den Spuren 1 – 10 ist idealer *lac* Operator enthalten, in den Spuren 11 bis 20 eine Operatorhalbseite. Alle mit L251A kombinierten Mutanten binden in hohen Proteinkonzentrationen an idealen *lac* Operator. Die Unregelmäßigkeiten die in der Repressor-Operator-Komplex-Bande enthalten sind, liegen in der hohen Proteinkonzentration des Rohextraktes begründet. Die unterschiedlich starke Bindung der einzelnen Mutanten an idealen Operator decken sich mit den *in vivo* Ergebnissen (siehe Tabelle 7).

Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Dreifachsubstitution P3Y/S61L/L251A an eine Operatorhalbseite bindet. Die Bande läuft auf gleicher Höhe, wie an DNA-gebundener dimerer Wildtyp Lac Repressor. Diese Bande erhält man auch mit den Operatoren die zwei Halbseiten enthalten (siehe Material und Methoden, Abschnitt 2.3.12, Abbildung 16, Seite 29). Würde die Mutante nur als Monomer an die DNA binden, so würde man einen Shift erwarten, der niedriger läuft als der Repressor-Operator-Komplex mit dimerem Lac Repressor. Andererseits kann nur ein „headpiece“ gebunden haben, wenn nur eine Operatorhalbseite auf der Target-DNA vorhanden ist. Wenn die Bande allerdings auf der Höhe des Dimers läuft, so könnte das bedeuten, dass die Mutante mit Hilfe der DNA in der Lage ist Dimere zu bilden, auch wenn eine Untereinheit nur unspezifisch binden kann.

Um zu klären, ob die Kombinationen der tightbinder mit L251A für die Dimerisierung in Lösung genügt, oder ob diese Protein wie die Mutante L251A allein monomer sind, wurde versucht, die Doppel- bzw. Dreifachmutanten P3Y/L251A und P3Y/S61L/L251A zu reinigen. Dieses Unterfangen gestaltete sich insofern als schwierig, als sich bereits die dimere Mutante L251A kaum reinigen ließ. Da diese Mutante so gut wie gar nicht an DNA bindet, band sie auch kaum an Phosphocellulose. Für die bereits beschriebene Reinigung der Mutante L251A (Dong *et al.*, 1999) wurde das von dem Plasmid pWB100-adi codierte Protein verwendet. Der Mutante L251A-adi fehlt zwar auch die Tetramerisierungsregion, aber im Gegensatz zur Mutante L251A-331Stop sind noch ein paar zusätzliche Aminosäuren vorhanden, die das aufzureinigende Protein anscheinend stabiler machen. Auch die Aufreinigung der Mutanten P3Y/L251A und P3Y/S61L/L251A gestaltete sich als schwierig, da diese Proteine zwar in ausreichender Menge exprimiert wurden, aber anscheinend im Rohextrakt anfällig für Proteasen sind. Einzelne Messungen mit der Mutante P3Y/L251A ergaben, dass diese Mutante trotz der hohen Repressionswerte in Lösung nach wie vor als Monomer vorliegt (Lily Pereg-Gerk, persönliche Mitteilung).

3.4. Heterodimerer Lac Repressor

Heterodimerisierung innerhalb derselben Proteinfamilie konnte bisher nur bei eukaryotischen Transkriptionsfaktoren wie Jun und Fos nachgewiesen werden (Johnson & McKnight, 1989). Jun und Fos heterodimerisieren spezifisch über gegensätzlich geladene Aminosäuren innerhalb des Leucin-Zippers (O'Shea *et al.*, 1992; John *et al.*, 1994). Daher wurde auf der Basis der vorhandenen Kenntnisse über die Dimerisierung von Lac Repressor versucht, durch gezielte Austausche mit geladenen Aminosäuren innerhalb des Monomer-Monomer-Interface Lac Repressor Heterodimere zu erhalten. Die Voraussetzung hierfür ist, dass die Einzelmutanten *in vitro* nicht mehr an idealen Operator binden. Lediglich die Mischung zweier verschiedener Einzelmutanten mit geladenen Aminosäuren soll wieder Bindung an Operator zeigen.

Im Rahmen der vorausgegangenen Diplomarbeit wurden zunächst die geladenen Reste Glutaminsäure, Asparaginsäure, Lysin und Arginin an Position 251 eingefügt, und die resultierenden Proteine auf Heterodimerisierung getestet (Spott, 1998). Dazu wurde der dimere Hintergrund pWB₃₃₁Stop verwendet. Durch die zentrale Lage der Position 251 in der Mitte des Monomer-Monomer-Interfaces, schien eine Heterodimerisierung möglich. Alle Einzelmutanten zeigten *in vitro* keine Bindung mehr an idealen Operator, und soweit getestet auch keine Repression. Der *in vitro*-Test auf Heterodimere zeigte allerdings ebenfalls kein positives Ergebnis. Keine der Mischungen der geladenen Einzelaustausche an Position 251 zeigte Bindung an idealen *lac* Operator (Spott, 1998). Eine mögliche Ursache für die Verhinderung von Heterodimerisierung könnte die geladene Aminosäure an Position 278 sein, die durch ihre räumliche Nähe zur Position 251 die Ausbildung von Heterodimeren stören kann.

3.4.1. Kombinationen mit D278L

Um die möglichen störenden Einflüsse der geladenen Position 278 zu eliminieren, wurden für weitere Experimente die geladenen Aminosäureaustausche an Position 251 mit dem neutralen Austausch an Position 278, von Asparaginsäure zu Leucin, kombiniert. Für die Mutante D278L konnte bereits gezeigt werden, dass es sich um eine Spezifitätsänderung in der Dimerisierung handelt, die keinen negativen Einfluss auf die Dimerisierungseigenschaften von Lac Repressor hat. Bevor diese Mutanten auf ihre Fähigkeit zur Heterodimerbildung getestet wurden, wurde *in vivo* getestet, ob sie noch in der Lage sind, Homodimere zu bilden. Das Ergebnis dieses Tests ist in Tabelle 8 dargestellt.

	spezifische β-Galaktosidase Aktivität	Repression
ohne LacR	3400	1
90 x I ⁺ _{dim}	2,3	1500
90 x I ⁺ _{dim-L251D/D278L}	3600	1
90 x I ⁺ _{dim-L251E/D278L}	3450	1
90 x I ⁺ _{dim-L251K/D278L}	3400	1
90 x I ⁺ _{dim-L251R/D278L}	3700	1

Tabelle 8: β-Gal-Test der 90 x I⁺-Derivate mit geladenen Aminosäuren an Position 251 und der neutralen Mutation D278L. Die Mutanten befinden sich alle im dimeren Hintergrund des Plasmids pWB₃₃₁Stop (Oehler *et al.*, 1994) und werden in *E. coli* JMX8634R (Dong *et al.*, 1999) exprimiert. Die spezifische Aktivität ist ein Mittelwert aus jeweils 3 Kolonien mit jeweils 2 unabhängigen Messungen. Die Repression ist der Quotient aus der spezifischen Aktivität ohne Repressor und der spezifischen Aktivität mit der entsprechenden Repressorvariante. Eine Repression von 1 bedeutet keine Repression.

Wie aus der Tabelle 8 ersichtlich ist, ist keine der Doppelmutanten mehr in der Lage, das *lac* Operon zu reprimieren. Der anschließende *in vitro* Test auf Heterodimere ist in Abbildung 21 dargestellt. Auch im Retardierungsgel zeigt keine der Einzelmутanten, die in den Spuren 4 – 7 zu sehen sind, Bindung an idealen *lac* Operator.

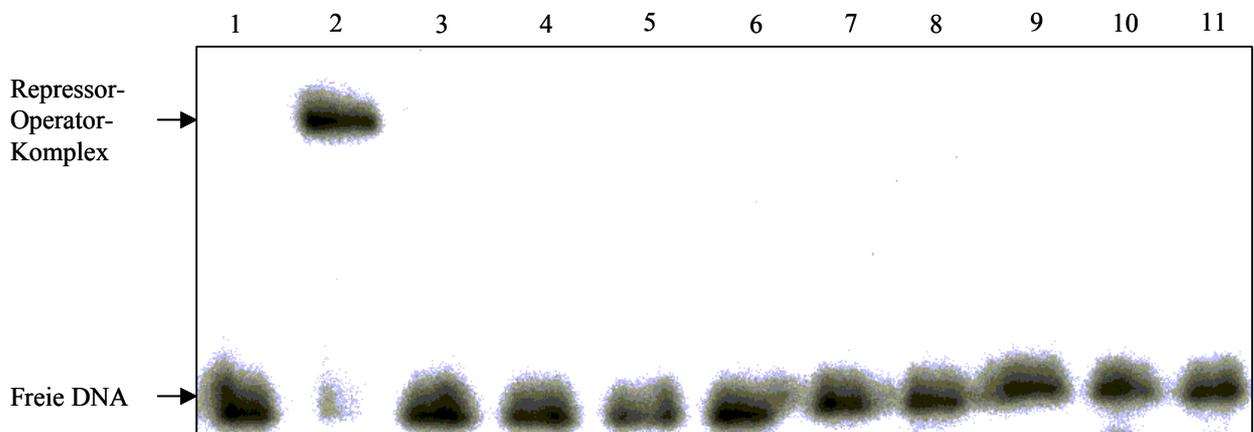


Abbildung 21: Retardierungsgel mit idealem Operator. Die Spuren enthalten: 1) Idealer Operator in Rohextrakt, 2) Wildtyp Lac Repressor, 3) Rohextrakt ohne Lac Repressor, 4) L251E/D278L, 5) L251D/D278L, 6) L251K/D278L, 7) L251R/D278L, 8) Mischung L251E/D278L-L251K/D278L, 9) Mischung L251E/D278L-L251R/D278L, 10) Mischung L251D/D278L-L251K/D278L, 11) Mischung L251D/D278L-L251R/D278L. Die Proteinkonzentration beträgt ca. 10⁻⁸M, die Konzentration an idealem Operator beträgt ca. 10⁻⁹M. Als Kompetitor wurde 0,5 µg polydIdC pro Ansatz verwendet. Allen Mutanten und Wildtyp Lac Repressor fehlt die Tetramerisierungsregion (331Stop).

Aber auch die Mischungen der Einzelmutanten, die in den Spuren 8 – 11 enthalten sind, zeigen keine Spur von Heterodimeren. Anscheinend ist die Neutralisierung der Position 278 und damit die Interaktion der geladenen Aminosäuren an Position 251 mit sich selbst nicht ausreichend für eine Heterodimerisierung.

3.4.2. Heterodimere mit D278E/K/R

Nachdem die Kombinationen der Mutanten L251D/E/K/R mit der neutralen Aminosäure D278L nicht ausreichend waren, um zu Heterodimeren zu führen, wurden an der Position 278 die geladenen Aminosäuren Glutaminsäure, Arginin und Lysin eingefügt. Um die Fähigkeit der Mutanten zur Bildung von Homo- bzw. Heterodimeren zu testen, wurden sie zunächst sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als Einzelmutanten getestet, d. h. ohne einen zusätzlichen Austausch mit geladenen Aminosäuren an Position 251. Die *in vitro*-Ergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt.

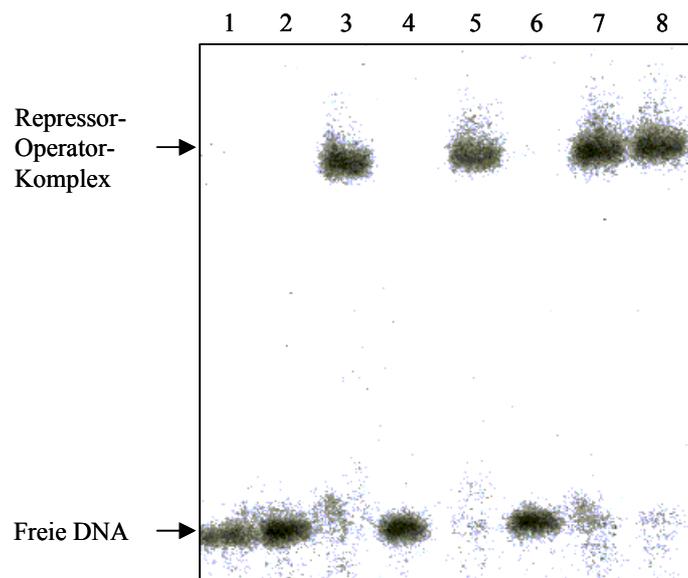


Abbildung 22: Retardierungsgel mit idealem Operator. Die Spuren enthalten: 1) Idealer Operator in Rohextrakt, 2) Rohextrakt ohne Lac Repressor, 3) Wildtyp Lac Repressor, 4) D278K, 5) D278E, 6) D278R, 7) Mischung D278E/D278K, 8) Mischung D278E/D278R. Die Proteinkonzentration beträgt ca. 10^{-8} M, die Konzentration an idealem Operator beträgt ca. 10^{-9} M. Als Kompetitor wurde 0,5 μ g polydIdC pro Ansatz verwendet. Allen Mutanten und Wildtyp Lac Repressor fehlt die Tetramerisierungsregion (331Stop).

In Abbildung 22 kann man deutlich sehen, dass die Mutante D278E noch in der Lage ist, Homodimere mit sich selbst zu bilden. Auch bei höheren Verdünnungen der Rohextrakte zeigt die Mutante weiterhin das gleiche Verhalten wie Wildtyp Lac Repressor. Daher kann auch die Bindung des idealen Operators in Spur 7 und 8 von Abbildung 22 ausschließlich auf

die Homodimerbildung von D278E zurückgeführt werden. Das selbe Bild ergibt sich *in vivo* (siehe Tabelle 9).

	spezifische β-Galaktosidase Aktivität	Repression
ohne LacR	3200	1
90 x I ⁺ _{dim}	2,1	1550
90 x I ⁺ _{dim-D278E}	2,1	1550
90 x I ⁺ _{dim-D278K}	3100	1
90 x I ⁺ _{dim-D278R}	2900	1

Tabelle 9: β-Gal-Test der 90 x I⁺-Derivate mit geladenen Aminosäuren an Position 278. Die Mutanten befinden sich alle im dimeren Hintergrund des Plasmids pWB₃₃₁Stop (Oehler *et al.*, 1994) und werden in *E. coli* JMX8634R (Dong *et al.*, 1999) exprimiert. Die spezifische Aktivität ist ein Mittelwert aus jeweils 3 Kolonien mit jeweils 2 unabhängigen Messungen. Die Repression ist der Quotient aus der spezifischen Aktivität ohne Repressor und der spezifischen Aktivität mit der entsprechenden Repressorvariante. Eine Repression von 1 bedeutet keine Repression.

Die Mutante D278E verhält sich auch im Test auf negative Dominanz wie Wildtyp Lac Repressor, und zeigt keine Einschränkungen in ihren Heterodimerisierungseigenschaften mit Wildtyp Lac Repressor.

3.4.3. Heterodimere mit Doppelaustauschen

Als letzter Versuch Heterodimere im dimeren Hintergrund zu schaffen wurden alle möglichen Kombinationen von Doppelaustauschen mit geladenen Aminosäuren an den Positionen 251 und 278 geschaffen, und diese auf ihre Fähigkeit zur Ausbildung von Homo- und Heterodimeren getestet.

Der Test auf Homodimere *in vivo* wurde anhand einer X-Gal-Färbung auf YT-Platten durchgeführt, und ergab, dass keine der Mutanten mehr in der Lage ist, dass *lac* Operon zu reprimieren. Der *in vitro* Test auf Heterodimere ist zusammengefasst in Abbildung 23.

Keine der Mischungen mit Doppelaustauschen an Position 251 und 278 ergab ein Heterodimer. Lediglich leichte Tendenzen sind in diesem Test zu sehen.

		L251 D278K	L251 D278R	L251K D278	L251R D278	L251D D278	L251E D278	L251K D278R	L251R D278R	L251D D278R	L251E D278R	L251K D278K	L251R D278K	L251D D278K	L251E D278K	L251K D278E	L251R D278E	L251D D278E
L251	D278K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L251	D278R	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L251K	D278	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	(+)	-	-	(+)	-	(+)	(+)	(+)
L251R	D278	-	-	-	-	(+)	-	(+)	-	(+)	(+)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	-	(+)
L251D	D278	-	-	-	(+)	-	-	(+)	-	-	(+)	-	(+)	(+)	-	-	+	(+)
L251E	D278	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	(+)	(+)
L251K	D278R	-	-	(+)	(+)	(+)	-	(+)	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	(+)
L251R	D278R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	(+)	-	-
L251D	D278R	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	+
L251E	D278R	-	-	(+)	(+)	(+)	-	(+)	-	-	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
L251K	D278K	-	-	-	(+)	-	-	-	+	(+)	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+
L251R	D278K	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	(+)	(+)
L251D	D278K	-	-	(+)	(+)	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	(+)
L251E	D278K	-	-	-	(+)	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	(+)	(+)	(+)
L251K	D278E	-	-	(+)	(+)	-	-	-	(+)	(+)	(+)	-	(+)	(+)	-	(+)	(+)	(+)
L251R	D278E	-	-	(+)	-	+	-	-	-	-	(+)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	+	(+)
L251D	D278E	-	-	(+)	(+)	(+)	-	(+)	-	+	(+)	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+
L251E	D278E	-	-	(+)	+	(+)	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+

Abbildung 23: Zusammenfassung der *in vitro* Tests auf Heterodimere mit Doppelaustauschen an Position 251 und 278. Mit - = keine Bindung an idealen Operator; (+) = sehr schwache Bindung an idealen Operator; + = schwache Bindung an idealen Operator. Zum Vergleich: Die Bindung von Wildtyp Lac Repressor an idealen Operator entspricht ++++. Jede Mischung wurde doppelt getestet. Bei unterschiedlichen Ergebnissen wurde das niedrigere gewählt, oder ein Mittelwert gebildet. Die Proteinkonzentration beträgt ca. 10^{-8} M, die Konzentration an idealem Operator beträgt ca. 10^{-9} M. Als Kompetitor wurde 0,5 μ g polyDIdC pro Ansatz verwendet. Allen Mutanten und Wildtyp Lac Repressor fehlt die Tetramerisierungsregion (331Stop).

3.5. Die potentielle Dimerisierungsregion von RBP

Das Ribose bindende Protein (RBP) gehört zusammen mit ABP (*arabinose binding protein*) und GBP (*galactose binding protein*) zur Familie der periplasmatischen zuckerbindenden Proteine. RBP ist der periplasmatische Rezeptor für Ribose und verantwortlich für Chemotaxis und den Transport von Ribose (Ames, 1986; Kondoh *et al.*, 1979). RBP ist wie alle periplasmatischen zuckerbindenden Proteine monomer in Lösung (siehe auch Einleitung, Abschnitt 1.3.1.).

3.5.1. Alignment von RBP und Lac Repressor

Das „core“ von RBP hat große strukturelle Ähnlichkeiten mit den „core“-Domänen der Mitglieder der LacR-GalR-Familie (Mowbray & Cole, 1992; Schumacher *et al.*, 1994, 1995; Lewis *et al.*, 1996). Auch auf der Ebene der Aminosäuresequenz ist eine Homologie vorhanden (Müller-Hill, 1983; Weickert & Adhya, 1992). Immerhin 20 % der Reste von RBP und dem „core“ von Lac Repressor sind identisch, und 60 % der Reste sind ähnlich (Weickert & Adhya, 1992). Daher wurden auch die ersten Berechnungen des Lac Repressor „core“ auf der Basis der Strukturdaten von RBP angefertigt (Nichols *et al.*, 1993; Suckow, 1996).

Für Lac Repressor konnten 15 Positionen bestimmt werden, die an der Dimerisierung beteiligt sind (Suckow *et al.*, 1996; Pace *et al.*, 1997). Diese 15 Positionen und die entsprechenden Aminosäuren sind in Tabelle 10A dargestellt. Wenn man diese 15 Positionen mit den

analogen Positionen der Mitglieder der LacR-GalR-Familie vergleicht (siehe auch Diskussion Abschnitt 4.1. und Abbildung 25, Seite 64), so findet man fast keine Übereinstimmungen. Höchstens einer von 15 Resten ist mit dem entsprechenden Rest in Lac Repressor identisch. Vergleicht man allerdings diese 15 Aminosäuren, die an der Dimerisierung von Lac Repressor beteiligt sind, mit den analogen Resten des monomeren Proteins RBP (siehe Tabelle 10B und C), so findet man innerhalb dieser 15 Reste drei identische Aminosäuren. Die identischen Aminosäuren sind L251, R255 und D278 von Lac Repressor. Aus der bisherigen Analyse des Monomer-Monomer-Interface von Lac Repressor geht hervor, dass genau diese Positionen, nämlich L251 und D278 essentiell für die Dimerisierung des Lac Repressors sind (siehe auch Abschnitt 3.2. und Abschnitt 3.3).

