

1 Einleitung

1.1 Genregulation

Genregulation erfolgt sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten meist durch Proteine die spezifisch an DNA-Sequenzen binden. Quelle dieser Spezifität ist die Erkennung von Basenpaaren in der großen und kleinen Furche der DNA durch das Protein. Diese Art der Erkennung erfolgt meist über die Ausbildung von H-Brücken aber auch hydrophobe Wechselwirkungen spielen eine Rolle. Einen zweiten Beitrag zur spezifischen DNA-Erkennung liefern die sequenzabhängigen Vorzugskonformationen des DNA-Rückgrats (von Hippel und Berg, 1986; Brennan und Matthews, 1989b; Brennan und Matthews, 1989a; Pabo und Sauer, 1992). Strukturelle Studien an einer Reihe von Repressoren und Aktivatoren führten zu Tage, dass verschiedene konservierte Motive die spezifische DNA-Erkennung erlauben. Viele prokaryotische, DNA-bindende Proteine besitzen Domänen mit einem Helix-Turn-Helix-Motiv (HTH), welches erstmals in den Kristallstrukturen des katabolischen Gen-Aktivatorproteins (CAP) (McKay und Steitz, 1981) und dem *cro*-Repressor des λ Bakteriophagen (Anderson *et al.*, 1981) beobachtet wurde. Das HTH-Motiv bindet zur DNA-Erkennung mit einer α -Helix in die große Furche der DNA. Andere Strukturen DNA-bindender Domänen zeigen zum Beispiel das Zink-Finger-Motiv und das Leucin-Reißverschluss-Motiv. Natürlich zählen auch alle DNA-modifizierenden Enzyme wie Methyltransferasen, Endonucleasen und die DNA-Polymerasen zu den DNA-bindenden Proteinen (Luscombe *et al.*, 2000).

1.2 DNA-Erkennung durch β -Stränge

Die Ribbon-Helix-Helix (RHH) Proteine sind eine wachsende Familie von DNA-bindenden Proteinen, und einige konnten wie in Tab. 1 zusammengefasst röntgenkristallographisch oder mittels NMR Spektroskopie untersucht werden, dazu zählen Mnt (Burgering *et al.*, 1994), NikR (Schreiter *et al.*, 2003) und ParG (Golovanov *et al.*, 2003). Drei RHH-Proteine konnten sowohl frei als auch im Komplex mit Operator-DNA strukturell bestimmt werden, zuerst MetJ aus *E. coli* (Rafferty *et al.*, 1989; Somers und Phillips, 1992) dann der Arc-Repressor der Bakteriophage P22 (Breg

et al., 1990; Raumann *et al.*, 1994; Schildbach *et al.*, 1999) und CopG des promiskuitiven Plasmids pMV158 aus *Streptokokken* (Gomis-Ruth *et al.*, 1998). Zu den Charakteristika der DNA-bindenden Domäne der als Dimer vorliegenden RHH-Proteine zählt das zweisträngige antiparallele β -Faltblatt, wobei jedes Monomer einen β -Strang beisteuert (Abb. 1). Gefolgt wird der β -Strang von zwei α -Helizes ($\alpha 1$ und $\alpha 2$) wobei der Dimer-Kontakt hauptsächlich durch die H-Brücken innerhalb des β -Faltblatts sowie durch Kontakte zwischen den $\alpha 2$ -Helizes vermittelt wird. Zur DNA-Bindung lagern die RHH Proteine das β -Faltblatt in die große Furche der DNA ein (Abb. 4), und Seitenketten des β -Faltblatts interagieren dort über H-Brücken und hydrophobe Kontakte sequenzspezifisch mit Nucleotid-Basen. Kontakte zum DNA-Rückgrat werden durch Aminosäuren beider Helizes $\alpha 1$ und $\alpha 2$ sowie der dazwischen liegenden Schlaufenregion beigesteuert.

