

Strukturelle Basis für die kooperative Bindung des ω -Repressors an direkte und invertierte Wiederholungen von DNA-Heptaden

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde

Vorgelegt dem Fachbereich Chemie, Biologie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

von Wilhelm Weihofen

Berlin, den 31. Mai 2005

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2001 bis April 2005 unter Anleitung von Prof. Dr. Wolfram Saenger am Institut für Chemie/Kristallographie der Freien Universität Berlin im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfram Saenger
2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Höhne

Eingereicht am 01. Juni 2005

Tag der mündlichen Prüfung: 16. September 2005

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

→ oder ←	Symbolisiert die Richtung der Erkennungssequenz des ω -Repressors (DNA-Heptade mit der Sequenz 5' - ^A T ATCAC ^A T-3')
(→→)	18mer DNA mit 17 Basenpaaren und G, C Überhängen; enthält zwei direkt wiederholte Heptaden
(→←)	18mer DNA mit 17 Basenpaaren mit G, C Überhängen; enthält zwei invertiert wiederholte Heptaden
$\Delta 19\omega$	19 N-terminale Reste von WT ω wurden deletiert, neue N-terminale Aminosäure ist Met19
Å	1 Ångström = 0,1 nm
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar (doppelsträngige DNA)
CAP	Katabolisches Gen-Aktivator-Protein (<i>catabolite gene activator protein</i>)
CCD	<i>charge coupeld device</i>
CV	Säulenvolumen (<i>column volume</i>)
d	desoxy
Da	Dalton
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dsDNA	doppelsträngige DNA
H-Brücken	Wasserstoff-Brücken
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HTH-Motiv	Helix-Turn-Helix-Motiv
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria Bertani Medium
M	mol/L
M_w	Molekulargewicht, g/mol
N-terminal	Amino-terminal
NMR	Kernmagnetische Resonanz
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	<i>Brookhaven Protein data bank</i>
PEG X	Polyethylenglycol (mittlere Molmasse X g/mol)
RHH-Motiv	Ribbon-Helix-Helix-Motiv
rms	Wurzel des mittleren Fehlerquadrates (root mean square)
RNA	Ribonukleinsäure
ssDNA	einzelsträngige DNA (<i>single strand DNA</i>)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ü. N.	über Nacht
UV	ultraviolett
V_m	Elutionsvolumen
WT	Wildtyp
% (v/v)	Volumen des Stoffes bezogen auf das Volumen der fertigen Lösung
% (w/v)	x % (w/v) bedeutet x Gramm des Stoffes pro 100 mL fertige Lösung

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Genregulation	1
1.2	DNA-Erkennung durch β -Stränge	1
1.3	Die Struktur des ω -Repressors	3
1.3.1	ω gehört zur Überfamilie der MetJ/Arc-Repressoren	3
1.4	Die Operatoren der RHH-Repressoren	4
1.5	Modell eines ω -DNA Komplexes	7
1.6	Die Funktionen des ω -Repressors	9
1.6.1	Dauerhafte Erhaltung von Plasmiden in Prokaryoten	9
1.6.2	Mechanismen zur dauerhaften Erhaltung von pSM19035	10
1.6.3	Von ω regulierte Promotoren des Plasmids pSM19035	12
1.7	Zielsetzung	14
2	MATERIALIEN UND METHODEN	16
2.1	Materialien	16
2.1.1	Chemikalien, Enzyme und Kits	16
2.2	Allgemeine biochemische und molekularbiologische Arbeitsmethoden	18
2.2.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	18
2.3	Gentechnische Methoden	19
2.3.1	Transformation und Stammkulturen	19
2.3.2	Plasmidpräparation und Sequenzierung	19
2.3.3	<i>primer</i> -Design für die Mutagenese	20
2.3.4	Agarose-Gelelektrophorese	20
2.3.5	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	21
2.3.6	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	21
2.3.7	Klonierung von $\Delta I9\omega$	22
2.4	Proteinpräparation	23
2.4.1	Bakterienkultivierung	23
2.4.2	Zellaufschluss	24
2.4.3	Vorreinigung von $\Delta I9\omega$	24
2.4.4	Kationenaustausch-Chromatographie	24
2.4.5	Konzentrieren von Proteinlösungen	25
2.4.6	Gelpermeations-Chromatographie	26
2.4.7	Herstellung von Doppelstrang-DNA	26
2.4.8	Herstellung von ω -DNA Komplexen	27
2.5	Proteincharakterisierung	27
2.5.1	Konzentrationsbestimmungen	27
2.5.2	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	27
2.5.3	Dynamische Lichtstreuung	28
2.6	Kristallisation	28
2.6.1	Kristallisation in Kapillaren	29