A)	221	222	223	226	251	254	255	258	259	278	280	281	282	283	285
LacR	S	A	M	F	L	M	R	T	E	D	S	C	Y	I	P

B)	221	222	223	226	251	254	255	258	259	278	280	281	282	283	285
LacR	S	A	M	F	L	M	R	T	E	D	S	C	Y	I	P
RBP	D	R	I	L	L	L	R	Q	T	D	A	V	N	D	K
	165	166	167	170	195	198	199	202	203	219	223	224	225	226	228

C)	221	222	223	226	251	254	255	258	259	278	280	281	282	283	285
LacR	S	A	M	F	L	M	R	T	E	D	S	C	Y	I	P
RBP	D	R	I	L	L	L	R	Q	T	D	E	K	A	V	D
	165	166	167	170	195	198	199	202	203	219	221	222	223	224	226

Tabelle 10: Alignment der Aminosäuren der Dimerisierungsoberfläche von Lac Repressor mit den analogen Resten des Ribose bindenden Proteins (RBP). In A) sind die 15 Aminosäuren, die die Dimerisierungsoberfläche von Lac Repressor bilden (Friedmann *et al.*, 1995; Lewis *et al.*, 1996; Suckow *et al.*, 1996; Pace *et al.*, 1997), angegeben. Die Seitenketten der Reste S221, M254, T258, E259, S280 und P285 sind eher in die Richtung des eigenen „core“ orientiert, während die Seitenketten der Aminosäuren A222, M223, F226, L251, R255, D278, C281, Y282 und I283 eher zu dem „core“ des gegenüberliegenden Monomers zeigen. Diese Reste wurden grau unterlegt. B) Alignment der 15 Aminosäuren der Dimerisierungsoberfläche von Lac Repressor mit den analogen Resten aus RBP nach Suckow *et al.* (1996). In der obersten Spalte ist die Nummerierung der Positionen von Lac Repressor angegeben, in der untersten Spalte die Nummerierung der analogen Positionen von RBP. Die Aminosäuren, deren Seitenketten im Lac Repressor Dimer in Richtung des anderen Monomers zeigen, sind wie in A) grau unterlegt. Zusätzlich sind die identischen Aminosäuren gelb gekennzeichnet und die Position 282 ist rot unterlegt. C) Alignment der 15 Aminosäuren der Dimerisierungsoberfläche von Lac Repressor mit den analogen Resten von RBP nach Müller-Hill (1983). Sowohl die Beschriftung als auch die farbliche Markierung sind wie in B). Der Unterschied zu B) besteht im Alignment der dritten Helix des potentiellen Dimerisierungsinterface von RBP zur dritten Helix von der Dimerisierungsoberfläche von Lac Repressor.

Damit sind zwei für die Dimerisierung von Lac Repressor essentielle Aminosäuren vorhanden. Was allerdings im potentiellen Dimerisierungsinterface von RBP fehlt, ist das Tyrosin an Position 282. Das dieser Position eine entscheidende Bedeutung innerhalb der Dimerisierung von Lac Repressor zukommt, und Austausch nicht nur im dimeren Hintergrund, sondern auch im Tetramer einen Funktionsverlust zur Folge haben, konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden (Schmitz *et al.*, 1976; Chakerian & Matthews,

1991; Daly & Matthews, 1992; Chen & Matthews, 1992; Markiewicz *et al.*, 1994; Suckow *et al.*, 1996). Innerhalb dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Tyrosin aufgrund seiner sterischen Anordnung im Monomer-Monomer-Interface von essentieller Bedeutung ist (siehe auch Abschnitt 3.1.2.). Das Einfügen von Y282 in das potentielle Dimerisierungsinterface von RBP wäre daher der einfachste Ansatz, aus dem monomeren RBP ein dimeres DNA-bindendes Protein zu machen.

Die Frage, die sich dann allerdings stellt, lautet: Welchen Rest ersetzt man durch Tyrosin? Ebenso wie bei dem Alignment von Lac Repressor mit den Mitgliedern der LacR-GalR-Familie (siehe auch Abschnitt 4.1. und Abbildung 25, Seite 64), stellt sich auch bei dem Alignment von Lac Repressor mit RBP das Problem der dritten Helix. Die dritte Helix der Dimerisierungsoberfläche von Lac Repressor ist äußerst kurz, und kann daher auf unterschiedliche Arten mit der entsprechenden dritten Helix des potentiellen Dimerisierungsinterface von RBP verglichen werden. Zwei verschiedene Alignments sind in Tabelle 10B und C dargestellt. Tabelle 10B zeigt das Alignment nach Suckow *et al.* (1996), das identisch ist mit dem Alignment nach Weickert & Adhya (1992). Tabelle 10C zeigt das Alignment nach Müller-Hill (1983), das im Vergleich zu dem anderen Alignment um zwei Aminosäuren verschoben ist. Das Alignment nach Suckow *et al.* (1996) erscheint logischer, da es nicht nur anhand der Homologie der Aminosäuresequenz erstellt wurde, sondern auch mit den Kristallstrukturen von LacR (Friedmann *et al.*, 1995; Lewis *et al.*, 1996), PurR (Schumacher *et al.*, 1994, 1995) und RBP (Mowbray & Cole, 1992) abgeglichen wurde. Dagegen ist das Alignment von Müller-Hill (1983) allein anhand der Aminosäuresequenzen der periplasmatischen zuckerbindenden Proteine ABP (*arabinose binding protein*; Hogg & Hermodson, 1977), GBP (*galactose binding protein*; Mahoney *et al.*, 1981), RBP (*ribose binding protein*; Groarke *et al.*, 1983), sowie der Repressoren GalR (v. Wilcken-Bergmann & Müller-Hill, 1982) und LacR (Farabough, 1978), und der bereits bekannten Homologie der periplasmatischen zuckerbindenden Proteine (Argos *et al.*, 1981) erstellt worden.

Vergleicht man allerdings die Positionierung der Seitenkette des analogen Restes zu Position 282 in der Kristallstruktur von RBP mit der Positionierung von Y282 in der Kristallstruktur von Lac Repressor, so erscheint das Alignment nach Müller-Hill (1983) durchaus naheliegender. In den folgenden Experimenten wurden deswegen beide Alignments berücksichtigt.

3.5.2. Konstruktion von RBP mit dem „headpiece“ von Lac Repressor

Das Fusionsprotein RBP-HP wurde anhand des Alignments nach Weickert & Adhya (1992a) kloniert (A. Barker, unveröffentlicht). Für Lac Repressor ist bekannt, dass die Position 61, die schon am Anfang des „core“ und am Ende der „hinge“-Helix liegt, durchaus noch Einfluss auf die DNA-Bindung haben kann, da in dieser Position sogenannte tightbinder Mutanten gefunden worden sind (Kolkhof, 1992). Daher wird der Fusionspunkt erst hinter Aminosäure S61 des Lac Repressor „headpiece“ gewählt, und dem Alignment entsprechend an Aminosäure D2 des Ribose bindenden Proteins gesetzt (siehe auch Abbildung 24).

	DNA-bindende Domäne	Induktor-bindende Domäne / core	Tetramerisierungs-Domäne/ four helical bundle
LacR	AS 1 - 60	AS 61 - 330	AS 331 - 360
Ribose Binding Protein (RBP)		AS 1 - 271	
Fusionsprotein: RBP-HP	AS 1 - 61	AS 2 - 271	

Abbildung 24: Darstellung der Domänen von Lac Repressor und RBP, sowie der Nummerierung der Aminosäuren, und des entsprechenden Fusionsproteins.

Das Fusionsprotein (siehe auch Abbildung 24) steht unter der Kontrolle des synthetischen 90 x I⁺-Promotors und ist anstelle des *lacI*-Gens in das Plasmid pWB1000 (Lehming *et al.*, 1988) kloniert (siehe auch Material & Methoden, Abschnitt 2.3.8.).

Wenn das RBP Ribose bindet, verläuft die allosterische Umlagerung allerdings in viel stärkerem Umfang als die allosterische Umlagerung infolge der Induktorbindung bei Lac Repressor (Mowbray & Björkman, 1999). Die offene Form, ohne gebundenen Liganden, weist bei RBP eine extrem weite Kluft zwischen den beiden Subdomänen des „core“ auf, so dass eine Dimerisierung aller Wahrscheinlichkeit nach nur in der geschlossenen Form möglich ist. Daher wurden sämtliche Experimente, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*, jeweils mit und ohne die Zugabe von D-Ribose durchgeführt.

3.5.3. *In vivo* Test des RBP-HP-Fusionsproteins

Mit dem Fusionsprotein RBP-HP wurde zunächst ein β -Gal-Test durchgeführt, sowohl mit als auch ohne D-Ribose als Induktor. Als Kontrollen wurden dimerer Wildtyp Lac Repressor sowie die monomere Mutante L251A mitgetestet. Die Ergebnisse dieses Tests sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

	spezifische β -Galaktosidase Aktivität	
	ohne D-Ribose	mit D-Ribose
ohne LacR	3600	3800
90 x I ⁺ _{dim}	2,1	1,3
90 x I ⁺ _{dim-L251A}	390	<i>n.g.</i>
90 x RBP-HP	3600	3800

Tabelle 11: β -Gal-Test des Fusionsproteins RBP-HP unter der Kontrolle des 90 x I⁺ Promotors aus pWB1000 (Lehming *et al.*, 1988). In der linken Spalte ist die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität ohne D-Ribose und in der rechten Spalte mit D-Ribose im Medium angegeben. Die Mutanten wurden in *E. coli* JMX8634R (Dong *et al.*, 1999) exprimiert. Die spezifische Aktivität ist ein Mittelwert aus jeweils 3 Kolonien mit jeweils 2 unabhängigen Messungen.

Wie in Tabelle 11 zu sehen ist, reprimiert das Fusionsprotein RBP-HP das *lac* Operon nicht. Die β -Galaktosidase-Aktivität in Gegenwart des Fusionsproteins entspricht den Werten ohne Lac Repressor. Auch der entsprechende *in vitro* Test zeigt keine Bindung des Fusionsproteins an idealen *lac* Operator.

Da das RBP *in vivo* als Monomer vorliegt, und außer dem Anfügen des Lac Repressor „headpiece“ nichts an dem nativen Protein verändert wurde, wird auch von dem Fusionsprotein noch keine Dimerbildung erwartet.

3.5.4. Einfügen von „Y282“ in das potentielle Dimerisierungsinterface von RBP

Als nächster Schritt wurden in dem potentiellen Dimerisierungsinterface des Fusionsproteins RBP-HP unter Berücksichtigung beider Alignments (siehe Abschnitt 3.5.1.) die Aminosäuren A223 und N225 unabhängig von einander mittels PCR-Mutagenese (siehe Material und Methoden, Abschnitt 2.3.9.) durch Tyrosin ersetzt. Die Ergebnisse des *in vivo* Tests dieser beiden Mutanten sind in Tabelle 12 dargestellt.

	spezifische β -Galaktosidase Aktivität	
	ohne D-Ribose	mit D-Ribose
ohne LacR	3600	3800
90 x I ⁺ _{dim}	2,1	1,3
90 x RBP-HP	3600	3800
90 x RBP-HP-A223Y	4050	3200
90 x RBP-HP-N225Y	4300	3800

Tabelle 12: β -Gal-Test der RBP-HP-Mutanten mit Austausch in der zu Y282 von Lac Repressor entsprechenden Position. Die Fusionsproteine stehen unter der Kontrolle des 90 x I⁺ Promotors aus pWB1000 (Lehming *et al.*, 1988). In der linken Spalte ist die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität ohne D-Ribose und in der rechten Spalte mit D-Ribose im Medium angegeben. Die Mutanten wurden in *E. coli* JMX8634R (Dong *et al.*, 1999) exprimiert. Die spezifische Aktivität ist ein Mittelwert aus jeweils 3 Kolonien mit jeweils 2 unabhängigen Messungen.

Keiner der beiden Austausche in der potentiellen Dimerisierungsoberfläche des Fusionsproteins RBP-HP zeigt Auswirkungen auf die Repression des *lac* Operons *in vivo*. Der entsprechende *in vitro* Test zeigt ebenfalls weder mit noch ohne Zugabe von D-Ribose Bindung der Mutanten an idealen *lac* Operator.

Da die *in vivo* Tests empfindlicher scheinen als die *in vitro* Tests und die *in vitro* Tests bisher zu keinem Ergebnis geführt haben, wurde im weiteren Verlauf auf Retardierungsgele verzichtet.

3.5.5. Kombination mit dem tightbinder P3Y

Da die vorausgegangenen Experimente gezeigt haben, dass der tightbinder P3Y (Kolkhof, 1992) in der Lage ist, die monomere Mutante L251A soweit zu stabilisieren, dass die Repression des *lac* Operons möglich ist (siehe auch Abschnitt 3.3.2.), wurde im weiteren Verlauf der Austausch P3Y in das Lac Repressor „headpiece“ des Fusionsproteins RBP-HP eingefügt. Die Ergebnisse des *in vivo* Tests der Mutanten mit P3Y sind in Tabelle 13 dargestellt.

	spezifische β -Galaktosidase Aktivität	
	ohne D-Ribose	mit D-Ribose
ohne LacR	3600	3800
$90 \times I_{dim}^+$	2,1	1,3
90 x RBP-P3Y-HP	3800	3100
90 x RBP-P3Y HP-A223Y	2100	1600
90 x RBP-P3Y-HP-N225Y	2350	1500

Tabelle 13: β -Gal-Test der RBP-HP-Mutanten in Kombination mit dem tightbinder P3Y. Die Fusionsproteine stehen unter der Kontrolle des $90 \times I^+$ Promotors aus pWB1000 (Lehming *et al.*, 1988). In der linken Spalte ist die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität ohne D-Ribose und in der rechten Spalte mit D-Ribose im Medium angegeben. Die Mutanten wurden in *E. coli* JMX8634R (Dong *et al.*, 1999) exprimiert. Die spezifische Aktivität ist ein Mittelwert aus jeweils 3 Kolonien mit jeweils 2 unabhängigen Messungen.

In dem Fusionsprotein zeigt der tightbinder P3Y nicht denselben Effekt, wie in der Kombination mit der monomeren Mutante L251A (siehe Abschnitt 3.3.2.). RBP-P3Y-HP allein beeinflusst die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität nicht. Die RBP-P3Y-HP Mutanten A223Y und N225Y jedoch reprimieren in Gegenwart von D-Ribose die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität um einen Faktor 2,3 bzw. 2,5 im Vergleich mit dem Hintergrund ohne jeden Repressor.

3.5.6. Kombination des Fusionsproteins mit einem „basictail“

Während tetramerer Lac Repressor eine stärkere Repression des *lac* Operons erreicht, indem er kooperativ an zwei Operatoren gleichzeitig bindet und eine DNA-Schleife bildet, kann dimerer Lac Repressor nur noch an einen Operator binden. Es konnte gezeigt werden, dass das Anbringen einer Polypeptidkette aus hauptsächlich basischen Resten an den C-Terminus des dimeren Lac Repressors die Repression *in vivo* erhöht (Kolkhof *et al.*, 1995). Dieser Effekt beruht auf der unspezifischen Bindung dieses sogenannten „basictail“ an DNA, was zu einer Schleifenbildung und damit zu einer Verminderung der Dissoziation des Lac Repressors vom *lac* Operator führt.

Diesen Effekt des „basictail“ kann man zur Stabilisierung von nur schwach bindenden Mutanten nutzen. Aus diesem Grund wurden die bisherigen Mutanten des Fusionsproteins RBP-HP sowie die monomere Lac Repressor Mutante L251A mit dem „basictail“ kombiniert. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Tabelle 14 dargestellt.

	spezifische β -Galaktosidase Aktivität	
	ohne D-Ribose	mit D-Ribose
ohne LacR	3600	3800
90 x I ⁺ -BT	0,6	<i>n. g.</i>
90 x I ⁺ -L251A-BT	33	<i>n. g.</i>
90 x RBP-HP-BT	3300	2300
90 x RBP-P3Y-HP-BT	2550	2350
90 x RBP-HP-A223Y-BT	2650	2700
90 x RBP-HP-N225Y-BT	2900	2200
90 x RBP-P3Y HP-A223Y-BT	4000	2900
90 x RBP-P3Y-HP-N225Y-BT	3600	2700

Tabelle 14: β -Gal-Test der RBP-HP-Mutanten mit „basictail“ (BT) Die Fusionsproteine stehen unter der Kontrolle des 90 x I⁺ Promotors aus pWB1000 (Lehming *et al.*, 1988). In der linken Spalte ist die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität ohne D-Ribose und in der rechten Spalte mit D-Ribose im Medium angegeben. Die Mutanten wurden in *E. coli* JMX8634R (Dong *et al.*, 1999) exprimiert. Die spezifische Aktivität ist ein Mittelwert aus jeweils 3 Kolonien mit jeweils 2 unabhängigen Messungen.

Das Ergebnis dieses Tests ist identisch mit den vorausgegangenen. Während der „basictail“ in der Lage ist die Repression der monomeren Mutante L251A um einen Faktor 10 zu verbessern (vergleiche auch Tabelle 11, Seite 58), hat der „basictail“ auf die Repression des Fusionsproteins so gut wie keinen Einfluss. Die gemessene β -Galaktosidase-Aktivität ist insgesamt erniedrigt, wenn die Kulturen mit D-Ribose als Induktor gewachsen sind.

3.5.7. KRK-Sequenz und „four-helical-bundle“

Es konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass die Aminosäuresequenz KRK am C-Terminus des Lac Repressors an Position 325 bis 327 essentiell für die Stabilität des Proteins ist (Li & Matthews, 1995). Da diese Sequenz dem nativen RBP fehlt, wurde sie an verschiedenen Positionen des Fusionsproteins eingefügt, um zu überprüfen, ob sie irgendeinen stabilisierenden Effekt hat. Die unterschiedliche Positionierung dieser Sequenz ergab sich durch die unterschiedlichen Alignments jenseits der jeweils dritten Helix der potentiellen Dimerisierungsregion (siehe auch Abschnitt 3.5.1.). Die Ergebnisse des β -Gal-Tests für das Fusionsprotein RBP-HP mit eingefügter KRK-Sequenz an unterschiedlichen Positionen am C-Terminus sind in Tabelle 15 dargestellt.

	spezifische β -Galaktosidase Aktivität	
	ohne D-Ribose	mit D-Ribose
ohne LacR	3600	3800
90 x I ⁺ _{dim}	2,1	1,3
90 x I ⁺ _{dim-L251A}	390	<i>n.g.</i>
90 x RBP-HP	3600	3800
90 x RBP-HP-268KRK	2800	2100
90 x RBP-HP-269KRK	2650	2050
90 x RBP-HP-270KRK	2800	2350
90 x RBP-HP-271KRK	2900	2150

Tabelle 15: β -Gal-Test der RBP-HP-Mutanten mit der KRK-Sequenz. Die KRK-Sequenz wurde jeweils hinter Aminosäure 268, 269, 270 oder 271 des RBP-HP-Fusionsproteins eingefügt, so dass das Protein mit der Aminosäuresequenz KRKT endet. Die Fusionsproteine stehen unter der Kontrolle des 90 x I⁺ Promotors aus pWB1000 (Lehming *et al.*, 1988). Die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität ohne D-Ribose ist in der linken Spalte und mit D-Ribose im Medium in der rechten Spalte angegeben. Die Mutanten wurden in *E. coli* JMX8634R (Dong *et al.*, 1999) exprimiert. Die spezifische Aktivität ist ein Mittelwert aus jeweils 3 Kolonien mit jeweils 2 unabhängigen Messungen.

Die Mutanten des Fusionsproteins RBP-HP mit der KRK-Sequenz am C-Terminus zeigten allerdings keine Veränderungen in ihrem *in vivo* Verhalten. Auch die Kombinationen der KRK-Sequenz mit den Austausch P3Y, A223Y, N225Y, sowie den Doppelaustauschen P3Y-A223Y und P3Y-N225Y änderten die spezifischen β -Galaktosidase-Aktivitäten *in vivo* nicht.

Als nächster Schritt wurde versucht das Fusionsprotein durch das Anhängen der Tetramerisierungsregion des Lac Repressors zu stabilisieren. Dazu wurde Codon 329 bis 360 aus pWB1000 (Lehming *et al.*, 1988) mittels PCR herausamplifiziert und dem Alignment von Weickert und Adhya (1992) folgend an Aminosäure 271 des RBP in dem Fusionsprotein

RBP-HP kloniert. Die Ergebnisse des *in vivo* Tests mit diesen Mutanten sind in Tabelle 16 dargestellt.

	spezifische β -Galaktosidase Aktivität	
	ohne D-Ribose	mit D-Ribose
ohne LacR	3600	3800
90 x I ⁺ _{dim}	2,1	1,3
90 x I ⁺ _{dim-L251A}	390	<i>n.g.</i>
90 x RBP-HP-4HB	2600	1900
90 x RBP-HP-A223Y-4HB	2700	1750
90 x RBP-HP-N225Y-4HB	2700	1850

Tabelle 16: β -Gal-Test der RBP-HP-Mutanten mit C-terminalen „four-helical-bundle“ (4HB) Die Fusionsproteine stehen unter der Kontrolle des 90 x I⁺ Promotors aus pWB1000 (Lehming *et al.*, 1988). Die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität ohne D-Ribose ist in der linken Spalte und mit D-Ribose im Medium in der rechten Spalte angegeben. Die Mutanten wurden in *E. coli* JMX8634R (Dong *et al.*, 1999) exprimiert. Die spezifische Aktivität ist ein Mittelwert aus jeweils 3 Kolonien mit jeweils 2 unabhängigen Messungen.

Auch in diesem Test ist die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität niedriger, wenn man dem Medium D-Ribose als Induktor zusetzt. Bei dem Fusionsprotein RBP-HP-4HB, sowie bei den Mutanten RBP-HP-A223Y-4HB und RBP-HP-N225Y-4HB ergibt sich unter Zugabe von Ribose ein Faktor 2 in Bezug auf den Hintergrund ohne jeden Repressor.

3.5.8. Negative Dominanz

Unabhängig von den bisherigen Versuchen durch Austausch des monomere Ribose bindende Protein in ein DNA-bindendes Protein umzuwandeln, wurde zusätzlich mit den Mutanten in der potentiellen Dimerisierungsoberfläche ein Test auf negative Dominanz durchgeführt. Dieser Test sollte zeigen, ob das potentielle Dimerisierungsinterface von RBP in der Lage ist, mit Wildtyp Lac Repressor zu heterodimerisieren.

Für diesen Test auf Negative Dominanz wurden im „headpiece“ des Fusionsproteins RBP-HP die Aminosäuren 14 bis 60 deletiert. Diese Deletion ist analog zu den 90 x I^d-Konstrukten der Lac Repressor Varianten zum Test auf Negative Dominanz. Als Hintergrund diente der *E. coli* Stamm CSH33. Die Ergebnisse dieses Tests sind in Tabelle 17 dargestellt.

Wie bei den bisherigen Testergebnissen mit den RBP-HP-Fusionsproteinen ist die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität unter der Zugabe von D-Ribose zum Medium niedriger.

	spezifische β -Galaktosidase Aktivität	
	ohne D-Ribose	mit D-Ribose
1 x I _{tet} ⁺ + IPTG	7400	5200
1 x I _{tet} ⁺	7	4,7
1 x I _{tet} ⁺ + 90 x RBP- Δ HHP	10	5,1
1 x I _{tet} ⁺ + 90 x RBP- Δ HHP-T203E	9,2	5,8
1 x I _{tet} ⁺ + 90 x RBP- Δ HHP-A223Y	9,7	9,1
1 x I _{tet} ⁺ + 90 x RBP- Δ HHP-N225Y	10	8,7

Tabelle 17: β -Gal-Test auf negative Dominanz von RBP über Wildtyp Lac Repressor. Als Hintergrund dient der *E. coli* Stamm CSH33 der 1 x I_{tet}⁺ tetrameren Wildtyp Lac Repressor chromosomal exprimiert. Die pRBP- Δ HHP-Plasmide exprimieren 3600 Fusionsproteine pro Zelle. Sie haben durch die Deletion der Aminosäuren 14 bis 60 kein funktionelles „headpiece“ (Lehming *et al.*, 1987). In der linken Spalte ist die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität ohne D-Ribose und in der rechten Spalte mit D-Ribose im Medium angegeben. Eine niedrige spezifische β -Galaktosidase-Aktivität in diesem Test bedeutet wenig bzw. gar keine Interaktion zwischen dem chromosomalen Lac Repressor und dem Fusionsprotein. Die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität ist jeweils ein Mittelwert aus drei Kolonien und zwei voneinander unabhängigen Messungen.

Insgesamt zeigt aber weder das RBP allein, noch das RBP mit Austausch in der potentiellen Dimerisierungsregion, Anzeichen für eine mögliche Heterodimerisierung mit Wildtyp Lac Repressor.

4. Diskussion

Die meisten Repressoren der LacR-GalR-Familie in *E. coli* erfüllen ihre Funktion als Dimer, nur wenige sind tetramer wie der Lac Repressor. Die Dimerisierung der einzelnen Repressoren ist spezifisch, es gibt bisher keine Hinweise auf eine Heterodimerisierung zwischen homologen Repressoren. Daraus folgt, dass es einen Mechanismus geben muss, der eine Heterodimerisierung verhindert, und die spezifische Dimerisierung von zwei Monomeren ermöglicht. Darüber hinaus gibt es in *E. coli* die periplasmatischen zuckerbindenden Proteine, die durchweg alle monomer vorkommen, obwohl sie innerhalb des „core“ eine hohe strukturelle Homologie zu den dimeren und tetrameren Repressoren aufweisen. Auch hier muss ein Weg gefunden werden, um Dimerisierung generell zu vermeiden.

Die Eingrenzung der für die Dimerisierung in Frage kommenden Reste auf 15 Aminosäuren für den Lac Repressor (Suckow *et al.*, 1996; Pace *et al.*, 1997) war der erste entscheidende Schritt zur Aufklärung der spezifischen Dimerisierung.

4.1. Alignment der LacR-GalR-Familie

Die Austausche im Dimerisierungsinterface von Lac Repressor, wurden in der Regel in Homologie zu anderen Mitgliedern der LacR-GalR-Familie gemacht. Dabei wurde das Alignment der LacR-GalR-Familie von Suckow *et al.* (1996) (Abbildung 25) zugrunde gelegt.

	221	222	223	226	251	254	255	258	259	278	280	281	282	283	285
LacR	S	A	M	F	L	M	R	T	E	D	S	C	Y	I	P
PurR	E	P	E	Y	M	L	C	D	E	N	R	Y	F	T	A
AscG	T	P	A	A	I	M	K	H	E	I	P	Y	T	V	A
GalS	D	M	P	E	A	L	T	K	D	I	R	Y	T	D	Q
CytR	T	F	E	S	L	L	S	K	R	L	Q	F	C	D	P
GalR	D	E	S	E	A	M	G	N	D	V	R	Y	V	R	R
RafR	T	R	R	Y	D	A	M	Q	L	Q	S	I	I	E	D

Abbildung 25: Alignment der Aminosäuren der Dimerisierungsoberfläche von Lac Repressor mit den analogen Resten einiger Mitglieder der LacR-GalR-Familie (nach Suckow *et al.*, 1996). Die 15 Aminosäuren, die die Dimerisierungsoberfläche von Lac Repressor bilden (Friedmann *et al.*, 1995; Lewis *et al.*, 1996; Suckow *et al.*, 1996; Pace *et al.*, 1997), sind in der obersten Spalte angegeben. Die diesen Positionen entsprechenden Reste (Farabough, 1978) sind fettgedruckt. Die analogen Reste von GalR (von Wilcken-Bergmann & Müller-Hill, 1982), GalS (Weickert & Adhya, 1992b), PurR (Rolfes & Zalkin, 1988), AscG (Hall & Xu, 1992), RafR (Aslanidis & Schitt, 1990) und CytR (Valentin-Hansen *et al.*, 1986), die hier dargestellt werden, basieren auf dem Alignment von Suckow *et al.* (1996). Dort wo Aminosäuren vorkommen, die identisch mit denen von Lac Repressor sind, sind diese ebenfalls fettgedruckt. Die Seitenketten der Reste S221, M254, T258, E259, S280 und P285 sind eher in die Richtung des eigenen „core“ orientiert, während die Seitenketten der Aminosäuren A222, M223, F226, L251, R255, D278, C281, Y282 und I283 eher zu dem „core“ des gegenüberliegenden Monomers zeigen. Diese Reste wurden grau unterlegt.

Es existieren verschiedene Alignments für die Mitglieder der LacR-GalR-Familie (Weickert & Adhya, 1992; Suckow *et al.*, 1996), die im großen und ganzen miteinander übereinstimmen. Aber gerade in Bezug auf die drei Dimerisierungshelices des Lac Repressors und die entsprechenden Helices der anderen Mitglieder der LacR-GalR-Familie gibt es oftmals Differenzen. Die erste und zweite Helix der Dimerisierungsfläche (Helix 10 und 11 nach Lewis *et al.*, 1996) sind mit 12 Aminosäuren (siehe auch Abbildung 7, Seite 9) relativ lang und machen ein exaktes Alignment in diesem Bereich möglich. Die dritte Dimerisierungshelix des Lac Repressors (Helix 12 nach Lewis *et al.*, 1996) ist dagegen sehr kurz, und umfasst gerade einen Turn (siehe auch Abbildung 7, Seite 9). Die entsprechende Helix der übrigen Mitglieder der LacR-GalR-Familie sowie der periplasmatischen zuckerbindenden Proteine ist wesentlich länger. Diese Tatsache macht ein Alignment der Aminosäuresequenzen im Bereich der dritten Helix des Dimerisierungsinterfaces schwierig. So ist zum Beispiel das Alignment nach Weickert und Adhya (1992) im Gegensatz zu dem Alignment nach Suckow *et al.* (1996) um eine Aminosäure verschoben. Dadurch zeigt das Alignment von Weickert & Adhya (1992) eine hohe Konservierung in allen Mitgliedern der LacR-GalR-Familie für ein Tyrosin, das bei Lac Repressor Position 282 einnimmt. Diese mögliche Konservierung der Position wird zusätzlich unterstrichen, durch die entscheidende Bedeutung der Position 282 innerhalb der Dimerisierungsfläche von Lac Repressor, die sich sowohl in früheren Arbeiten (Schmitz *et al.*, 1976; Chakerian & Matthews, 1991), als auch im Rahmen dieser Arbeit herausgestellt hat.

Trotzdem wurde dieser Arbeit das Alignment von Suckow *et al.* (1996) aus zwei Gründen zugrunde gelegt:

1. Die Aminosäureaustausche an Position 281, die nach dem Alignment von Weickert & Adhya (1992b) in Homologie zu PurR, GalR und GalS gemacht wurden, verhinderten die Dimerisierung des Lac Repressors.
2. Das Alignment nach Suckow *et al.* (1996) wurde im Gegensatz zu den früheren Alignments in Kenntnis der Kristallstrukturen von Lac Repressor (Friedmann *et al.*, 1995; Lewis *et al.*, 1996) und von Pur Repressor (Schumacher *et al.*, 1994; 1995) erstellt und an diese angepasst. Im direkten Vergleich der zwei Kristallstrukturen scheint das Alignment nach Suckow *et al.* (1996) angemessener.

Vergleicht man die 15 Reste der Dimerisierungsregion von Lac Repressor mit den analogen Aminosäuren der Mitglieder PurR, AscG, GalS, CytR, GalR und RafR der LacR-GalR-Familie, so findet man eine hohe Divergenz in der Zusammensetzung der potentiellen

Dimerisierungsoberflächen (siehe Abbildung 25, Seite 64). Diese Tatsache ist bemerkenswert im Hinblick auf die hohe Strukturhomologie und die generell hohe Sequenzhomologie innerhalb dieser Familie (Weickert & Adhya, 1992; Lewis *et al.*, 1996; Schumacher *et al.*, 1994; 1995). Sogar so eng miteinander verwandte Proteine wie GalR und GalS haben lediglich 6 der 15 Reste gemeinsam (siehe Abbildung 25, Seite 64).

In einigen Fällen sind allerdings generelle Tendenzen erkennbar. So scheint zum Beispiel der hydrophobe Rest an der Position 254 von Lac Repressor konserviert zu sein. Der Austausch dieser Position in Lac Repressor gegen eine geladene Aminosäure oder Prolin führt auch im tetrameren Hintergrund zu einem Funktionsverlust (Suckow *et al.*, 1996). Der Austausch gegen Alanin, d. h. gegen eine wesentlich kürzere Seitenkette, hat auf den tetrameren Repressor keine Auswirkungen, im dimeren Repressor allerdings sinkt die Repression auf 9 % der entsprechenden Repression des Wildtyp Lac Repressors (Spott, 1998). Ähnlich verhält es sich mit der negativen Ladung an Position 259, auch hier scheint eine Konservierung vorzuliegen (siehe Abbildung 25, Seite 64). Tauscht man E259 im tetrameren Lac Repressor gegen einen positiv geladenen Rest oder Prolin aus, so erhält man keinen funktionellen Repressor mehr, während hydrophobe Austausche im Tetramer neutral sind (Suckow *et al.*, 1996). Nur im dimeren Hintergrund zeigt sich, dass hydrophobe Substitutionen an Position 259 die Stabilität des Interface beeinträchtigen (Spott, 1998; Kaup, 2001). Diese Beobachtungen legen nahe, dass diese Seitenketten eher die Struktur stabilisieren, da sie auch mehr in Richtung des eigenen „core“ ausgerichtet sind (siehe auch Abbildung 25, Seite 64).

4.2. Die Spezifitätsänderung D278L

Mit dem Austausch von Position 278 im Monomer-Monomer-Interface von Lac Repressor von Asparaginsäure zu Leucin wurde eine Änderung der Dimerisierungsspezifität von Lac Repressor erreicht. Die Mutante D278L reprimiert das *lac* Operon im dimeren Hintergrund ebenso stark wie der dimere Wildtyp Lac Repressor. Des Weiteren werden von dieser Mutante mit Wildtyp Lac Repressor keine Heterodimere gebildet, wie die reziproken Tests auf negative Dominanz beweisen (siehe auch Tabelle 1, Seite 34, Abbildung 18, Seite 35 und Tabelle 3, Seite 41).

Der Aminosäureaustausch D278L wurde in Homologie zu CytR kloniert (siehe auch Abbildung 25, Seite 64). Eine frühere Studie, die ebenfalls diese Mutation in einem anderen Zusammenhang analysiert hat, gibt an, dass diese Mutante einen I^S -Phänotyp hat (Barry & Matthews, 1999). Diese Tatsache konnte in der vorliegenden Arbeit nicht verifiziert werden. Als $1 \times I^+$ Tetramer auf dem Chromosom ist die Mutante D278L in diesem Testsystem

komplett mit IPTG induzierbar (siehe auch Tabelle 3, Seite 41). Außerdem wächst sie auf Laktose Minimalplatten und zeigt den erwarteten Phänotyp auf Indikatorplatten mit Laktose, sowohl auf McConkey-Platten als auch auf EMB-Platten.

4.2.1. Mögliche Kontakte

Um den Dimerisierungsmechanismus von Lac Repressor aufzuklären, muss man sich zuerst die Frage stellen, welche Interaktionen überhaupt stattfinden können. Die Position L251 nimmt eine Schlüsselfunktion im Dimerisierungsinterface ein, aber der Abstand zwischen den Seitenketten von L251 über das Interface ist zu weit ($L251C^{\delta}:L251C^{\delta} > 6 \text{ \AA}$) für eine direkte Interaktion mit sich selbst. Eine Möglichkeit zur Interaktion bietet die Position D278 auf dem gegenüberliegenden Monomer. Allerdings ist für den Kontakt nicht die Säurefunktion sondern der hydrophobe Teil der Seitenkette erforderlich. Der Abstand zwischen C^{β} von D278 und C^{δ} von L251 des anderen Monomers beträgt $4,12 \text{ \AA}$. Die restliche Seitenkette von D278 ist in Richtung der Induktorbindungstasche ausgerichtet, wo sie in der IPTG-gebundenen Form mit H74 interagiert (Bell & Lewis, 2000, 2001; Barry & Matthews, 1999).

4.2.2. Ausrichtung der Seitenkette in Position 278

Frühere Studien haben gezeigt, dass man an Position 278 im tetrameren Hintergrund viele Austausche vornehmen kann, ohne die Funktion des Repressors einzuschränken (Suckow *et al.*, 1996). Lediglich die Substitution von D278 durch die positiv geladenen Aminosäuren Arginin und Lysin führen auch im tetrameren Hintergrund zum weitgehenden Funktionsverlust (Suckow *et al.*, 1996; Kaup, 2001).

Fügt man in die Position 278 statt Asparaginsäure Glutaminsäure ein, so findet man trotz längerer Seitenkette keinen Unterschied zwischen dem Verhalten der Mutante und des Wildtyp Lac Repressors. Dies ist nicht verwunderlich, da die negative Ladung und anscheinend auch die Ausrichtung der Seitenkette erhalten bleiben (siehe auch Abschnitt 3.4.2).

Auswirkungen auf die Repression des *lac* Operons beobachtet man mit allen hydrophoben Seitenketten in Position 278. So kommt z. B. die Mutante D278A mit 50 % Repression als Homodimer und 50 % Repression als Heterodimer (siehe auch Abschnitt 3.1.2. und Tabelle 1, Seite 34) zusammen mit der Mutante L251M hinter der idealen Spezifitätsänderung D278L einer Spezifitätsänderung am nächsten. Durch den Austausch zu Alanin bleibt von der vorher vorhandenen Seitenkette allein das C^{β} übrig, d. h. die mit L251 des anderen Monomers interagierende Position. Die Mutanten von D278 mit hydrophoben Austausch verhalten sich

alle ähnlich. So ist auch die Mutante D278V nicht mehr in der Lage Heterodimere mit Wildtyp Lac Repressor zu bilden (87 % Repression im Test auf Negative Dominanz, siehe Tabelle 1, Seite 34), und die Mutante D278I verhält sich ebenso (71 % Repression im Test auf Negative Dominanz, siehe Tabelle 1, Seite 34). Dass diese beiden Mutanten nicht mehr in der Lage sind vollständig Homodimere zu bilden (D278V = 11 % Repression des *lac* Operons, D278I = 20 % Repression des *lac* Operons, siehe Tabelle 1, Seite 34), liegt vermutlich an einer ungünstigen Ausrichtung der hydrophoben Seitenkette. Abbildung 26 zeigt die hydrophoben Aminosäuren Alanin, Valin, Leucin und Isoleucin, die an Position 278 eingefügt wurden, sowie die ursprünglich vorhandene Asparaginsäure.

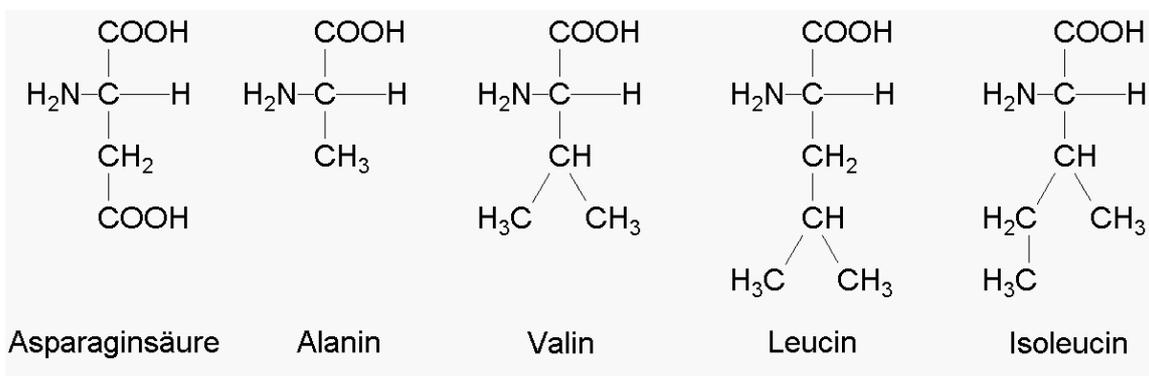


Abbildung 26: Darstellung der Seitenketten der an Position 278 eingefügten Aminosäuren.

Wie oben beschrieben interagiert nur das C^β der Asparaginsäure an Position 278 mit dem C^δ von L251, die Säurefunktion der Seitenkette ist in Richtung der Induktorbindingstasche ausgerichtet. Bei Alanin fällt dieser Teil der Seitenkette weg, und es ist nur noch das C^β vorhanden, was zwar noch interagieren kann, aber vermutlich relativ frei beweglich ist. Bei Valin müssen die beiden CH₃-Gruppen denselben Raum belegen, wie vorher die Säurefunktion, was mit Sicherheit zu einer sterischen Behinderung führt. Ebenso verhält es sich vermutlich mit Isoleucin. Nur Leucin kann sich so ausrichten, dass es zu einer Änderung der Dimerisierungsspezifität führt.

Wie die Ausrichtung der hydrophoben Seitenkette in der Spezifitätsänderung D278L womöglich aussieht, wurde anhand der Kristallstrukturdaten modelliert (Abbildungen 27 und 28). Abbildung 27A und 28A zeigen jeweils die Wildtyp Situation. Vor allen Dingen in Abbildung 27A kann man sehen, dass jeweils das L251 des einen Monomers über das Interface einen Kontakt mit D278 des anderen Monomers eingeht, und dass zwischen diesen beiden Kontakten eine Kluft liegt.