2.7	Kristallographische Methoden	30
2.7.1	Messung von Röntgen-Diffraktionsdaten	30
2.7.2	Strukturbestimmung	31
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	35
3.1	Klonierung, Expression und Kristallisation	35
3.1.1	Das Expressionssystem für den WT ω -Repressor	35
3.1.2	Expression und Reinigung von WT ω	35
3.1.3	Reinigung von $\Delta 19\omega$	38
3.1.4	Kristallisation von WT ω -DNA Komplexen	42
3.1.5	Kristallformen von WT ω -DNA	44
3.1.6	Messung von Röntgen-Beugungsdaten.....	46
3.2	Röntgenstrukturanalysen	47
3.2.1	Die hexagonale Kristallform.....	47
3.2.2	Kristallformen von $\Delta 19\omega_2$ im Komplex mit ($\rightarrow\rightarrow$) und ($\rightarrow\leftarrow$)	53
3.2.3	Übersicht über die bestimmten Röntgenstrukturen.....	53
3.2.4	Strukturlösung mit molekularem Ersatz	55
3.3	Strukturanalysen	58
3.3.1	Strukturbeschreibung	58
3.3.2	Die Kristallstruktur von $[\Delta 19\omega_2]_2$ -($\rightarrow\leftarrow$)/($\rightarrow\leftarrow$)	62
3.3.3	Kristallpackung	63
3.3.4	Die freie DNA ermöglicht den Aufbau des Kristallgitters.....	66
3.4	Die Proteinketten in $\Delta 19\omega$-DNA-Komplexen	66
3.4.1	Die N-Termini der Proteine kontaktieren die DNA nicht	68
3.4.2	Überlagerung der $\Delta 19\omega$ -Dimere	68
3.4.3	Vergleich zwischen freiem und DNA-gebundenem Repressor	70
3.5	Repressor-Operator Kontakte	73
3.5.1	Die Interaktionsmuster für die $\Delta 19\omega_2$ -gebundenen Heptaden	76
3.5.2	Das Oberflächenpotential von $\Delta 19\omega_2$ gebunden an ($\rightarrow\rightarrow$)	79
3.5.3	Die mutierte Heptade $^8\text{AGTCACA}^{14}$ im Komplex mit $\Delta 19\omega_2$	80
3.5.4	Vergleich mit biochemischen Daten	81
3.6	Die Operator-DNA in $[\Delta 19\omega_2]_2$-($\rightarrow\rightarrow$)	82
3.6.1	Geometrien der Basenpaare in $[\Delta 19\omega_2]_2$ -($\rightarrow\rightarrow$).....	83
3.6.2	Die freie ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA.....	89
3.7	Die DNA-DNA-Kristallkontakte	92
3.7.1	Die beiden G*(G-C)-Basentriplets.....	92
3.7.2	Basenstapel vermitteln einen zweiten DNA-DNA-Kontakt	95
3.8	Die Dimer-Dimer Grenzfläche des $[\Delta 19\omega_2]_2$-($\rightarrow\rightarrow$)	97
3.9	Vergleich von $[\Delta 19\omega_2]_2$-($\rightarrow\rightarrow$) und $[\Delta 19\omega_2]_2$-($\rightarrow\leftarrow$)	99
3.10	Konsistenz mit biochemischen Befunden	101
3.10.1	Mutationen des ω -Repressors	101
3.10.2	Biochemische Studien zur Bindung von ω_2 an die Heptaden	103
3.11	Die Funktion des N-Terminus	105
3.11.2	Der N-Terminus interagiert mit dem δ -Protein	107
3.11.3	Vergleich mit Repressoren der MetJ/Arc-Überfamilie	109
3.11.4	Modell eines natürlichen ω -Repressor-Operator-Komplexes	116
3.11.5	Von ω_2 reprimierte Promotoren der <i>inc18</i> Plasmidfamilie	117