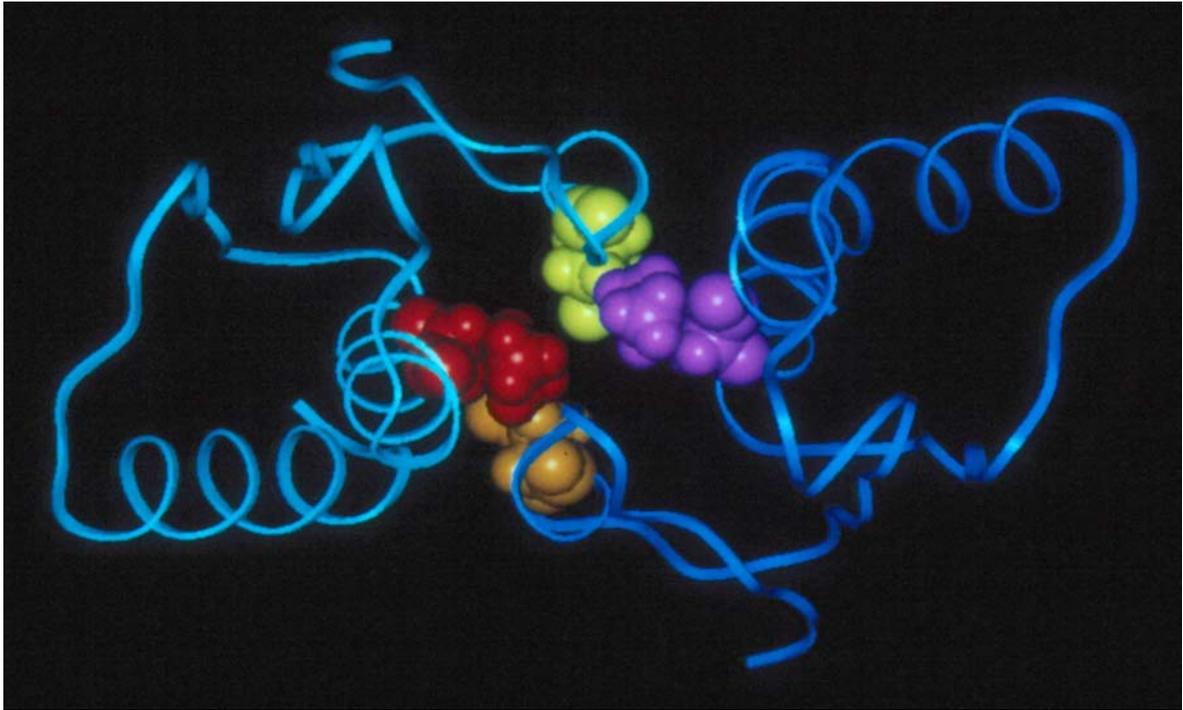
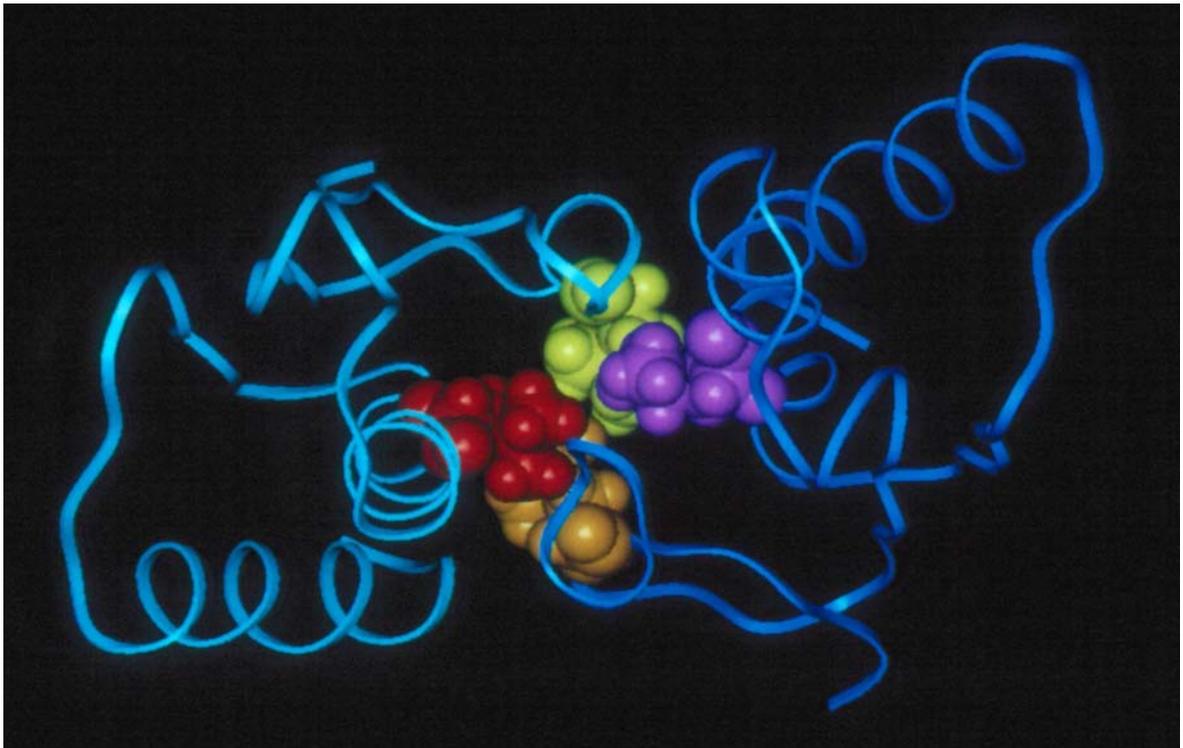
A**B**

Abbildung 27: Modell des Monomer-Monomer-Interface von Wildtyp Lac Repressor und der Mutante D278L. Das Dimer wird von oben gezeigt. Lediglich die Aminosäuren 220 bis 290 eines Lac Repressor Dimers, inklusive der Helices 10, 11 und 12 (nach Lewis *et al.*, 1996) der Dimerisierungsoberfläche jedes Monomers, sind dargestellt. Das eine Monomer ist in hellblau abgebildet, und das andere Monomer in dunkelblau dargestellt. A). Modell des Wildtyp Lac Repressors. Die Seitenketten von Leucin 251 in Helix 11 der beiden Monomere sind jeweils in lila und rot dargestellt. Die Seitenketten von Asparaginsäure 278 in Helix 12 der beiden Monomere sind jeweils in gelb und orange gezeigt. B). Modell des Austauschs D278L. Die Farben der einzelnen Seitenketten sind mit A) identisch.

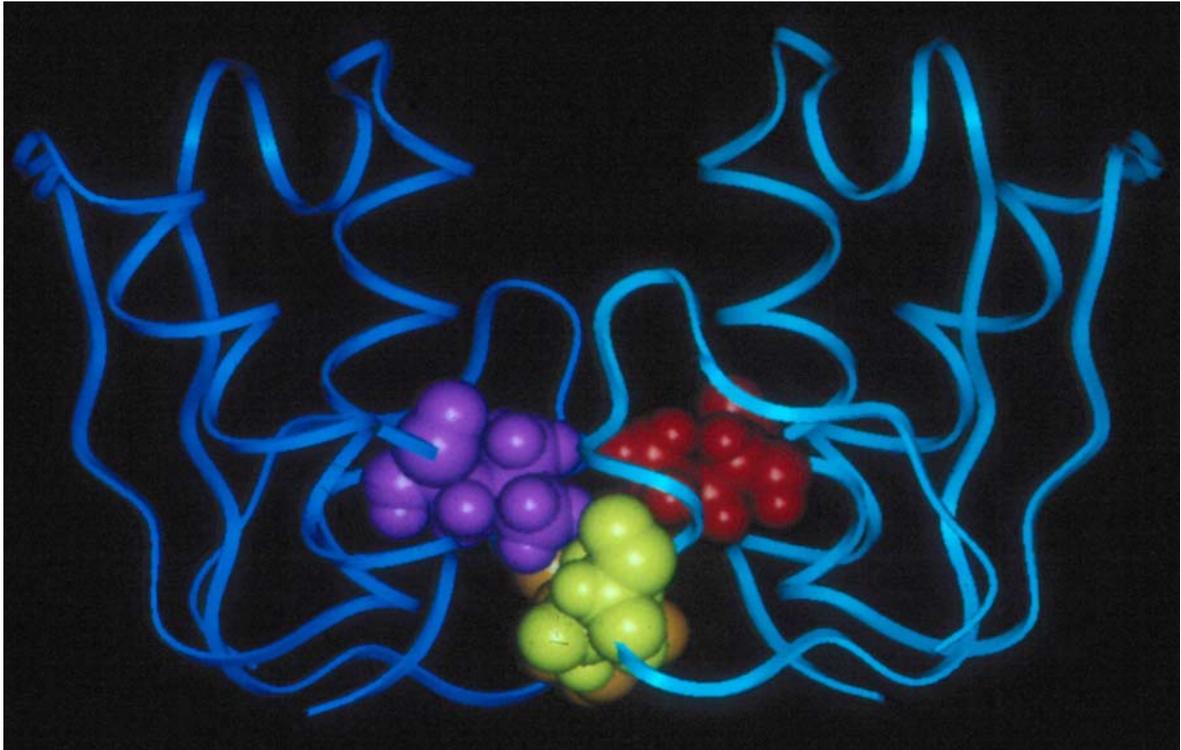
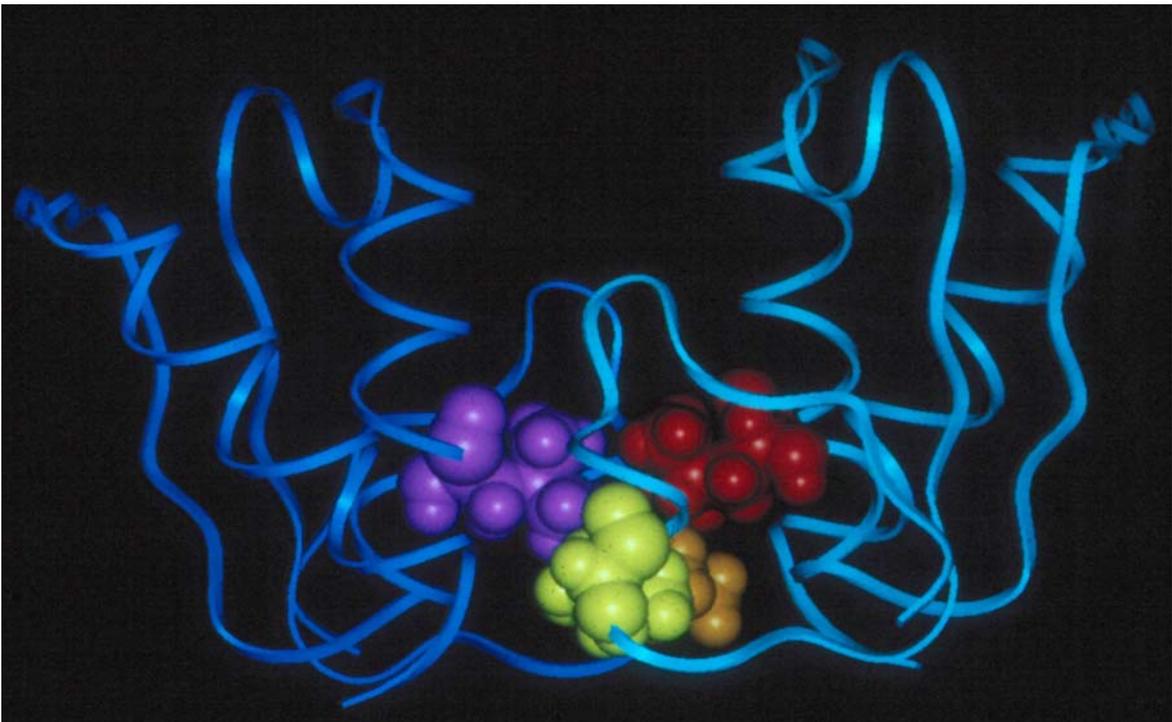
A**B**

Abbildung 28: Modell des Monomer-Monomer-Interface von Wildtyp Lac Repressor und der Mutante D278L. Das Dimer wird von der Seite gezeigt, der C-Terminus ist oben. Lediglich die Aminosäuren 220 bis 290 eines Lac Repressor Dimers, inklusive der Helices 10, 11 und 12 (nach Lewis *et al.*, 1996) der Dimerisierungsoberfläche jedes Monomers, sind dargestellt. Das eine Monomer ist in hellblau abgebildet, und das andere Monomer ist in dunkelblau dargestellt. A). Modell des Wildtyp Lac Repressors. Die Seitenketten von Leucin 251 in Helix 11 der beiden Monomere sind jeweils in lila und rot dargestellt. Die Seitenketten von Asparaginsäure 278 in Helix 12 der beiden Monomere sind jeweils in gelb und orange gezeigt. B). Modell des Austauschs D278L. Die Farben der einzelnen Seitenketten sind wie in A).

In Abbildung 27B und 28B ist jeweils das modellierte Interface der Spezifitätsänderung D278L dargestellt. Durch den D278L Austausch verändert sich die Interaktion. Während im Wildtyp Lac Repressor nur der intermolekulare Kontakt zwischen dem C^δ von L251 und dem C^β von D278 besteht (siehe auch Abschnitt 4.2.1.), werden nach dem Austausch auch intramolekulare Kontakte möglich. Der ursprüngliche Kontakt zwischen D278 und L251 von einem Monomer zum anderen wird schwächer, da die Distanz zwischen dem C^δ von D278L des einen Monomers und dem C^δ von L251 des anderen Monomers mit nunmehr 5,46 Å zu groß ist für eine direkte Interaktion. Dafür kann ein neuer intermolekularer Kontakt entstehen mit einer Distanz von 3,92 Å zwischen dem C^δ von L278 des einen Monomers und dem C^δ von L278 des anderen Monomers. Die Distanz zwischen dem C^δ von L278 und dem C^δ von L251 innerhalb desselben Monomers beträgt 4,09 Å. So kann ein hydrophobes Cluster entstehen, das besonders deutlich in dem Modell in Abbildung 28B zu sehen ist.

4.2.3. Vermeidung von Heterodimerisierung

Es gibt zwei mögliche Gründe, warum eine Heterodimerisierung der Mutanten mit Wildtyp Lac Repressor nicht mehr möglich ist. Ein Grund ist die Herabsetzung der Assoziationskonstante des Dimers. Wenn schon die Fähigkeit einer Mutante mit sich selbst zu dimerisieren gering ist, dann ist in den meisten Fällen auch die Fähigkeit, Heterodimere mit Wildtyp Lac Repressor zu bilden, nicht mehr vorhanden (siehe auch Abschnitt 3.1.2, Tabelle 1, Seite 34 und Abbildung 18, Seite 35). Dies konnte vor allem für die Mutante L251A detailliert gezeigt werden (siehe auch Abschnitt 3.1.2, Tabelle 1, Seite 34 und Abbildung 18, Seite 35, Dong et al., 1999).

Die zweite Möglichkeit zur Vermeidung von Heterodimeren ist die sterische Behinderung des ursprünglichen Kontaktes im Dimerisierungsinterface oder schlicht der Verlust des Kontaktes. In diesem Fall kann eine Spezifitätsänderung wie die Mutante D278L entstehen. Tatsächlich ist ein Verlust der ursprünglichen Kontakte der Grund, warum die Mutante D278L keine Heterodimere mit Wildtyp Lac Repressor bilden kann.

In Abbildung 29 sind die Kontakte, die zum Verlust der Fähigkeit der Mutante D278L Heterodimere mit Wildtyp Lac Repressor zu bilden führen, noch mal schematisch dargestellt. Abbildung 29A zeigt die Wildtyp Situation mit dem Kontakt zwischen dem C^β von D278 zu dem C^δ von L251 über das Interface. Fügt man nun die Mutation D278L ein, dargestellt in Abbildung 29B, so verändert sich die Art der Interaktion. Während der Ursprungskontakt zwischen L278 und L251 schwächer wird (L251 C^δ : L278 C^δ beträgt 5,46 Å, und ist damit viel zu weit entfernt für eine direkte Interaktion), kann sich ein neuer Kontakt zwischen L278

C^δ : L278 C^δ entwickeln (3,92 Å), der durch einen intramolekularen Kontakt innerhalb des selben Monomers zwischen L251 C^δ : L278 C^δ (4,09 Å) weiter stabilisiert werden kann.

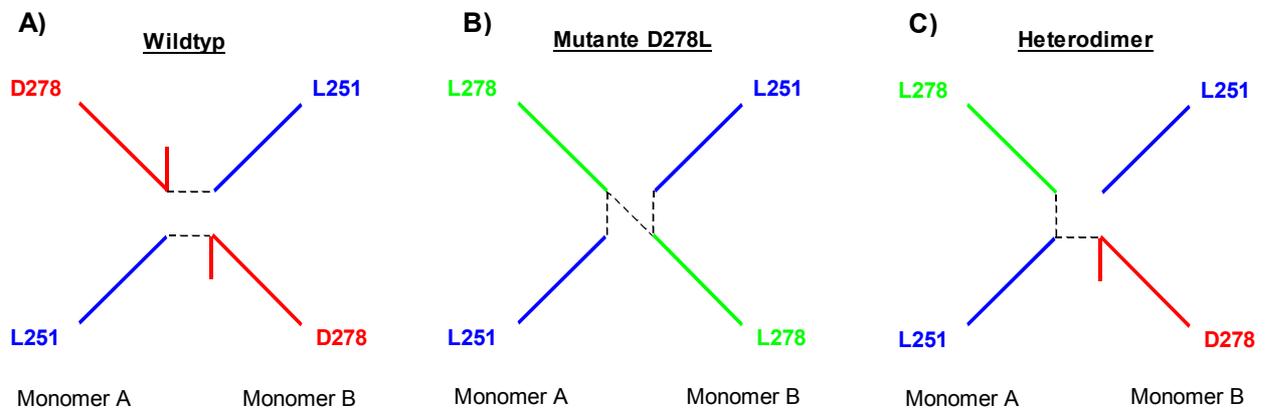


Abbildung 29: Schematische Darstellung der Kontakte zwischen Position 251 und Position 278 im Wildtyp Lac Repressor, der Mutante D278L sowie dem nicht vorhandenen hypothetischen Heterodimer. Dargestellt ist jeweils links das eine Monomer und rechts das andere Monomer. Die Aminosäure L251 ist in blau dargestellt. Zur besseren Unterscheidung ist die Aminosäure D278 rot und der Austausch L278 grün markiert. Die gestrichelten Linien im Zentrum stellen die möglichen Interaktionen dar.

Die Situation im hypothetischen Heterodimer ist in Abbildung 29C dargestellt. Der ursprüngliche Wildtyp-Kontakt zwischen C^β von D278 und dem C^δ von L251 über das Interface kann nur noch einmal ausgebildet werden. Auf der Seite der D278L-Mutante wird der intramolekulare Kontakt zwischen L251 C^δ und L278 C^δ vermutlich zu einer Ablenkung der Seitenkette von L251 führen, und dadurch den einzelnen Kontakt zwischen D278 und L251 soweit destabilisieren, dass Heterodimere kaum noch nachweisbar sind.

4.3. Die Position L251

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass insgesamt 15 Aminosäuren an der Dimerisierung von Lac Repressor beteiligt sind (Suckow *et al.*, 1996). Von diesen 15 Positionen der Dimerisierungsregion von Lac Repressor zeigen die Positionen L251 und Y282 die geringste Toleranz gegenüber Austausch, was auf eine zentrale Stellung innerhalb des Dimerisierungsmechanismus von Lac Repressor schließen lässt. Sowohl die Position L251 als auch die Position Y282 tolerieren jeweils nur 2 von 12 möglichen Austausch im tetrameren Hintergrund, die meisten Substitutionen führen zu einem konstitutiven Phänotyp (Suckow *et al.*, 1996; Pace *et al.*, 1997). Für Austausch an Position 282 wurde zudem bereits gezeigt, dass die Mutanten als Monomere vorliegen und damit nicht mehr in der Lage sind, das *lac* Operon zu reprimieren (Schmitz *et al.*, 1976; Daly & Matthews, 1986; Chakerian & Matthews, 1991).

Innerhalb des Monomer-Monomer-Interfaces von Lac Repressor nimmt die Position L251 eine zentrale Stellung ein. Sie liegt in der Mitte von Helix 11 (nach Lewis *et al.*, 1996), die der zweiten Dimerisierungshelix entspricht, und ihre Seitenkette ist in Richtung des anderen Monomers ausgerichtet. Ein Kontakt mit sich selbst über das Interface ist aber ausgeschlossen (siehe auch Abschnitt 4.2.1.), da die Distanz von mehr als 6 Å zu groß ist für eine direkte Interaktion. Verkürzt man diese Distanz aber, wie z. B. mit dem Austausch von L251M, so kann eine direkte Interaktion möglich werden. Die Mutante L251M mit immerhin 49 % Repression des *lac* Operons als Homodimer und 67 % Repression als Heterodimer im Test auf Negative Dominanz (siehe auch Abschnitt 3.1.2, Tabelle 1, Seite 34 und Abbildung 18, Seite 35) kommt daher einer Spezifitätsänderung schon ziemlich nahe.

4.3.1. Die monomere Mutante L251A

Durch die zentrale Lage von L251 in der Mitte des Dimerisierungsinterface bieten sich viele Kontaktmöglichkeiten. Die Abstände zu den Aminosäuren D278, C281 und Y282 des anderen Monomers, sowie zu Y282 des selben Monomers bewegen sich um 4 Å, und sind für direkte Interaktionen geeignet. Dass eine direkte Interaktion zwischen L251 und D278 stattfindet, konnte durch die Spezifitätsänderung D278L bereits gezeigt werden (siehe auch Abschnitt 4.2. sowie die Abbildungen 27 und 28, Seite 69 und 70).

Der Austausch L251 zu Alanin wurde gewählt, um die Kontakte zum gegenüberliegenden Monomer zu eliminieren, und Platz für neue Kontakte mit neuen Resten des gegenüberliegenden Monomers zu schaffen. Außerdem war aus früheren Studien bekannt, dass die Mutation L251A keine Auswirkungen auf das Repressionsverhalten im tetrameren Hintergrund hat (Suckow *et al.*, 1996). Um das Dimerisierungsverhalten dieser Mutante genauer zu analysieren, wurde auf die C-terminale Tetramerisierungsregion verzichtet.

In vitro zeigt die Mutante L251A im dimeren Hintergrund bei hohen Proteinkonzentrationen durchaus Bindung an idealen *lac* Operator (Dong, 1997; Spott, 1998; Dong *et al.*, 1999). *In vivo* allerdings, zeigt sie eine 200fach niedrigere Repression des *lac* Operons als der dimere Wildtyp Lac Repressor, und das obwohl bei einer Expression von $90 \times I^+$ ungefähr 3600 Untereinheiten pro Zelle vorliegen (siehe auch Abschnitt 3.3. und Tabelle 4, Seite 42). Im $5 \times I^+$ -Hintergrund, ist so gut wie gar keine Repression des *lac* Operons durch die dimere Mutante L251A messbar (siehe auch Abschnitt 3.3. und Tabelle 4, Seite 42). Die nähere Analyse der Diskrepanz zwischen den *in vivo* und den *in vitro* Ergebnissen zeigte, dass die Mutante L251A auch bei hohen Konzentrationen monomer in Lösung vorliegt (Dong *et al.*, 1999).

Warum kann die Mutante L251A im Retardierungsgel *in vitro* als Dimer an idealen Operator binden, wenn sie doch in Lösung monomer vorliegt? Die Dimerisierungsoberfläche von Lac Repressor ist vermutlich durch den Austausch von L251 zu Alanin nicht soweit verändert worden, dass eine Aneinanderlagerung von zwei Monomeren nicht mehr möglich ist. Zwar ist der Kontakt zum gegenüberliegenden Monomer nicht mehr vorhanden, aber ansonsten ist das Dimerisierungsinterface noch intakt. Andere Austausche z. B. mit geladenen Aminosäuren an Position 251 scheinen eine Abstoßung der Dimerisierungsoberflächen zweier Monomere zu bewirken, und verhindern damit auch die Bindung an idealen Operator *in vitro* (siehe auch Abschnitt 3.4.).

Zwei Monomere, die sich nicht gegenseitig abstoßen, sind aber durchaus in der Lage sich nebeneinander an Operator-DNA zu lagern, und dieser Komplex wird im Retardierungsgel noch zusätzlich stabilisiert. Lac Repressor Operator Komplexe befinden sich im Retardierungsgel in Hohlräumen mit begrenztem Volumen, wodurch sich eine Konzentrationserhöhung ergibt. Zusätzlich sind die Lösungseigenschaften des Komplexes im Gel anders, und es finden Interaktionen des Protein-DNA-Komplexes mit der Gelmatrix statt, die ebenfalls für Stabilität sorgen (Vossen & Fried, 1997). *In vivo* sind diese stabilisierenden Effekte nicht vorhanden, und die Monomere verlieren sich im *E. coli* Chromosom.

Der Test auf negative Dominanz ergab, dass die Mutante L251A nicht mehr in der Lage ist Heterodimere mit Wildtyp Lac Repressor zu bilden (siehe auch Abschnitt 3.1.2, Tabelle 1, Seite 34 und Abbildung 18, Seite 35). In diesem Fall allerdings ist der Verlust der Fähigkeit Heterodimere mit Wildtyp Lac Repressor einzugehen anders als bei der Spezifitätsänderung D278L auf die Herabsetzung der Assoziationskonstante des Dimers zurückzuführen (vergleiche auch Abschnitt 4.2.3.).

4.3.2. Tetramerisierung von L251A

Im tetrameren Hintergrund bewirkt die Mutante L251A sowohl bei einer Expression von $90 \times I^+$ als auch von $5 \times I^+$ jeweils eine um den Faktor 10 niedrigere Repression des *lac* Operons als der entsprechende Wildtyp Lac Repressor (siehe auch Abschnitt 3.3. und Tabelle 4, Seite 42). Diese Repressionswerte zeigen an, dass die Mutante L251A, wenn sie über das „heptad repeat“ verfügt, durchaus noch tetramerisieren kann. Unter Zugabe des Induktors IPTG ist das Tetramer vollständig induzierbar, was bedeutet, dass die Mutation L251A keine Auswirkungen auf die Induktorbindung hat (siehe auch Abschnitt 3.3. und Tabelle 4, Seite 42).

Da L251A ohne Tetramerisierungsregion als Monomer in Lösung vorliegt (Dong *et al.*, 1999), auf der Operator-DNA aber dimerisieren kann, stellte sich die Frage, ob die tetramere Form, wenn das „heptad repeat“ vorhanden ist, auch erst auf der DNA entsteht, oder bereits in Lösung vorliegt. Für Lambda Repressor konnte gezeigt werden, dass sich höherwertige Komplexe auf der DNA über große Distanzen ausbilden (Révet *et al.*, 1999), und dadurch die Repression steigern. Wildtyp Lac Repressor liegt in Lösung bereits als Tetramer vor, und bindet infolge lokaler Konzentrationserhöhung kooperativ an zwei Operatoren gleichzeitig (Oehler *et al.*, 1990). Allerdings nimmt diese Kooperativität ab, wenn die Distanz zwischen den Operatoren zunimmt, und ist ab einer Distanz von 600 bp zwischen den Operatoren nicht mehr vorhanden (Müller, 1995; Müller *et al.*, 1996).

Um zu überprüfen, ob sich das Tetramer der Mutante L251A bereits in Lösung oder erst auf der DNA ausbildet, wurde ein *in vivo* Test mit den *E. coli* Stämmen BMH8117F' λ O₁ sowie BMH8117F' λ O_{id1493,5}O₁ (Müller, 1995; Müller *et al.*, 1996) durchgeführt, in dem der Abstand zwischen den Operatoren 1493 bp beträgt (siehe auch Abschnitt 3.3.1. und Tabelle 5, Seite 44). Wenn L251A mit „heptad repeat“ erst auf der DNA tetramerisiert, müsste die Repression der Mutante in dem *E. coli* Stamm BMH8117F' λ O_{id1493,5}O₁ höher sein, als die Repression durch Wildtyp Lac Repressor.

Die tetramere Mutante L251A verhält sich allerdings genauso wie in den bisherigen *in vivo*-Tests (siehe auch Abschnitt 3.3. und Tabelle 4, Seite 42) und zeigt keine erhöhte Repression mit einem zweiten Operator in großer Distanz. Sowohl mit als auch ohne zweiten Operator zeigt die tetramere Mutante L251A jeweils 50 % der Repression des Wildtyp Lac Repressors (siehe auch Abschnitt 3.3.1. und Tabelle 5, Seite 44).

Die unterschiedlichen Verhältnisse zwischen der Repression von L251A und Wildtyp Lac Repressor in den *E. coli* Stämmen BMH8117F' λ O₁ sowie BMH8117F' λ O_{id1493,5}O₁ (Müller, 1995; Müller *et al.*, 1996) und dem *E. coli* Stamm JMX8634R (Dong *et al.*, 1999) lassen sich auf die unterschiedlich starke Expression der β -Galaktosidase in den beiden verschiedenen Systemen zurückführen.

Da die Mutante L251A (90 x I⁺) ohne Tetramerisierungsregion in JMX8634R (Dong *et al.*, 1999) das *lac* Operon noch 9fach reprimieren kann, also noch eine Restaktivität aufweist, wurde der Test auf Repression über lange Distanzen mit der Mutante Y282A wiederholt, die ebenfalls monomer sein muss, da sie noch nicht mal *in vitro* an idealen *lac* Operator binden kann (Dong, 1997). Das Ergebnis dieses Experiments ist allerdings das gleiche wie mit der Mutante L251A (siehe auch Abschnitt 3.3.1. und Tabelle 6, Seite 46).

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass, sobald das „heptad repeat“ und damit die Möglichkeit Tetramere zu bilden vorhanden ist, auch in Lösung direkt Tetramere gebildet werden. Die Mutante L251A hat also lediglich Einfluss auf die Dimerisierung, nicht aber auf die Tetramerisierung, und die damit verbundene Kooperativität bei der gleichzeitigen Bindung von zwei Operatoren.

4.3.3. L251A und tightbinder

Tetrameren Lac Repressor, der durch Austausch in der Dimerisierungsregion nicht mehr in der Lage ist das *lac* Operon zu reprimieren, kann man mit Hilfe von Austausch stabilisieren, die nicht unbedingt innerhalb der Dimerisierungsregion liegen müssen (Swint-Kruse *et al.*, 2001). Die Lac Repressor Mutante L251A ohne Tetramerisierungsregion liegt *in vivo* als Monomer vor, und ist daher nicht mehr in der Lage das *lac* Operon effektiv zu reprimieren. Es gibt regulative Proteine, wie LexA, die erst auf der DNA dimerisieren (Kim & Little, 1992). LexA bildet zwar auch in Lösung Dimere (Mohana-Borges *et al.*, 2000), aber die Struktur des Dimers in der DNA-gebundenen Form ist anders (Chattopadhyaya *et al.*, 2000). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass es durchaus Proteine gibt, die sich in der Zwischenstufe zwischen Monomer und Dimer befinden. So bildet das Protein RNase A, obwohl monomer, bereits unter physiologischen Konditionen Dimere durch die Aneinanderlagerung von zwei Monomeren, und stellt damit eine Übergangsform zwischen Monomer und Homodimer dar (Park & Raines, 2000). Durch die Kombination diverser tightbinder Mutanten mit der monomeren Lac Repressor Variante L251A wurde getestet, inwieweit eine festere DNA-Bindung die Aneinanderlagerung zweier Monomere auf der DNA zu einem Dimer stabilisieren und damit die Repression des *lac* Operons durch das Monomer verbessern kann.

Tightbinder sind Mutanten im „headpiece“ des Lac Repressors, die in der Lage sind wesentlich fester an DNA zu binden (Kolkhof, 1992). Diese festere Bindung hat allerdings auch eine unspezifischere DNA-Erkennung und meist auch eine Verminderung der Induzierbarkeit der entsprechenden Lac Repressor Mutante zur Folge. Die tightbinder Mutanten P3Y und S61L reprimieren im dimeren Hintergrund das *lac* Operon auch schon sehr stark (siehe auch Abschnitt 3.3.2. und Tabelle 7, Seite 47).

Das Testergebnis ist ziemlich eindeutig. Während die Kombination Y17H/L251A das *lac* Operon sogar noch schlechter reprimiert, als die monomere Mutante L251A allein, reprimiert die Doppelmutante V4A/L251A das *lac* Operon 40mal besser als L251A. Die dimere Doppelmutante P3Y/L251A reprimiert das *lac* Operon sogar stärker als der dimere Wildtyp

Lac Repressor (siehe auch Abschnitt 3.3.2. und Tabelle 7, Seite 47). Für den Dreifachaustausch P3Y/S61L/L251A konnten *in vivo* allerdings keine stabilen Werte ermittelt werden. Trotz mehrfacher Wiederholung der Messung schwankten die Werte für die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität zwischen 1,7 und 20. Auffällig war, dass die Bakterien vom *E. coli* Stamm JMX8634R mit dieser Dreifachmutante deutlich langsamer wuchsen, vermutlich wegen der erhöhten unspezifischen DNA-Bindung. Die Messung mit 1 mM IPTG hingegen war reproduzierbar und zeigte, dass es sich bei dieser Dreifachsubstitution um eine reverse Mutante handelt, also eine Lac Repressor Variante, die unter Zugabe von Induktor fester an *lac* Operator bindet als ohne (siehe auch Abschnitt 3.3.2. und Tabelle 7, Seite 47).

Die extrem starke Repression durch die Doppelmutante P3Y/L251A wirft natürlich die Frage auf, ob der Austausch im „headpiece“ dazu geführt hat, dass die Mutante dimerisiert, oder ob nach wie vor eine Aneinanderlagerung von zwei Monomeren zu einem Dimer erst auf der DNA stattfindet, und die Bindung durch den tightbinder lediglich stabilisiert wird. Der *in vitro* Test mit Operatortargets, die eine ideale Operatorhalbseite enthalten, zeigte allerdings deutlich, dass die Mutante P3Y/L251A nicht als Monomer bindet, nur ein ganzer idealer Operator wird von einem Dimer geshifet (siehe auch Abschnitt 3.3.2. und Abbildung 20, Seite 48). Erstaunlich allerdings war das Verhalten der Dreifachmutante P3Y/S61L/L251A im Retardierungsgel. Diese Mutante bildet sowohl mit einer einzelnen Operatorhalbseite, als auch mit Operatoren, die zwei gleiche Halbseiten hintereinander enthalten einen Repressor-Operator-Komplex, der auf derselben Höhe läuft, wie dimerer Wildtyp Lac Repressor, der an idealen Operator bindet (siehe auch Abschnitt 3.3.2. und Abbildung 20, Seite 48). Von einem Monomer, das an eine Operatorhalbseite bindet, würde man ein anderes Laufverhalten erwarten. Da der Repressor-Operator-Komplex auf der Höhe des Dimers läuft, aber aufgrund der Beschaffenheit der Target-DNA (siehe auch Abschnitt 2.3.12. und Abbildung 16, Seite 29) nur mit einem „headpiece“ spezifisch binden kann, deutet alles darauf hin, dass die Mutante durchaus wieder in der Lage ist funktionelle Dimere zu bilden.

Die Reinigung der tightbinder Mutanten sowie des Monomers L251A zur Klärung, ob in Lösung bereits ein Dimer vorliegt, oder die Mutante nach wie vor monomer ist, gestaltete sich schwierig. Der Doppelaustausch P3Y/L251A und die Dreifachmutante P3Y/S61L/L251A wurden zwar ausreichend exprimiert, zeigten sich aber im Rohextrakt als äußerst instabil. Nur durch Zusatz von Protease-Hemmern war eine partielle Reinigung möglich. Das größte Problem stellte allerdings das Monomer L251A selbst dar. Zusammen mit der äußerst schwachen DNA-Bindung des Proteins ist auch die Fähigkeit an Phosphocellulose zu binden verloren gegangen. Die bereits beschriebene Reinigung von L251A zum Nachweis des

monomeren Phänotyps (Dong *et al.*, 1999), wurde mit der Mutante L251A-adi durchgeführt. Die adi-Mutanten sind durch einen Frameshift entstanden. Sie können keine Tetramere mehr bilden, besitzen aber noch 15 Aminosäuren am C-Terminus (Oehler, 1988; Oehler *et al.*, 1990), die anscheinend die Reinigung vereinfachen.

Die wenigen Messungen, die mit der Mutante P3Y/L251A gemacht werden konnten, ergaben, dass diese Mutante nach wie vor bei einer geschätzten Proteinkonzentration von ca. 10^{-5} M in Lösung als Monomer vorliegt (Lily Pereg-Gerk, persönliche Mitteilung). Das muss aber nicht bedeuten, dass die Dreifachmutante P3Y/S61L/L251A auch immer noch monomer ist. Dagegen sprechen zumindest die *in vitro*-Daten mit einer Operator-Halbseite (siehe auch Abschnitt 3.3.2. und Abbildung 20, Seite 48).

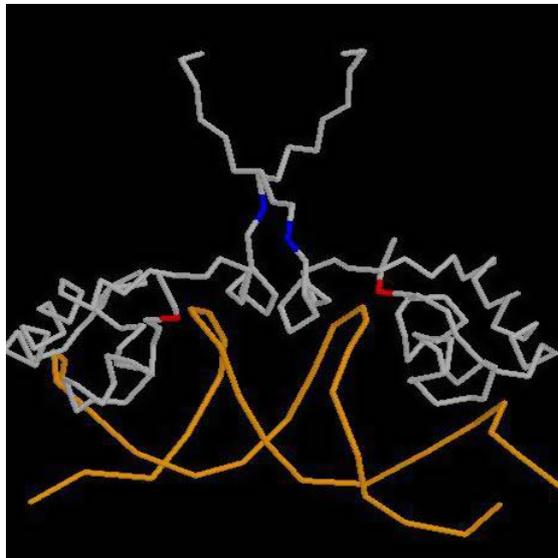


Abbildung 30: Schematische Darstellung des Lac Repressor „headpiece“ mit DNA. Die Abbildung wurde mit Hilfe der Strukturdaten 1LBG (Lac Repressor mit DNA, Lewis *et al.*, 1996) erstellt. Dargestellt sind die Aminosäuren 1 bis 70 eines Dimers. Die Aminosäure P3 ist in rot und die Aminosäure S61 ist in blau markiert.

Wie in Abbildung 30 in rot dargestellt, liegt die Aminosäure P3 in der Nähe der DNA. Der Austausch zu Tyrosin, und damit das Einfügen einer hydrophilen Gruppe an dieser Position macht unter Umständen eine direkte Interaktion mit der DNA möglich. Dieser Austausch alleine erklärt zwar die unspezifischere und festere Bindung, aber bietet noch keine Möglichkeit zur Dimerisierung einer ursprünglich monomeren Mutante wie L251A. Die zusätzliche Kombination mit S61L allerdings könnte zur Dimerisierung führen. Wie in Abbildung 30 in blau dargestellt, liegt sich die Position S61 der beiden Monomere ziemlich genau gegenüber. Es könnte möglich sein, dass der Austausch zu Leucin einen Kontakt mit sich selbst möglich macht, vor allem in dem Monomer L251A, das sich durch die kürzere Seitenkette vielleicht enger zusammenlagern kann, als der Wildtyp Lac Repressor. Diese

Vorstellung wird auch von der Bindung der Dreifachmutante P3Y/S61L/L251A als Dimer an eine Operatorhalbseite im Retardierungsgel unterstützt (siehe auch Abschnitt 3.3.2. und Abbildung 20, Seite 48). Aus der Literatur ist bekannt, dass man mit zwei kovalent miteinander verbundenen Lac Repressor „headpieces“ eine ähnlich starke DNA-Bindung erhält wie mit Wildtyp Lac Repressor (Kalodimos *et al.*, 2001).

4.4. Das Dimerisierungsinterface von Lac Repressor

Das Dimerisierungsinterface von Lac Repressor umfasst eine ca. 2200 Å² große Fläche, die sowohl hydrophobe als auch hydrophile Elemente enthält und im wesentlichen aus 3 α-Helices besteht (Friedmann *et al.*, 1995; Lewis *et al.*, 1996; Bell & Lewis, 2000; 2001). Diese α-Helices werden von den Aminosäuren 222 bis 234 (Helix 10, nach Lewis *et al.*, 1996), 247 bis 259 (Helix 11) und 279 bis 281 (Helix 12) gebildet. Wie die Helices im Dimerisierungsinterface angeordnet sind, ist schematisch in Abbildung 31 dargestellt. Die Helices 11 und 12 liegen sich gegenüber, wodurch sich die Möglichkeit zur direkten Interaktion bietet. Helix 10 liegt außerhalb der Dimerisierungsoberfläche, und hat keinen Interaktionspartner auf der gegenüberliegenden Seite. Dadurch ergeben sich für die Helix 10 innerhalb der Dimerisierung vermutlich eher stabilisierende als interagierende Aufgaben.

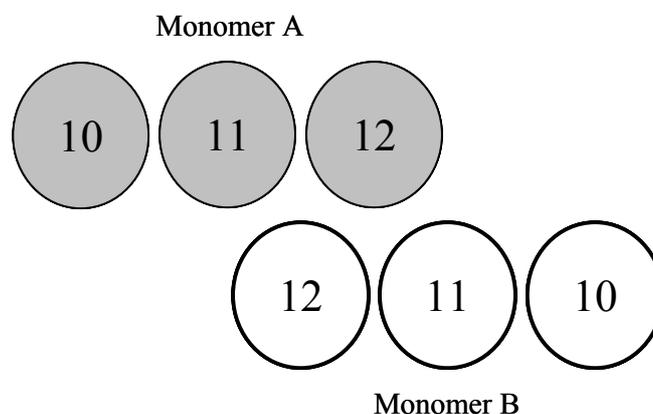


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Anordnung der Helices 10, 11 und 12 im Dimerisierungsinterface (nach Lewis *et al.*, 1996).

Nach Suckow *et al.* (1996) und Pace *et al.* (1997) sind insgesamt 15 Aminosäuren bei der Dimerisierung des Lac Repressors von Bedeutung. In Helix 10 sind das die Aminosäuren S221, A222, M223 und F226; in Helix 11 die Aminosäuren L251, M254, R255, T258 und E259; und in und um Helix 12 die Aminosäuren D278, S280, C281, Y282, I283 und P285. Doch nur 9 dieser 15 Aminosäuren sind in Richtung des gegenüberliegenden Monomers

ausgerichtet, die Seitenketten der übrigen 6 Aminosäuren zeigen eher in Richtung des eigenen „core“ (siehe auch Abbildung 25, Seite 64).

4.4.1. Helix 10

Wie in Abbildung 31 schematisch dargestellt, hat Helix 10 keinen direkten Interaktionspartner auf der gegenüberliegenden Seite des anderen Monomers (Lewis *et al.*, 1996). Trotzdem haben die Aminosäuren S221, A222, M223 und F226 Einfluss auf die Dimerisierungseigenschaften von Lac Repressor (Suckow *et al.*, 1996).