4	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	120
5	SUMMARY	122
6	LITERATURVERZEICHNIS	123
7	ANHANG	131
7.1	Protein-DNA Kontakte in $[\Delta 19\omega_2]_2^-(\rightarrow\rightarrow)$	131
7.2	Protein-DNA Kontakte in $[\Delta 19\omega_2]_2^-(\rightarrow\leftarrow)$	132
7.3	Dimer-Dimer-Kontakte.....	134
8	LEBENS LAUF	135
9	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	136

4 Zusammenfassung und Ausblick

Der vom *Streptococcus pyogenes* Plasmid pSM19035 kodierte ω -Repressor reguliert die Expression von Genen, deren Genprodukte an der Kontrolle der Kopienzahl und der dauerhaften Erhaltung des Plasmids im Wirt beteiligt sind. Der ω -Repressor gehört zur Familie der MetJ/Arc-Überfamilie DNA-bindender Proteine mit RHH-Motiv, die mit einem antiparallelen, zweisträngigen β -Faltblatt in die große Furche der DNA binden. Die strukturell bekannten RHH-Proteine binden alle an palindromische Operatoren. Demgegenüber bindet der ω -Repressor kooperativ an 4 bis 10 Kopien aufeinander folgender Heptaden ($5' \text{-}^A/T \text{ATCAC}^A/T \text{-}3'$, symbolisiert durch \rightarrow), welche palindromisch in ($\rightarrow\leftarrow$) und ($\leftarrow\rightarrow$) Anordnungen vorliegen können, aber auch direkt und damit nicht-palindromisch als ($\rightarrow\rightarrow$) wiederholt werden können.

In dieser Arbeit konnten die Strukturen des N-terminal verkürzten ω -Repressors $\Delta 19\omega$ aufgeklärt werden, der als Dimer ($\Delta 19\omega_2$) an zwei minimale Operatoren mit zwei Heptaden in einer palindromischen ($\rightarrow\leftarrow$) und in einer nicht-palindromischen Anordnung ($\rightarrow\rightarrow$) gebunden ist. Die $\Delta 19\omega$ -Dimere binden asymmetrisch an die Heptaden, und Interaktionen zwischen den Helizes $\alpha 1$ benachbarter $\Delta 19\omega$ -Dimere sorgen für die kooperative Bindung. Die pseudo-C_{2M}-Rotationsachse, welche die beiden Untereinheiten der Dimere ineinander überführt, schneidet die lokale DNA-Helixachse aussermittig $\sim 0,3 \text{ \AA}$ stromabwärts des zentralen GC-Basenpaars der Heptaden ($5' \text{-}^A/T \text{AT}\underline{\text{C}}\text{AC}^A/T \text{-}3'$). Dies hat zur Folge, dass die zwei an ($\rightarrow\rightarrow$) gebundenen Dimere einen Abstand von exakt 7-bp zueinander einhalten, an ($\rightarrow\leftarrow$) gebunden verkürzt sich dieser Abstand jedoch um $0,6 \text{ \AA}$. Trotzdem wird in beiden Strukturen ein identischer Dimer-Dimer Kontakt beobachtet, und der verkürzte Dimer-Dimer-Abstand wird durch eine Konformationsänderung der $\alpha 1$ Helix gegenüber der Kernstruktur des zugehörigen Dimers kompensiert.

Aufgrund dieser beiden Strukturen kann für die Bindung des ω -Repressors an Operatoren mit einer ($\leftarrow\rightarrow$)-Anordnung vorhergesagt werden, dass die Dimere $0,6 \text{ \AA}$ weiter voneinander entfernt an die Heptaden binden als dies für die Bindung an ($\rightarrow\rightarrow$) der Fall ist. Möglicherweise ähnelt der Dimer-Dimer Kontakt dieses Komplexes den in dieser Arbeit beobachteten, jedoch müssen sich die Helizes $\alpha 1$ weiter von der Kerndomänen der Dimere entfernen, was wahrscheinlich energetisch ungünstig ist. So ist die sechsfach schlechtere Bindung von ω_2 an ($\leftarrow\rightarrow$) gegenüber ($\rightarrow\rightarrow$) und ($\rightarrow\leftarrow$) zu erklären. Die vom ω -Repressor reprimierten Promotoren der Plasmide der *inc18* Familie nutzen diese Unterschiede in der

Bindungsaffinität von ω_2 für verschiedene Anordnungen der Heptaden als Instrument für die Modulation der Promotoraktivität.