Die Position S221 toleriert im tetrameren Hintergrund viele andere Aminosäuren. Die Ausnahmen sind Prolin, das vermutlich die Helixstruktur zerstört, und Phenylalanin und Tyrosin, die durch ihre große Seitenketten zu sterischer Behinderung führen können (Suckow *et al.*, 1996). Die Position A222 hingegen toleriert im Tetramer nur 4 von 12 möglichen Substitutionen. Bei diesen handelt es sich ausschließlich um Aminosäuren mit relativ kurzen Seitenketten, alle längeren oder geladenen Seitenketten führen zum Funktionsverlust der entsprechenden Lac Repressor Mutante (Suckow *et al.*, 1996). Im dimeren Hintergrund wurden die Mutanten A222E und A222S getestet (Dong, 1997; Spott, 1998). Während A222E *in vitro* nicht mehr an idealen *lac* Operator bindet (Dong, 1997), zeigt A222S noch 68 % Repression des *lac* Operons *in vivo* (siehe auch Tabelle 1, Seite 34). Die Positionen M223 und F226 tolerieren ebenfalls im tetrameren Hintergrund fast alle Austausch, nur Prolin als Helixbrecher verhindert die Repression (Suckow *et al.*, 1996). *In vivo* wurden die Mutanten M223A, M223S, F226A, F226E und F226W ohne Tetramerisierungsregion getestet, und nur F226A und F226E zeigten keine Repression des *lac* Operons mehr (Spott, 1998). Die Mutanten M223A mit 81 %, M223S mit 106 % und F226W mit 97 % können uneingeschränkt dimerisieren (siehe auch Tabelle 1, Seite 34).

Die Beobachtung, dass lediglich Austausch, die die sterische Anordnung der Seitenketten in der Helix stören, die Funktionalität der entsprechenden Lac Repressor Variante einschränken, zusammen mit dem Ergebnis im Test auf Negative Dominanz, in dem keine der getesteten Mutanten in Helix 10 ihre Fähigkeit mit Wildtyp Lac Repressor Heterodimere zu bilden, eingebüßt hatte (siehe auch Tabelle 1, Seite 34), unterstreichen die Vermutung, dass Helix 10 keine direkten Dimerisierungskontakte ausbildet.

4.4.2. Helix 11

Die Helix 11 liegt zentral im Monomer-Monomer-Interface und hat mit Helix 12 einen direkten Interaktionspartner auf der gegenüberliegenden Seite (siehe auch Abbildung 31, Seite

79). Die an der Dimerisierung beteiligten Aminosäuren in diesem Bereich sind L251, M254, R255, T258 und E259 (Suckow *et al.*, 1996). Dass die Position L251 eine entscheidende Bedeutung für die Dimerisierung von Lac Repressor hat, konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden (siehe auch Abschnitt 4.2.1. und 4.3.).

Die Positionen M254 und T258 zeigen bei den meisten Austauschen keinen Verlust der Funktionalität im tetrameren Lac Repressor (Suckow *et al.*, 1996). Auch hier stören nur solche Substitutionen, die Stabilität oder die Ausrichtung der Helix beeinflussen können. Im dimeren Hintergrund wurde an der Position M254A lediglich die Mutante M254A getestet, die aber nicht mehr in der Lage ist das *lac* Operon zu reprimieren (Spott, 1998). Innerhalb der LacR-GalR-Familie (siehe Abbildung 25, Seite 64) findet man an dieser Stelle überwiegend Methionin und Leucin. Diese Konservierung verbunden mit der Tatsache, dass die Seitenkette von M254 nicht in Richtung des gegenüberliegenden Monomers ausgerichtet ist, spricht mehr für eine stabilisierende als für eine interagierende Funktion innerhalb der Dimerisierung von Lac Repressor. Von T258 wurden die Austausche zu Lysin, Glutamin und Asparagin im dimeren Hintergrund getestet. Die Mutanten T258N und T258Q reprimieren das *lac* Operon jeweils noch zu 70 % (Spott, 1998; siehe auch Tabelle 1, Seite 34), sind also kaum in ihrer Aktivität eingeschränkt und bilden Heterodimere mit Wildtyp Lac Repressor (Spott, 1998; siehe auch Tabelle 1, Seite 34). Lediglich die T258K Mutante zeigt Einschränkungen sowohl in der Ausbildung von Homodimeren als auch von Heterodimeren mit Wildtyp Lac Repressor (siehe auch Tabelle 1, Seite 34). Da aber auch die Seitenkette von T258 nicht in Richtung des anderen Monomers ausgerichtet ist, liegt wohl ebenfalls eher eine stabilisierende als eine interagierende Funktion innerhalb der Dimerisierung von Lac Repressor vor.

Auch die Position 259, deren Seitenkette ebenfalls vom Dimerisierungsinterface abgewendet ist, scheint eher eine stabilisierende Funktion in der Dimerisierung zu haben. Allerdings ist hier die negative Ladung innerhalb der Mitglieder der LacR-GalR-Familie stark konserviert (siehe Abbildung 25, Seite 64), und Austausche mit positiv geladenen Aminosäuren wirken sich auch im tetrameren Hintergrund negativ aus (Suckow *et al.*, 1996). Im dimeren Hintergrund sind Substitutionen durch hydrophobe Aminosäuren schädlich (Spott, 1998; Kaup, 2001). Die Position R255 ist innerhalb der LacR-GalR-Familie nicht konserviert (siehe Abbildung 25, Seite 64) und schon im tetrameren Hintergrund wird die Aktivität durch Austausche eingeschränkt (Suckow *et al.*, 1996). Im dimeren Hintergrund wurden die Substitutionen R255G, R255H, R255T und R255Y getestet, die alle *in vivo* kaum noch reprimieren (Spott, 1998; siehe auch Tabelle 1, Seite 34). Die Mutanten R255G, R255H und R255Y, die auf negative Dominanz getestet wurden, sind zudem nicht mehr in der Lage

Heterodimere mit Wildtyp Lac Repressor auszubilden (siehe auch Tabelle 1, Seite 34). Die Position R255 ähnelt somit im Verhalten der Position L251 (siehe auch Abschnitt 4.3.).

4.4.3. Helix 12

Die Helix 12 nimmt eine besondere Stellung im Dimerisierungsinterface des Lac Repressors ein. Sie ist kurz, und liegt sowohl sich selbst als auch der Helix 11 im Monomer-Monomer-Interface gegenüber (siehe auch Abbildung 31, Seite 79). In dieser Helix liegen die an der Dimerisierung beteiligten Reste D278, S280, C281, Y282, I283 und P285 (Suckow *et al.*, 1996). Die Bedeutung der Position D278 für die Dimerisierung des Lac Repressors wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt (siehe auch Abschnitt 4.2.). Auch die Bedeutung der Position Y282 wurde an anderer Stelle schon dargestellt (siehe auch Abschnitt 3.1.2).

Die Seitenkette von S280 ist nicht in Richtung des anderen Monomers ausgerichtet (siehe auch Abbildung 25, Seite 64). Im tetrameren Hintergrund zeigen sich nur mit S280P Einschränkungen der Funktionalität des Lac Repressors (Suckow *et al.*, 1996). Im dimeren Hintergrund wurde lediglich die Mutante S280R getestet, was zwar ein ziemlich radikaler Austausch ist, aber kaum Auswirkungen auf die Repression des *lac* Operons zeigt. Die Mutante S280R zeigt immer noch 56 % Repression als Homodimer und mit 4 % Repression im Test auf negative Dominanz kaum Anzeichen für eine Einschränkung der Fähigkeit Heterodimere mit Wildtyp Lac Repressor zu bilden (siehe auch Tabelle 1, Seite 34).

Die Seitenketten von C281 und I283 sind dem anderen Monomer zugewendet (siehe auch Abbildung 25, Seite 64), und in beiden Positionen stören Austausche schon im tetrameren Hintergrund die Aktivität (Suckow *et al.*, 1996). Die im Dimer getesteten Substitutionen von I283D und I283R hatten beide einen völligen Funktionsverlust zur Folge (Dong, 1997; Spott, 1998). In Position 281 wurde Cystein durch Alanin, Phenylalanin und Tyrosin ersetzt. Im dimeren Hintergrund reprimieren die Mutanten C281F und C281Y immerhin noch zu 29 % bzw. 36 % und können noch sehr gut mit Wildtyp Lac Repressor heterodimerisieren (0,5 % bzw. 0,6 % Repression im Test auf Negative Dominanz). Bei der Mutante C281A ist die Repression des *lac* Operons mit 10 % schon stark eingeschränkt, und es können keine Heterodimere mit Wildtyp Lac Repressor mehr gebildet werden (siehe auch Tabelle 1, Seite 34). Der Verlust der Fähigkeit zur Ausbildung von Heterodimeren könnte allerdings auch auf die verminderte Homodimerisierung zurückgehen (siehe auch Abschnitt 4.2.3.).

Die Position P285 am Ende der dritten Dimerisierungshelix wurde im dimeren Hintergrund nicht untersucht. Im tetrameren Hintergrund zeigt sich allerdings verminderte Repression bei einer Vielzahl von Austauschen. Vor allem große und geladene Reste werden gar nicht

toleriert, hydrophobe Reste, die helixbildende Eigenschaften haben könnten, nur schlecht (Suckow *et al.*, 1996). Vermutlich markiert P285 das Ende von Helix 12 und verändert man diese Position, so verändert man gleichzeitig die Struktur der Helix, was negative Auswirkungen auf die Dimerisierung hat.

4.4.4. Der Dimerisierungsmechanismus

Obwohl das Dimerisierungsinterface von Lac Repressor aus einer Fläche von 2200 Å² besteht (Lewis *et al.*, 1996), und vorausgegangene Studien zeigen, dass 15 Aminosäuren an der Dimerisierung beteiligt sind (Suckow *et al.*, 1996), konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass nur ein kleiner Teil dieser 15 Aminosäuren tatsächlich miteinander über das Monomer-Monomer-Interface interagieren. Die meisten Reste, so wie die ganze Helix 10 haben anscheinend eher stabilisierende Funktionen für das Dimerisierungsinterface.

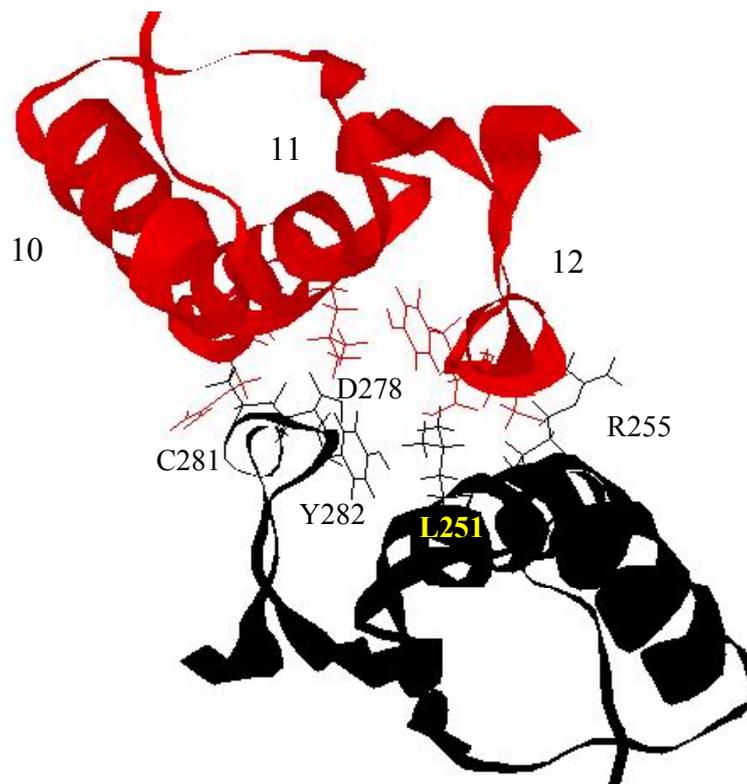


Abbildung 32: Schematische Darstellung des Dimerisierungsinterface von Lac Repressor. Dargestellt sind jeweils die Aminosäuren 215 bis 290 eines Dimers aus den Kristallstrukturdaten 1LBH (Lac Repressor mit IPTG, Lewis *et al.*, 1996). Das eine Monomer ist in rot, das andere Monomer in schwarz abgebildet. Die Seitenketten der Aminosäuren L251, R255, D278, C281 und Y282 sind im Detail dargestellt und auf der Seite des schwarzen Monomers beschriftet. Die Nummerierung der Helices nach Lewis *et al.* (1996) erfolgt auf der Seite des roten Monomers. Die Seitenkette von I283 wurde für bessere Übersichtlichkeit nicht mitabgebildet.

Die Aminosäuren, für die innerhalb dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, dass sie an einem direkten Kontakt für die Dimerisierung beteiligt sind, sind L251 (siehe Abschnitt 4.3.) und D278 (siehe Abschnitt 4.2.). Ebenfalls von entscheidender Bedeutung ist die Position Y282, die durch einen intramolekularen Kontakt die Ausrichtung der Aminosäure L251 bestimmt. Daher führen auch sämtliche Austausche an dieser Position zu einem Funktionsverlust des Proteins (Schmitz *et al.*, 1976; Chakerian & Matthews, 1991; Daly & Matthews, 1992; Chen & Matthews, 1992; Markiewicz *et al.*, 1994; Suckow *et al.*, 1996; siehe auch Abschnitt 3.1.2.).

Für die Aminosäuren R255, C281 und I283 konnte zwar im Rahmen dieser Arbeit kein direkter Kontakt nachgewiesen werden, aber der Verlust von Negativer Dominanz über Wildtyp Lac Repressor infolge von Austauschen ist ein Anzeichen für eine direkte Beteiligung an der Interaktion. In Abbildung 32 ist das Dimerisierungsinterface von Lac Repressor schematisch dargestellt. Die Seitenketten der Aminosäuren L251, R255, D278, C281 und Y282 sind im Detail dargestellt, um die oben beschriebenen Interaktionen zu verdeutlichen.

4.5. Heterodimerer Lac Repressor

Eukaryotische Transkriptionsfaktoren wie Jun und Fos heterodimerisieren spezifisch über gegensätzlich geladene Aminosäuren (O'Shea *et al.*, 1992; John *et al.*, 1994). Innerhalb der LacR-GalR-Familie ist die Ausbildung von Heterodimeren unbekannt. Auf der Basis der bisherigen Daten über den Dimerisierungsmechanismus von Lac Repressor, wurde versucht, durch gezielte Austausche innerhalb des Monomer-Monomer-Interface mit geladenen Aminosäuren heterodimeren Lac Repressor zu erhalten. Die Voraussetzung dafür ist, dass die Einzelmutanten *in vitro* nicht mehr an idealen Operator binden. Wenn die Mischung von zwei Einzelmutanten mit gegensätzlich geladenen Aminosäuren dagegen binden kann, kann das als Nachweis für Heterodimere angesehen werden. Vor allen Dingen die bekannte Interaktion von Position L251 und D278 wurde dabei ausgenutzt.

Durch die einzelnen Substitution von L251 mit Glutaminsäure, Asparaginsäure, Lysin und Arginin konnte keine Heterodimerisierung erreicht werden (Spott, 1998). Mit der neutralen Aminosäure Leucin an Stelle von D278 in Kombination mit L251D/E/K/R zeigte sich ebenfalls nicht der geringste Hinweis auf die Ausbildung von Heterodimeren (siehe auch Abschnitt 3.4.1.). Der Austausch von D278 allein gegen Glutaminsäure, Lysin und Arginin konnte nicht zur Suche nach Heterodimeren verwendet werden, da schon der Austausch D278E sich *in vitro* und *in vivo* wie Wildtyp Lac Repressor verhielt (siehe auch Abschnitt

3.4.2). Der Austausch beider Positionen, sowohl L251 als auch D278, und der Test aller möglicher Kombinationen *in vitro* zeigte schwache Anzeichen von Heterodimeren (siehe auch Abschnitt 3.4.3. und Abbildung 23, Seite 54), die sich aber durch den Wechsel in den tetrameren Hintergrund nicht verstärken ließen (Kaup, 2001).

Die Tatsache, dass man keine Heterodimere mit geladenen Aminosäuren an Position L251 und D278 erhalten kann, lässt darauf schließen, dass es noch mehr Dimerisierungskontakte gibt, als den durch die Spezifitätsänderung D278L gezeigten. Eventuell kann man durch zusätzliche Austausche an anderen Positionen des Monomer-Monomer-Interface doch noch eine Heterodimerisierung des Lac Repressors erreichen (siehe auch Abschnitt 4.4.4.).

4.6. Dimerisierung von RBP

Um an DNA binden zu können, ist die Ausbildung von Dimeren von entscheidender Bedeutung. Auf der Basis der bekannten Daten über die Dimerisierung des Lac Repressors sollte am Ribose bindenden Protein der Versuch unternommen werden, aus einem monomeren Protein ein DNA-bindendes dimeres Protein zu machen.

4.6.1. Das Ribose bindende Protein (RBP)

Das Ribose bindende Protein (RBP) gehört zu den periplasmatischen zuckerbindenden Proteinen in *E. coli* und ist in seiner nativen Form monomer in Lösung. Es ist *in vivo* verantwortlich für Chemotaxis und den Transport von Ribose (Ames, 1986; Kondoh *et al.*, 1979). Beim Vergleich der Kristallstrukturen von RBP (Mowbray & Cole, 1992) mit den Kristallstrukturen von LacR (Friedmann *et al.*, 1995; Lewis *et al.*, 1996; Bell & Lewis, 2000, 2001) und PurR (Schumacher *et al.*, 1994, 1995) fällt die hohe strukturelle Homologie im Bereich des „core“ auf. Auch auf der Basis der Aminosäuresequenzen wurde die Homologie zwischen Lac Repressor und RBP schon lange vor der Aufklärung der entsprechenden Kristallstrukturen bemerkt (Müller-Hill, 1983; Weickert & Adhya, 1992). So wurden auch die ersten Modelle des Lac Repressor „core“ anhand der Strukturdaten von RBP entwickelt (Nichols *et al.*, 1993; Suckow, 1996), da die Vermutung eines gemeinsamen evolutionären Ursprungs naheliegend ist.

Ebenso wie Lac Repressor und Pur Repressor vollzieht auch das RBP eine allosterische Umlagerung infolge der Bindung des Zuckers. Allerdings ist diese Umlagerung in dem monomeren RBP wesentlich stärker als bei den Repressoren LacR und PurR (Mowbray & Björkman, 1999). So ist die Kluft zwischen den beiden Subdomänen des „core“ von RBP ohne gebundenen Liganden wesentlich größer als bei LacR.

Vergleicht man nun die 15 Aminosäuren des Lac Repressors, die an der Dimerisierung beteiligt sind, mit den analogen Positionen von RBP (vergleiche auch Abschnitt 3.5.1. und Tabelle 10, Seite 55), so stellt man fest, dass allein drei Positionen von RBP mit denen von Lac Repressor identisch sind. So viel Übereinstimmung findet man selbst innerhalb des Alignments der LacR-GalR-Familie nicht (vergleiche auch Abschnitt 4.1. und Abbildung 25, Seite 64). Zwei der drei identischen Aminosäuren, nämlich L251 und D278, sind essentiell für die Dimerisierung des Lac Repressors (vergleiche auch Abschnitt 3.2. und Abschnitt 3.3.) und die dritte identische Aminosäure R255 könnte durchaus auch noch eine Rolle in der Dimerisierung des Lac Repressors haben (siehe auch Abschnitt 4.4.2. und 4.4.4.). Lediglich die Aminosäure, die Y282 entspricht, welches ebenfalls für die Dimerisierung essentiell ist, ist in RBP mit Alanin bzw. Asparagin besetzt.

4.6.2. Das Fusionsprotein

Aufgrund dieser Vorüberlegungen wurde ein Fusionsprotein geschaffen, welches das „headpiece“ von Lac Repressor enthält und das „core“ von RBP (siehe auch Abschnitt 3.5.2.). Da die bisherigen Experimente gezeigt haben, dass selbst eine in Lösung monomer vorkommende Lac Repressor Variante wie L251A in der Lage ist, *in vitro* an idealen *lac* Operator zu binden, und sogar *in vivo* das *lac* Operon noch 9fach reprimieren kann (siehe auch Abschnitt 3.3.), sollte auch die mögliche Aneinanderlagerung von zwei RBP-Monomeren zu einem Dimer *in vitro* oder *in vivo* sichtbar gemacht werden können.

Die Beobachtung, dass die Kluft ohne gebundenen Liganden zwischen den beiden Subdomänen des „core“ von RBP wesentlich größer ausfällt, als bei LacR und PurR, legt die Vermutung nahe, dass eine Aneinanderlagerung von zwei Monomeren zu einem Dimer bei RBP in der geschlossenen Form, also wenn Ribose gebunden ist, leichter zustande kommen könnte. Dies könnte vor allen Dingen in dem Fusionsprotein für die korrekte Ausrichtung des „headpiece“ wichtig sein. Nur wenn die Kluft zwischen den beiden Subdomänen des „core“ relativ gering ist, kann eine korrekte Positionierung des „headpiece“ stattfinden, so dass eine Bindung an DNA möglich wird. Daher schien es wahrscheinlich, dass eine DNA-Bindung des Fusionsproteins *in vitro* sowie eine Repression des *lac* Operons *in vivo* durch Zugabe von Ribose als Cofaktor erleichtert werden könnte. Aus diesem Grund wurden alle Experimente sowohl mit als auch ohne Ribose durchgeführt.