Neben den $\Delta 19\omega$ -DNA-Komplexen wurde in den asymmetrischen Einheiten der Kristallstrukturen auch freie (unbesetzte) Operator-DNA beobachtet. Dadurch konnte detailliert beschrieben werden, welche Konformationsänderungen die Operator-DNA bei der Bindung des Repressors eingeht. Interessanterweise nimmt die freie DNA bereits eine charakteristische Konformation ein, welche bei der Repressor-Bindung nur geringfügig verändert wird.

Biochemischen Studien zufolge bindet der N-Terminus des ω -Repressors an das ParA homologe δ -Protein und stimuliert dessen ATPase Aktivität. Damit könnte der ω -Repressor die Bindung des δ -Proteins an die Plasmide vermitteln und so die Rolle des bisher unbekanntes ParB-Partners in bekannten ParA/ParB-Systemen zur Plasmid-Verteilung übernehmen. Weitere Studien zur aktiven Plasmid-Verteilung während der Zellteilung werden zur Zeit in Zusammenarbeit mit Aslan Cicek unternommen. Insbesondere sollen mittels Cryo-elektronenmikroskopischer Studien Aufschluss über die Struktur und Zusammensetzung des Nucleoprotein-Komplexe bestehend aus ω -Repressor, δ -Protein und Operator-DNA liefern.

5 Summary

Homodimeric ribbon-helix-helix (RHH₂) proteins of the MetJ/Arc superfamily feature a symmetric antiparallel β -sheet and bind cooperatively as (RHH₂)₂ or RHH₂-oligomers to the major groove of $\sim 50^\circ$ bent palindromic operators. As a member of this family, the *Streptococcus pyogenes* plasmid pSM19035 encoded ω regulates transcription of genes required for copy number control and stable maintenance of *inc18* family plasmids. ω dimers (ω_2) bind cooperatively to promoters consisting of 7 to 10 consecutive non-palindromic heptad repeats (5'-^A/TATCAC^A/T-3', symbolized by \rightarrow) in palindromic inverted ($\rightarrow\leftarrow$) or ($\leftarrow\rightarrow$) orientation and also uniquely to non-palindromic direct ($\rightarrow\rightarrow$) repeats. This work presents crystal structures of N-terminally truncated ω -Repressor ($\Delta 19\omega_2$) bound to nearly straight B-form minimal operators with ($\rightarrow\rightarrow$) and ($\rightarrow\leftarrow$) repeats. Since the pseudo-twofold axis relating the monomers in $\Delta 19\omega_2$ passes the central CG base-pair of each heptad with ~ 0.3 Å downstream offset, the separation between the pseudo-twofold axes is 7 base-pairs in ($\rightarrow\rightarrow$), ~ 0.6 Å shorter in ($\rightarrow\leftarrow$) but ~ 0.6 Å longer in ($\leftarrow\rightarrow$). These variations grade interactions between $\alpha 1$ -helices of adjacent $\Delta 19\omega_2$ and explain the sixfold reduced affinity for the binding of $\Delta 19\omega_2$ to ($\leftarrow\rightarrow$) compared to strong binding to heptads in ($\rightarrow\leftarrow$) or ($\leftarrow\rightarrow$) arrangements. The different dimer-dimer interactions contribute to modulations in cooperative binding affinity of ω_2 to natural operators with different heptad orientations.

Biochemical studies revealed, that the probably unstructured N-terminus of ω -Repressor binds to the ParA homologous δ -Protein and stimulates its ATPase activity. δ -Protein is involved in active partitioning of plasmid pSM19035 during cell division. This result indicates, that ω -repressor is the missing ParB partner of known ParA/ParB systems involved in plasmid partitioning. Further studies in cooperation with Aslan Cicek will employ cryo-electron microscopy to study nucleoprotein complexes formed between Operator-DNA, ω -Repressor and δ -Protein.