4.6.3. Austausch an Position 282

Aufgrund der verschiedenen Alignments, die für RBP und Lac Repressor existieren, bieten sich sowohl die Position 223 als auch die Position 225 von RBP als analog zur Position 282 von Lac Repressor an (siehe auch Abschnitt 3.5.1. und Tabelle 10, Seite 55). Für Lac Repressor konnte gezeigt werden, dass dieses Tyrosin essentiell für die Ausbildung eines funktionellen Dimers ist (Schmitz *et al.*, 1976; Chakerian & Matthews, 1991; Daly & Matthews, 1992; Chen & Matthews, 1992; Markiewicz *et al.*, 1994; Suckow *et al.*, 1996, siehe auch Abschnitt 3.1.2.). Das Fehlen dieses Tyrosins im potentiellen Dimerisierungsinterface von RBP bot daher den ersten Ansatzpunkt für eine Mutagenese der möglichen Interaktionsfläche.

Die Austausche innerhalb des Fusionsproteins, sowohl A223Y als auch N225Y, zeigen allerdings keinen Effekt, weder *in vitro* noch *in vivo* (siehe auch Abschnitt 3.5.4. und Tabelle 12, Seite 58). Dieses Ergebnis, sowie die Tatsache, dass das Fusionsprotein RBP-HP allein auch nicht den geringsten Ansatz zur Repression des *lac* Operons *in vivo* oder zur Bindung von idealem Operator *in vitro* zeigte (siehe auch Abschnitt 3.5.3. und Tabelle 11, Seite 58), lassen darauf schließen, dass es sich bei dem RBP-HP-Fusionsprotein um eine andere Art von Monomer handelt, als das bei der monomeren Lac Repressor Variante L251A der Fall ist. Während die Lac Repressor Mutante L251A noch in der Lage ist das *lac* Operon 9fach zu reprimieren, und sich bei der Bindung an idealen Operator *in vitro* zwei Monomere zu einem Dimer zusammenlagern können, scheint diese Möglichkeit bei dem RBP-HP-Fusionsprotein nicht gegeben. Auch die A223Y und N225Y Mutationen beeinflussen die Fähigkeit des Fusionsproteins zu dimerisieren anscheinend nicht.

4.6.4. Verstärkung der DNA-Bindung

In den folgenden Austauschen innerhalb des Fusionsproteins RBP-HP wurde nun zunächst versucht, die Stabilität des Monomers zu erhöhen. Von dem Austausch P3Y im „headpiece“ des Lac Repressors weiß man, dass es sich dabei um einen sogenannten tightbinder handelt (Kolkhof, 1992), d. h. um eine Mutation, die die DNA-Bindung des Lac Repressors erheblich verstärkt und durch diese Verstärkung sogar die allosterische Umlagerung des Lac Repressors nach der Induktorbindung beeinflusst. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kombination der monomeren Lac Repressor Mutante L251A mit dem tightbinder P3Y eine erheblich bessere Repression des *lac* Operons zur Folge hat, die sogar über die Repression des *lac* Operons durch Wildtyp Lac Repressor unter denselben Expressionsbedingungen

hinausgeht (siehe auch Abschnitt 3.3.2.). Trotzdem liegt diese Mutante nach wie vor als Monomer in Lösung vor (Lily Pereg-Gerk, persönliche Mitteilung).

Die Kombination des Fusionsprotein RBP-HP mit dem tightbinder P3Y zeigt allerdings keine Auswirkungen (siehe auch Abschnitt 3.5.5. und Tabelle 13, Seite 59). Erst die Kombination der Mutationen A223Y bzw. N225Y mit dem tightbinder P3Y führten zu einem RBP-HP mit geringfügiger Repressoraktivität *in vivo*, wobei aber die Anwesenheit von Ribose gar nicht so wichtig zu sein scheint, wie vorher vermutet wurde. Die Unterschiede zwischen den spezifischen β -Galaktosidase-Aktivitäten mit und ohne Ribose - 1600 versus 2100 im Fall von RBP-P3Y-HP-A223Y und 1500 versus 2350 im Fall von RBP-P3Y-HP-N225Y – betragen weniger als einen Faktor zwei, und sind daher auch nicht signifikant (siehe auch Abschnitt 3.5.5. und Tabelle 13, Seite 59).

Vergleicht man aber die spezifische Aktivität mit Ribose von 1600 (für RBP-P3Y-HP-A223Y) bzw. 1500 (für RBP-P3Y-HP-N225Y) mit der spezifischen Aktivität mit Ribose ohne jeden Repressor von 3800, so ergibt sich eine marginale Repression des *lac* Operons von 2,3 bzw. 2,5. In Abwesenheit von Ribose betragen die entsprechenden Repressionsfaktoren 1,8 bzw. 1,6. Dies bedeutet, dass die tightbinder Mutation P3Y einen größeren Einfluss auf die DNA-Bindung hat, als die allosterische Umlagerung infolge der Bindung von Ribose, die durch die Mutation P3Y unter Umständen sogar behindert wird.

4.6.5. RBP mit „basictail“, KRK-Sequenz und „four-helical-bundle“

Die C-terminalen Verlängerungen des RBP-HP-Fusionsproteins sowie der RBP-HP Mutanten verbesserten die Fähigkeit zur Dimerbildung nicht (siehe auch Abschnitt 3.5.6. und Tabelle 14, Seite 60). Während der „basictail“ anstelle des „heptad repeat“ am C-Terminus des Lac Repressors in der Lage ist, durch unspezifische DNA-Bindung die Repression durch dimeren Wildtyp Lac Repressor (Kolkhof et al., 1995) oder durch die monomere Lac Repressor Mutante L251A deutlich zu steigern (siehe auch Abschnitt 3.5.6. und Tabelle 14, Seite 60), zeigt er keine Auswirkungen auf die Repression durch das RBP-HP-Fusionsprotein. Auch die Aktivität der Mutanten RBP-P3Y-HP, RBP-HP-A223Y und RBP-HP-N225Y wird durch den „basictail“ nicht verbessert (siehe Tabelle 14, Seite 60).

Bei den Mutanten RBP-P3Y-HP-A223Y-BT und RBP-P3Y-HP-N225Y-BT verschwindet sogar der kleine Effekt, der ohne „basictail“ noch sichtbar war (vergleiche Abschnitt 4.6.4., sowie Tabelle 13, Seite 59 und Tabelle 14, Seite 60). Wenn man davon ausgeht, dass der Faktor 2,3 bzw. 2,5, der in Tabelle 13 (Seite 59) für die Mutanten RBP-P3Y-HP-A223Y und RBP-P3Y-HP-N225Y vorhanden war, real ist, so stellt sich die Frage, warum dieser Effekt

sich nicht durch den „basictail“ verstärken lässt. Eine Erklärungsmöglichkeit, die sich anbietet, ist, dass womöglich die starke unspezifische Bindung an DNA, die bei dem „basictail“ zweifelsfrei vorhanden ist, über die sehr schwache spezifische DNA-Bindung dominiert. Wenn die unspezifische DNA-Bindung des „basictail“ stärker ist, als die schwache spezifische Bindung des „headpiece“ an Operator-DNA, dann würden sich die 3600 Monomere, die durch den $90 \times I^+$ -Promotor pro Zelle exprimiert werden, genauso im *E. coli* Chromosom verlieren, wie bei der L251A Mutante von Lac Repressor.

Das Anfügen der Sequenz KRK an den C-Terminus des RBP-HP-Fusionsproteins hat keine Auswirkungen auf die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität *in vivo* (siehe auch Abschnitt 3.5.7. und Tabelle 15, Seite 61). Obwohl für die Stabilität des Lac Repressors unerlässlich (Li & Matthews, 1995), zeigt diese Sequenz keinen Effekt auf RBP, weder auf das Fusionsprotein allein, noch auf die potentiellen Dimerisierungsmutanten.

Um eine Stabilisierung des RBP-HP-Fusionsproteins zu erreichen, ohne unspezifische DNA-Bindung zu erhalten, wurde der „heptad repeat“ von Aminosäure 329 bis 360 des Lac Repressors dem Alignment von Weickert & Adhya (1992) folgend an Aminosäure 271, und damit an den C-Terminus von RBP fusioniert. Der „heptad repeat“ von Lac Repressor dient der Ausbildung eines „four-helical-bundle“, und damit der Tetramerisierung von Lac Repressor (Alberti *et al.*, 1991; Chakerian *et al.*, 1991; Alberti *et al.*, 1993). Sowohl die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität des Fusionsproteins RBP-HP-4HB als auch der Mutanten in der potentiellen Dimerisierungsfläche RBP-HP-A223Y-4HB und RBP-HP-N225Y-4HB sind unter der Zugabe von Ribose um einen Faktor 2 niedriger als die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität ohne jeden Repressor (siehe auch Abschnitt 3.5.7. und Tabelle 16, Seite 62). Wenn man dagegen die monomere Lac Repressor Mutante L251A mit dem „heptad repeat“ versieht, dann erhält man eine Steigerung der Repression *in vivo* um einen Faktor 200.

4.6.6. Analyse der bisherigen Ergebnisse

Alle bisherigen Versuche, das monomere Ribose bindende Protein (RBP) in ein dimeres DNA-bindendes Protein umzuwandeln, sind fehlgeschlagen. Lediglich Tendenzen in der Verringerung der spezifischen β -Galaktosidase-Aktivität von maximal einem Faktor 2 konnten bisher erreicht werden. Die möglichen Ursachen, warum bisher kein Dimer erhalten wurde, sind vielfältig:

1. Das „headpiece“ des Lac Repressors im Fusionsprotein RBP-HP ist nicht korrekt positioniert, d. h. es kann weder *in vitro* noch *in vivo* an den *lac* Operator binden, da es nicht richtig ausgerichtet ist.
2. Die potentielle Dimerisierungsfläche des RBP ist, obwohl sie bereits 3 identische Aminosäuren von 15 Aminosäuren, die im Lac Repressor an der Dimerisierung beteiligt sind, aufweist, noch nicht so geformt, dass sich zwei Monomere zu einem Dimer aneinanderlagern können.
3. Das native RBP entsteht erst nach dem Transport in den periplasmatischen Raum und nach Abspaltung einer Signalsequenz. Möglicherweise wird daher das Fusionsprotein RBP-HP ohne Signalsequenz im Cytoplasma nicht korrekt gefaltet.

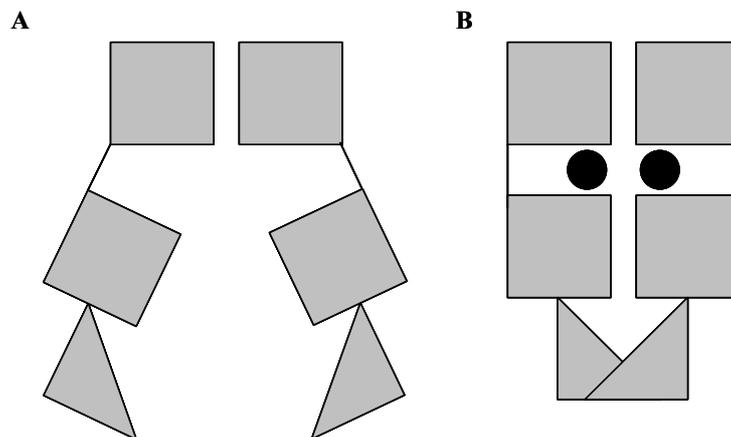


Abbildung 33: Schematische Darstellung eines hypothetischen RBP-HP-Dimers. A) Ohne Effektor ist die Kluft zwischen der C-terminalen und der N-terminalen Subdomäne (dargestellt als graue Vierecke) so groß, dass eine DNA-Bindung durch das Lac Repressor „headpiece“ (dargestellt als graues Dreieck) nicht möglich wäre. B) In der geschlossenen Form, mit Ribose (dargestellt als schwarzer Kreis) ist die Kluft zwischen der C-terminalen und der N-terminalen Subdomäne geschlossen, und eine Überkreuzung der „headpieces“ könnte DNA-Bindung ermöglichen.

Die korrekte Positionierung des „headpiece“ von Lac Repressor ist die komplizierteste Variable innerhalb der Versuchsreihe aus dem monomeren RBP ein dimeres DNA-bindendes Protein zu machen. Obwohl der Fusionspunkt zwischen Aminosäure 61 des Lac Repressors und Aminosäure 2 des nativen RBP anhand des Alignments von Weickert & Adhya (1992a) und auch aufgrund des Vergleichs der Kristallstrukturen günstig zu sein scheint (Brigitte Kisters-Woike, persönliche Mitteilung), kann es sein, dass das „headpiece“ im Fusionsprotein nicht richtig ausgerichtet wird. Die allosterische Umlagerung des RBP infolge der Bindung von Ribose ist erheblich stärker als die allosterische Umlagerung des Lac Repressors nach Induktorbindung (Mowbray & Cole, 1999). In der offenen Form, also ohne Ribose, wären die

N-terminalen Subdomänen des hypothetischen RBP-Dimers viel zu weit von einander entfernt, um die Überkreuzung des Lac Repressor „headpiece“, die zur DNA-Bindung notwendig ist, zu gewährleisten (siehe auch Abbildung 33).

Aus diesem Grund wäre eine DNA-Bindung lediglich in der geschlossenen Form möglich (Abbildung 33B). Wenn jetzt allerdings in der geschlossenen Form des RBP der Winkel zwischen der C-terminalen Subdomäne und der N-terminalen Subdomäne nur geringfügig anders wäre, als in der offenen Form des Lac Repressors, so wäre das „headpiece“ schon nicht mehr korrekt ausgerichtet, und könnte daher auch nicht an *lac* Operator binden. Frühere Studien haben gezeigt, dass die korrekte Ausrichtung des „headpiece“ extrem wichtig, für die Funktionalität ist. So wirkt sich schon die Verkürzung oder Verlängerung der „hinge“-Helix um eine Aminosäure negativ auf die Bindung von *lac* Operator aus (Falcon & Matthews, 2000; Lily Pereg-Gerk, persönliche Mitteilung).

Dass hier die Ursache dafür liegt, warum bisher RBP-Dimere *in vivo* nicht sicher nachgewiesen werden konnten, dafür sprechen die Ergebnisse, die mit den Mutanten erzielt wurden, die einen „basictail“ oder den „heptad repeat“ des Lac Repressors enthalten (siehe auch Abschnitt 3.5.6. und Abschnitt 3.5.7.). Bei korrekter Positionierung des „headpiece“ kann mit dem „basictail“ bei der monomeren Mutante L251A eine 10fache Steigerung der Repression (siehe auch Tabelle 14, Seite 60) und mit dem „four-helical-bundle“ sogar eine 200fache Steigerung der Repression (siehe auch Tabelle 4, Seite 42) erreicht werden. Dass die Versuche, die DNA-Bindung mit Hilfe des tightbinders P3Y (Kolkhof, 1992) zu stabilisieren, fehlgeschlagen sind (siehe auch Abschnitt 3.5.5), spricht auch für eine ungünstige Positionierung des „headpiece“. Immerhin kann man mit diesem Austausch im „headpiece“ des Lac Repressors die monomere Mutante L251A so stark stabilisieren, dass sie das *lac* Operon *in vivo* um ein vielfaches stärker reprimiert als Wildtyp Lac Repressor (siehe auch Abschnitt 3.3.2. und Tabelle 7, Seite 47).

Die zweite Variable ist die potentielle Dimerisierungsoberfläche des Fusionsproteins RBP-HP. Dass im Alignment zwischen RBP und Lac Repressor schon allein 3 der 15 Aminosäuren, die in Lac Repressor an der Dimerisierung beteiligt sind, übereinstimmen (siehe auch Abschnitt 3.5.1. und Tabelle 10, Seite 55), heißt nicht, dass die Dimerisierungsoberflächen sich nicht mehr abstossen können. Aus früheren Studien ist bekannt, dass schon ein einziger Austausch an Position 282 ausreichend ist, um das Lac Repressor Tetramer zu inaktivieren (Schmitz *et al.*, 1976; Chakerian & Matthews, 1991; Daly & Matthews, 1992; Chen & Matthews, 1992; Markiewicz *et al.*, 1994; Suckow *et al.*,

1996). Daher wurden die potentiell entsprechenden Aminosäuren A223 und N225 von RBP als erstes durch Tyrosin ersetzt (siehe auch Abschnitt 3.5.4.).

Obwohl der größte Teil der 15 Aminosäuren, die in Lac Repressor an der Dimerisierung beteiligt sind, offensichtlich nur stabilisierende Funktion hat, kann auch das Fehlen einer dieser Reste Auswirkungen auf die Struktur der Oberfläche haben (siehe auch Abschnitt 4.4.). Unter Umständen können also auch Austausche in diesen Positionen für die Dimerbildung erforderlich sein. Für diese Ursache spricht auch das Fehlen jeglicher negativer Dominanz über Wildtyp Lac Repressor (siehe auch Abschnitt 3.5.8. und Tabelle 17, Seite 63).

4.7. Evolution von neuen Dimerisierungsoberflächen

In den meisten Stoffwechselfvorgängen ist die Ausbildung von Dimeren oder Multimeren von Vorteil. Während Heterodimere in der Regel hydrophile Kontakte eingehen, basiert die Bildung von Homodimeren hauptsächlich auf hydrophoben Interaktionen (Korn & Burnett, 1991; Jones & Thornton, 1996). Das Dimerisierungsinterface des Lac Repressors hat eine Fläche von 2200 \AA^2 , die sowohl hydrophobe als auch hydrophile Elementen enthält (Lewis *et al.*, 1996). Man würde erwarten, dass mindestens zwei Austausche nötig sind, die sich gegenseitig komplementieren, wenn man die Dimerisierungskontakte verändern will. Um so erstaunlicher ist die Tatsache, dass die einzelne Substitution D278L ausreichend ist, um die Dimerisierungsspezifität des Lac Repressors zu ändern (siehe Abschnitt 4.2.).

In der Tat wurde für die Homo- und Heterodimerisierung von Jun und Fos gezeigt, dass zwei gegensätzlich geladene Aminosäuren ausgetauscht werden müssen, um die Dimerisierungsspezifität zu ändern (John *et al.*, 1994). Für die Änderung der Dimerisierungsspezifität des *Tet* Repressors sind 4 Austausche notwendig (Schnappinger *et al.*, 1998). Allerdings ist sowohl die Interaktionsfläche der Leucin-Zipper, als auch die Dimerisierungsoberfläche des „four-helical-bundle“ des *Tet* Repressors wesentlich kleiner und nicht so komplex, wie das Monomer-Monomer-Interface des Lac Repressors.

Wie in Abbildung 27 und 28 (Seite 69 und 70) gezeigt, bildet der Austausch D278L zusammen mit L251 ein neues hydrophobes Kluster, was eine Änderung der Dimerisierungsspezifität zur Folge hat. Diese Beobachtung zeigt, dass der Austausch einer einzigen Aminosäure im Zentrum des Monomer-Monomer-Interface ausreicht für die Evolution einer neuen Interaktionsoberfläche.

5. Zusammenfassung

Lac Repressor, das regulative Protein des *lac* Operons aus *Escherichia coli*, ist ein Tetramer, das aus vier identischen Untereinheiten besteht. Als Tetramer verfügt Lac Repressor über zwei unterschiedliche Oberflächen zur Protein-Protein-Interaktion: das Monomer-Monomer-Interface, das den Zusammenschluss von zwei Monomeren zu einem Dimer ermöglicht, und das Dimer-Dimer-Interface, das die Tetramerisierung bewirkt. Frühere Studien haben gezeigt, dass insgesamt 15 Aminosäuren in 3 α -Helices an der spezifischen Interaktion zwischen zwei Monomeren in einem Dimer beteiligt sein können. Im Rahmen dieser Studie wurden diverse Austausche innerhalb des Monomer-Monomer-Interface *in vivo* analysiert.

Die Analyse dieser 15 Positionen anhand von Austauschen hat gezeigt, dass der größte Teil dieser Reste innerhalb des Dimerisierungsmechanismus von Lac Repressor eher stabilisierende als interagierende Funktionen hat. Essentielle Bedeutung für die Dimerisierung von Lac Repressor haben die Positionen L251, D278 und Y282. Während Austausche an den Positionen L251 und Y282 in der Regel zum Funktionsverlust des Lac Repressors führen, konnte an Position D278 durch den Austausch zu Leucin eine Änderung der Dimerisierungsspezifität erreicht werden.

Durch die Spezifitätsänderung D278L konnte eine direkte Interaktion zwischen L251 und D278 über das Monomer-Monomer-Interface nachgewiesen werden. Trotzdem wurden durch geladene Austausche an diesen beiden Positionen keine Heterodimere mit Lac Repressor erreicht, so dass die Vermutung nahe liegt, dass dieser Kontakt nicht der einzige ist, der berücksichtigt werden muss.

Anhand der monomeren Mutante L251A konnte gezeigt werden, dass die Dimerisierung im Lac Repressor Tetramer gegenüber der Tetramerisierung eine untergeordnete Rolle spielt. Sobald durch das „heptad repeat“ die Möglichkeit gegeben ist Tetramere auszubilden, kann der Verlust der Dimerisierungsfähigkeit ausgeglichen werden, solange das Dimerisierungsinterface nicht so extrem gestört wurde, dass eine Abstoßung erfolgt. Ebenfalls ergab die Analyse von L251A, dass eine Aneinanderlagerung von zwei Monomeren zu einem Dimer auf der DNA möglich ist, wenn die DNA-Bindung soweit gefestigt wird, dass der Verlust der Dimerisierung ausgeglichen werden kann.

Mit Hilfe der Kenntnisse über die Dimerisierungsoberfläche von Lac Repressor, wurde weiterhin versucht aus dem monomeren periplasmatischen zuckerbindenden Protein RBP, das sowohl strukturell als auch auf der Basis der Aminosäuresequenz homolog zu Lac Repressor ist, ein dimeres DNA-bindendes Protein zu machen. Diese Versuche sind aber bisher nicht erfolgreich gewesen.

6. Literatur

- Alberti, S., Oehler, S., von Wilcken-Bergmann, B., Krämer, H., Müller-Hill, B. (1991) *New Biol.* **3**, 57 - 62.
- Alberti, S., Oehler, S., von Wilcken-Bergmann, B., Müller-Hill, B. (1993) *EMBO J.* **12**, 3227 - 3226.
- Ames, G. F. (1986) *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 397 – 425.
- Argos, P., Mahoney, W. C., Hermodson, M. A., Hanei, M. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 4357 – 4361.
- Aslanidis, C., Schmitt, R. (1990) *J. Bacteriol.* **172**, 2178 – 2180.
- Assmann, H. (1992) Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Barker, A., Fickert, R., Oehler, S., Müller-Hill, B. (1998) *J. Mol. Biol.* **278**, 549 – 558.
- Barry J. K., Matthews, K. S. (1999) *Biochemistry* **38**, 3579 – 3590.
- Bell, C. E., Lewis, M. (2000) *Nature Struct. Biol.* **7**, 209 – 214.
- Bell, C. E., Lewis, M. (2001) *Curr. Opinion in Struct. Biol.* **11**, 19 – 25.
- Beyreuther, K., Adler, K., Geisler, N., Klemm, A. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **70**, 3576 - 3580.
- Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., Shao, Y. (1997) *Science* **277**, 1453 - 1474.
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heynecker, H. L., Boyer, H. W. (1977) *Gene* **2**, 95 - 113.
- Busby, S., Ebright, R. H. (1999) *J. Mol. Biol.* **293**, 199 – 213.
- Calos, M. P. (1978) *Nature* **274**, 762 – 765.
- Chakerian, A. E., Matthews, K. S. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 22206 – 22214.
- Chakerian, A. E., Tesmer, V. M., Monly, S. P., Brackett, J. K., Lynch, M. J., Hoh, J. T., Matthews, K. S. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 1371 - 1374.
- Chang, A. C., Cohen, S. N. (1978) *J. Bacteriol.* **134**, 1141 – 1156.
- Chattopadhyaya, R., Ghosh, K., Namboodiri, V. M. (2000) *J. Biomol. Struct. Dyn.* **18**, 181 – 197.
- Chen, J., Matthews, K. S. (1992) *Gene* **111**, 145 - 146.
- Choy, H. E., Adhya, S. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 11264 - 11268.

- Cortay, J.-C., Nègre, D., Scarabel, M., Ramseier, T. M., Vartak, N. B., Reizer, J., Saier, M. H. Jr., Cozzone, A. J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 14885 - 14891.
- Daly, T. J., Matthews, K. S. (1986) *Biochemistry* **25**, 5474 – 5478.
- Devereux, J., Haerberli, P., Smities, O. (1984) *Nucl. Acids Res.* **12**, 387 – 395.
- Diederich, L., Rasmussen, L. J., Messer, W. (1992) *Plasmid* **28**, 14 – 24.
- Dong, F. (1997) Dissertation, Universität zu Köln.
- Dong, F., Spott, S., Zimmermann, O., Kisters-Woike, B., Müller-Hill, B., Barker, A. (1999) *J. Mol. Biol.* **290**, 653 – 666.
- Dower, W. J., Miller, J. F., Ragsdale, C. W. (1988) *Nucl. Acids Res.* **16**, 6127 – 6145.
- Falcon, C. M., Swint-Kruse, L., Matthews, K. S. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 26818 - 26821.
- Falcon, C. M., Matthews, K. S. (2000) *Biochemistry* **39**, 11074 – 11083.
- Farabough, P. J. (1978) *Nature* **274**, 765 - 769.
- Friedman, A. M., Fischmann, T. O., Steitz, T. A. (1995) *Science* **268**, 1721 - 1727.
- Geier, G. E., Modrich, P. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 1408 – 1413.
- Gerk, L. P., Leven, O., Müller-Hill, B. (2000) *J. Mol. Biol.* **299**, 805 – 812.
- Gilbert, W. & Müller-Hill, B. (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **56**, 1891 - 1898.
- Gilbert, W. & Maxam, A. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **70**, 3581 - 3584.
- Glasfeld, A., Koehler, A. N., Schumacher, M. A., Brennan, R. G. (1999) *J. Mol. Biol.* **291**, 347 – 361.
- Groarke, J. M., Mahoney, W. C., Hope, J. N., Furlong, C. E., Robb, F. T., Zalkin, H., Hermodson, M. A. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 12952 – 12956.
- Hall, B. G. & Xu, L. (1992) *Mol. Biol. Evol.* **9**, 688 – 706.
- Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* **166**, 575 – 580.
- Hanahan, D. (1985) *DNA Cloning, vol. 1: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford.
- Harrison, S. C. & Aggarwal, A. K. (1990) *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 933 - 969.
- Hemsley, A., Arnheim, N., Toney, M. D., Cortopassi, G., Galas, D. J. (1989) *Nucleic Acids Res* **17**, 6545 – 6551.
- Hogg, R. W., Hermodson, M. A. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 5135 – 5141.
- Jacob, F. & Monod, J. (1961) *J. Mol. Biol.* **3**, 318 – 356
- Jaenicke, R., Muiznieks, I., Aslanidis, C., Schmitt, R. (1990) *FEBS Letters* **260**, 233 - 235.
- John, M., Briand, J. P., Granger-Schnarr, M., Schnarr, M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 16247 – 16253.
- Johnson, P. F. & McKnight, S. L. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 799 - 839.
- Jones, S., Thornton, J. M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 13 – 20.

- Kadowaki, H., Kadowaki, T., Wondisford, F. E., Taylor, S. I. (1989) *Gene* **76**, 161 – 166.
- Kalodimos, C. G., Folkers, G. E., Boelens, R., Kaptein, R. (2001) *PNAS* **98**, 6039 – 6044.
- Kaup, B. (2001) Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Kim, B., Little, J. W. (1992) *Science* **255**, 203 – 206.
- Kleina, L. G., Miller, J. H. (1990) *J. Mol. Biol.* **212**, 295 - 318.
- Kolkhof, P. (1992) *Nucleic Acids Res.* **20**, 5035 – 5039.
- Kolkhof, P., Oehler, S., Alex, R., Müller-Hill, B. (1995) *J. Mol. Biol.* **247**, 396 – 403.
- Kondoh, H., Ball, C. B., Adler, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 260 – 264.
- Korn, A. P., Burnett, R. M. (1991) *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **9**, 37 – 55.
- Lacks, S., Greenberg, B. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 4060 – 4066.
- Lacks, S., Greenberg, B. (1977) *J. Mol. Biol.* **114**, 153 – 168.
- Lehming, N., Sartorius, J., Niemöller, M., Genenger, G., von Wilcken-Bergmann, B., Müller-Hill, B. (1987) *EMBO J.* **6**, 3145 – 3153.
- Lehming, N., Sartorius, J., Oehler, S., von Wilcken-Bergmann, B., Müller-Hill, B. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 7947 – 7951.
- Lewis, M., Chang, G., Horton, N. C., Kercher, M. A., Pace, H. C., Schumacher, M. A., Brennan, R. G., Lu, P. (1996) *Science* **271**, 1247 - 1254.
- Li, L., Matthews, K. S. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 10640 – 10649.
- Lyubchenko, Y. L., Shlyakhtenko, L. S., Aki, T., Adhya, S. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**, 873 - 876.
- Mahoney, W. C., Hogg, R. W., Hermodson, M. A. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 4350 – 4356.
- Markiewicz, P., Kleina, L. G., Cruz, C., Ehret, S., Miller, J. H. (1994) *J. Mol. Biol.* **240**, 421 - 431.
- Matthews, B. W., Ohlendorf, D. H., Anderson, W. F., Takeda, Y. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**, 1428 – 1432.
- Meng, L. M., Nygard, P. (1990) *Mol. Microbiol.* **4**, 2187 – 2192.
- Miller, J. H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Miller, J. H. (1978) *The Operon*, eds. Miller, J. H., Reznikoff, W. S., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Mohana-Borges, R., Pacheco, A. B., Sousa, F. J., Foguel, D., Almeida, D. F., Silva, J. L. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 4708 – 4712.
- Mowbray, S. L., Cole, L. B. (1992) *J. Mol. Biol.* **177**, 155 – 175.
- Mowbray, S. L., Björkman, A. J. (1999) *J. Mol. Biol.* **294**, 487 – 499.

- Müller, J. (1995) Dissertation, Universität zu Köln.
- Müller, J., Oehler, S., Müller-Hill, B. (1996) *J. Mol. Biol.* **257**, 21 – 29.
- Müller-Hill, B., Crapo, L. Gilbert, W. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **59**, 1259 – 1264.
- Müller-Hill, B. (1983) *Nature*, **302**, 163 - 164.
- Müller-Hill, B., Beyreuther, K., Gilbert, W. (1971) *Methods Enzymol.* **21**, 483 - 487.
- Müller-Hill, B. (1996) *The lac Operon - A Short History of a Genetic Paradigm*. Walter de Gruyter Press, Berlin, New York.
- Newcomer, M. E., Gilliland, G. L., Quioco, F. A. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 13213 – 13217.
- Nichols, J. C., Vyas, N. K., Quioco, F. A., Matthews, K. S. (1993) *J. Mol. Biol.* **268**, 17602 – 17612.
- Nichols, J. C., Matthews, K. S. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 18550 - 18557.
- Oehler, S. (1988) Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Oehler, S., Eismann, E. R., Krämer, H., Müller-Hill, B. (1990) *EMBO J.* **9**, 973 – 979.
- Oehler, S., Amouyal, M., Kolkhof, P., von Wilcken-Bergmann, B., Müller-Hill, B. (1994) *EMBO J.* **13**, 3348 – 3355.
- O'Shea, E. K., Rutkowski, R., Kim, P. S. (1989a) *Science* **243**, 538 - 542.
- O'Shea, E. K., Rutkowski, R., Stafford III, W. F., Kim, P. S. (1989b) *Science* **245**, 646 - 648.
- O'Shea, E. K., Rutkowski, R., Kim, P. S. (1992) *Cell* **68**, 699 – 708.
- Pace, H. C., Kercher, M. A., Lu, P., Markiewicz, P., Miller, J. H., Chang, G., Lewis, M. (1997) *Trends Biochem. Sci.* **22**, 334 - 339.
- Park, C., Raines, R. T. (2000) *Protein Science* **9**, 2026 – 2033.
- Platt, T., Files, J. G., Weber, K. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 110 - 121.
- Pope, B., Kent, H. M. (1996) *Nucl. Acids Res.* **24**, 536 – 537.
- Reznikoff, W. S., Winter, R. B., Hurley, C. K. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **71**, 2314 - 2318.
- Révet, B., von Wilcken-Bergmann, B., Bessert, H., Barker, Al, Müller-Hill, B. (1999) *Curr. Biol.* **9**, 151 - 154.
- Riggs, A. D., Newby, R. F., Bourgeois, S. (1970) *J. Mol. Biol.* **51**, 303 – 314.
- Rolfes, R. J., Zalkin, H. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 19653 – 19661.
- Rose, R. E. (1988) *Nucl. Acids Res.* **16**, 355.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 5463 – 5467.
- Sartorius, J., Lehming, N., Kisters, B., von Wilcken-Bergmann, B., Müller-Hill, B. (1989) *EMBO* **8**, 1265 – 1270.

- Sartorius, J., Lehming, N., Kisters-Woike, B., von Wilcken-Bergmann, B., Müller-Hill, B. (1991) *J. Mol. Biol.* **218**, 313 – 321.
- Schmitz, A., Schmeissner, U., Miller, J. H. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 3359 - 3366.
- Schnappinger, D., Schubert, P., Pfleiderer, K., Hillen, W. (1998) *EMBO J.* **17**, 535 – 543.
- Schumacher, M. A., Choi, K. Y., Zalkin, H., Brennan, R. G. (1994) *Science* **266**, 763 – 770.
- Schumacher, M. A., Choi, K. Y., Lu, f., Zalkin, H., Brennan, R. G. (1995) *Cell* **83**, 147 – 155.
- Senear, D. F., Laue, T. M., Ross, J. B., Waxman, E., Eaton, S., Rusinova, E. (1993) *Biochemistry* **32**, 6179 - 6189.
- Simons, A., Tils, D., von Wilcken-Bergmann, B., Müller-Hill, B. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 1624 – 1628.
- Spott, S. (1998) Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Spott, S., Dong, F., Kisters-Woike, B., Müller-Hill, B. (2000) *J. Mol. Biol.* **296**, 673 – 684.
- Suckow, J. (1996) Dissertation, Universität zu Köln.
- Suckow, J., Markiewicz, P., Kleina, L. G., Miller, J., Kisters-Woike, B., Müller-Hill, B. (1996) *J. Mol. Biol.* **261**, 509 – 523.
- Swint-Kruse, L., Elam, C. R., Lin, J. W., Wycuff, D. R., Matthews, K. S. (2001) *Protein Science* **10**, 262 – 276.
- Tyrell, R., Verschuere, K. H. G., Dodson, E. J., Murshudow, G. N., Addy, C., Wilkinson, A. J. (1997) *Structure* **5**, 1017 – 1032.
- Valentin-Hansen, P., Larsen, J. E. L., Hojrup, P., Short, S. A., Barbier, C. S. (1986) *Nucl. Acids Res.* **14**, 2215 – 2228.
- von Wilcken-Bergmann, B., Müller-Hill, B. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**, 2427 - 2431.
- von Wilcken-Bergmann, B. (1983) Dissertation, Universität zu Köln.
- Vossen, K. M., Fried, M. G. (1997) *Anal. Biochem.* **245**, 85 – 92.
- Vyas, N. K., Vyas, M. N., Quioco, F. A. (1988) *Science* **242**, 1290 – 1295.
- Vyas, N. K., Vyas, M. N., Quioco, F. A. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 5226 – 5237.
- Weickert, M. J., Adhya, S. (1992a) *J. Mol. Biol.* **226**, 69 - 83.
- Weickert, M. J., Adhya, S. (1992b) *J. Biol. Chem.* **267**, 15869 - 15874.
- Zimmermann, O. (1997) Diplomarbeit, Universität zu Köln.

Zusammenfassung

Lac Repressor, das regulative Protein des *lac* Operons aus *Escherichia coli*, ist ein Tetramer, das aus vier identischen Untereinheiten besteht. Als Tetramer verfügt Lac Repressor über zwei unterschiedliche Oberflächen zur Protein-Protein-Interaktion: das Monomer-Monomer-Interface, das den Zusammenschluss von zwei Monomeren zu einem Dimer ermöglicht, und das Dimer-Dimer-Interface, das die Tetramerisierung bewirkt. Frühere Studien haben gezeigt, dass insgesamt 15 Aminosäuren in 3 α -Helices an der spezifischen Interaktion zwischen zwei Monomeren in einem Dimer beteiligt sein können. Im Rahmen dieser Studie wurden diverse Austausche innerhalb des Monomer-Monomer-Interface *in vivo* analysiert.

Die Analyse dieser 15 Position anhand von Austauschen hat gezeigt, dass der größte Teil dieser Reste innerhalb des Dimerisierungsmechanismus von Lac Repressor eher stabilisierende als interagierende Funktionen hat. Essentielle Bedeutung für die Dimerisierung von Lac Repressor haben die Positionen L251, D278 und Y282. Während Austausche an den Positionen L251 und Y282 in der Regel zum Funktionsverlust des Lac Repressors führen, konnte an Position D278 durch den Austausch zu Leucin eine Änderung der Dimerisierungsspezifität erreicht werden.

Durch die Spezifitätsänderung D278L konnte eine direkte Interaktion zwischen L251 und D278 über das Monomer-Monomer-Interface nachgewiesen werden. Trotzdem wurden durch geladene Austausche an diesen beiden Positionen keine Heterodimere mit Lac Repressor erreicht, so dass die Vermutung nahe liegt, dass dieser Kontakt nicht der einzige ist, der berücksichtigt werden muss.

Anhand der monomeren Mutante L251A konnte gezeigt werden, dass die Dimerisierung im Lac Repressor Tetramer gegenüber der Tetramerisierung eine untergeordnete Rolle spielt. Sobald durch das „heptad repeat“ die Möglichkeit gegeben ist Tetramere auszubilden, kann der Verlust der Dimerisierungsfähigkeit ausgeglichen werden, solange das Dimerisierungsinterface nicht so extrem gestört wurde, dass eine Abstoßung erfolgt. Ebenfalls ergab die Analyse von L251A, dass eine Aneinanderlagerung von zwei Monomeren zu einem Dimer auf der DNA möglich ist, wenn die DNA-Bindung soweit gefestigt wird, dass der Verlust der Dimerisierung ausgeglichen werden kann.

Mit Hilfe der Kenntnisse über die Dimerisierungsoberfläche von Lac Repressor, wurde weiterhin versucht aus dem monomeren periplasmatischen zuckerbindenden Protein RBP, das sowohl strukturell als auch auf der Basis der Aminosäuresequenz homolog zu Lac Repressor ist, ein dimeres DNA-bindendes Protein zu machen. Diese Versuche sind aber bisher nicht erfolgreich gewesen.

Abstract

Lac Repressor the regulatory protein of the *lac* operon of *Escherichia coli* is a tetrameric protein, which consists of 4 identical subunits. Lac Repressor contains two different interfaces for protein-protein-interaction: the monomer-monomer-interface which causes two monomers to form a dimer, and the four-helical-bundle responsible for tetramer-formation. Previous studies have shown that 15 amino acids within 3 α -helices could participate in the specific interaction between two monomers within a dimer. In this study various substitutions within the monomer-monomer-interface were analysed *in vivo*.

The analysis of substitutions of these 15 amino acids has shown that most of these residues have more stabilising than interacting functions. The positions L251, D278 and Y282 play an essential role in dimerisation of Lac repressor. While substitutions at position L251 and Y282 of the Lac repressor result in a loss of function, substituting residue D278 by leucine changes the specificity of dimerisation.

The change of specificity achieved by D278L demonstrates a direct interaction between L251 and D278 across the monomer-monomer-interface. However, the substitution of residues L251 and D278 by differently charged amino acids did not result in heterodimeric Lac repressor. Thus additional contacts are likely and may occur between residues R255, C281 and I283.

The analysis of the monomeric mutant L251A showed that dimerisation within the Lac repressor tetramer is not as important as tetramer formation. In addition it has been shown for L251A that a tighter binding of operator DNA may also help to regain function, if two monomers do not repel each other.

Experiments designed to transform the monomeric periplasmic sugarbinding protein RBP which exhibits structural and sequence homologies to Lac repressor into a dimeric DNA-binding protein by fusing it to the Lac Repressor headpiece and adjusting the corresponding surface on the basis of the knowledge about the dimerisation interface of Lac repressor have so far not been successful.

Lebenslauf

Name: Spott
Vorname: Stefanie
Geburtstag/-ort: 11.02.1973, Recklinghausen
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulausbildung

1979 - 1983 Preinschule in Bergkamen
1983 - 1992 Städtisches Gymnasium Bergkamen
seit Juni 1992 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

1992 Immatrikulation im Fach Biologie an der Universität zu Köln
Okt. 1994 Vordiplom
Jan. 1997 Diplomhauptprüfung in den Fächern:
Genetik, Biochemie und Organische Chemie
1997 - 1998 Diplomarbeit am Institut für Genetik der Universität zu Köln
Thema: Analyse der Dimerisierungsregion von Lac Repressor aus E.
coli
Leiter: Prof. Dr. Benno Müller-Hill
1998 – 2001 Mitglied des Graduiertenkollegs:
„Genetik zellulärer Systeme“
1998 – 2001 Dissertation im Institut für Genetik der Universität zu Köln
Thema: Die Dimerisierungsoberfläche von Lac Repressor aus E. coli
Leiter: Prof. Dr. Benno Müller- Hill

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zu Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von den unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Benno Müller-Hill betreut worden.

Teilpublikationen:

Dong, F., Spott, S., Zimmermann, O., Kisters-Woike, B., Müller-Hill, B., Barker, A. (1999) *J. Mol. Biol.* **290**, 653 – 666; “Dimerisation Mutants of Lac Repressor. I. A monomeric Mutant, L251A, that Binds *lac* Operator DNA as a Dimer”.

Spott, S., Dong, F., Kisters-Woike, B., Müller-Hill, B. (2000) *J. Mol. Biol.* **296**, 673 – 684; “Dimerisation Mutants of Lac Repressor. II. A Single Amino Acid Substitution, D278L, Changes the Specificity of Dimerisation”.