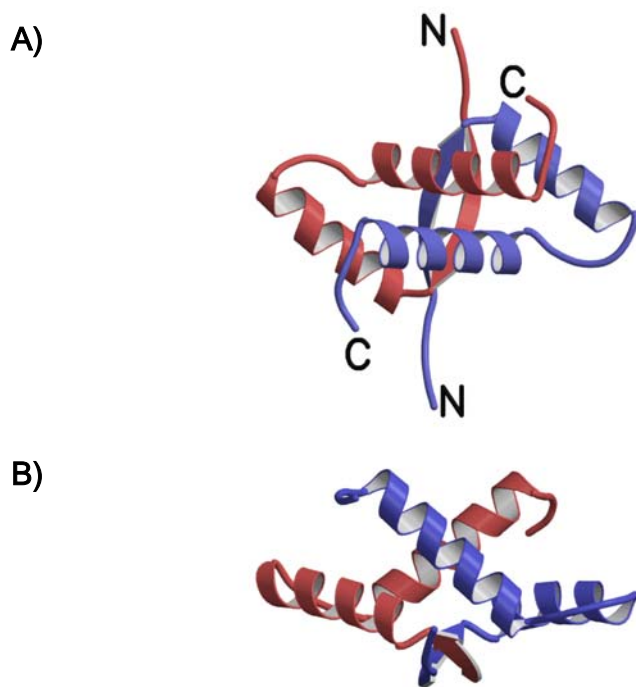


Abbildung 1 Bänderdarstellung der Kristallstruktur des RHH-Proteins ω . Die beiden Untereinheiten des Dimers (ω_2) sind in rot und blau dargestellt. (A) Ansicht „von oben“ auf das Dimer mit der pseudo-zweizähligen Achse, welche die beiden Untereinheiten ineinander überführt, senkrecht zur Papierebene. (B) „Seiten“-Ansicht von ω_2 , die pseudo-zweizählige Achse liegt nun vertikal in der Papierebene. Das gewundene antiparallele β -Faltblatt ist an der Oberfläche des Dimers exponiert und senkrecht zur pseudo-zweizähligen Symmetrieachse orientiert. Die Polypeptidkette des ω -Proteins wurde während der Kristallisation nach den 20 N-terminalen Resten gespalten. Dem N-Terminus folgt ein kurzer β -Strang, welcher wiederum von den α -Helizes $\alpha 1$ und $\alpha 2$ gefolgt wird. Der β -Strang und Helix $\alpha 2$ vermitteln den Dimer-Kontakt. Die Abbildung wurde (Murayama *et al.*, 2001) entnommen.

1.3 Die Struktur des ω -Repressors

Ein gemeinsames Merkmal aller strukturell bekannten Mitglieder der MetJ/Arc-Überfamilie ist eine dimere Struktur mit einem RHH-Motiv und einem starren hydrophoben Kern (Phillips, 1994; Raumann *et al.*, 1994; Suzuki, 1995). Der vom Plasmid pSM19035 aus *Streptococcus pyogenes* kodierte ω -Repressor konnte anhand seiner Kristallstruktur ebenfalls der Familie der RHH-Repressoren zugeordnet werden. Die kompakte Struktur des ω -Repressors ist in Abb. 1 in zwei Orientierungen dargestellt (Murayama *et al.*, 2001). Der ω Repressor besteht aus 71 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 7.989 Da. Da während der Kristallisation des ω -Repressors die 20 N-terminalen Reste abgespalten wurden ($\Delta 20\omega$) und die Reste 21 und 22 fehlgeordnet sind, zeigt die Kristallstruktur in Abb. 1 lediglich die Reste 23-71.

Sekundärstruktur-Vorhersagen deuten darauf hin, dass der komplette N-Terminus von ω flexibel und unstrukturiert vorliegt (Misselwitz *et al.*, 2001; Murayama *et al.*, 2001). Die Reste Lys28-Val32 beider Untereinheiten formen ein β -Faltblatt, welches stark gewunden ist. Die folgenden Helizes $\alpha 1$ (Ala34 bis Asn47) und $\alpha 2$ (Val51 bis Tyr66) vervollständigen die Struktur und werden durch eine relativ flexible Schlaufenregion verbunden, welche zwei Glycine enthält (Gly48 und Gly49). Gly48 liegt in fast allen bekannten RHH Proteinen konserviert vor (Abb. 3). Sowohl die Länge des Schlaufenbereichs zwischen den Helizes als auch die Orientierung der Helizes zueinander zeigt eine auffallende Ähnlichkeit mit dem in Kapitel 1.1 erwähnten HTH-Motiv zur DNA-Bindung. Daher wurde eine evolutionäre Verwandtschaft für das Hervorgehen des RHH-Motivs aus dem HTH-Motiv postuliert (Gomis-Rüth *et al.*, 1998).

Die Monomer-Monomer Grenzfläche des Homodimers $\Delta 20\omega_2$ verdeckt 1800 \AA^2 Oberfläche, die in getrennten Monomeren Lösungsmittel-zugänglich wäre. Wie in den anderen RHH-Proteinen wird die Oberfläche überwiegend von Kontakten zwischen den Helizes $\alpha 2$ und den Strängen des β -Faltblatts gebildet.

1.3.1 ω gehört zur Überfamilie der MetJ/Arc-Repressoren

Eine Anpassung der Aminosäuresequenzen und Sekundärstrukturelemente in Abb. 3 mit den strukturell bekannten Mitgliedern der Überfamilie der MetJ/Arc-Repressoren der RHH-Repressoren zeigt eine geringe Sequenzidentität unter 15%. Die

Strukturverwandtschaft ist jedoch eindeutig. Eine Überlagerung der $C\alpha$ -Atome der Polypeptidrückgrate von ω und dem MetJ-Repressor zeigt rms Abweichungen von 2.2 Å, während für die Überlagerung mit Arc und Mnt rms Abweichungen von 3.0 und 3.2 Å beobachtet werden (Murayama *et al.*, 2001).

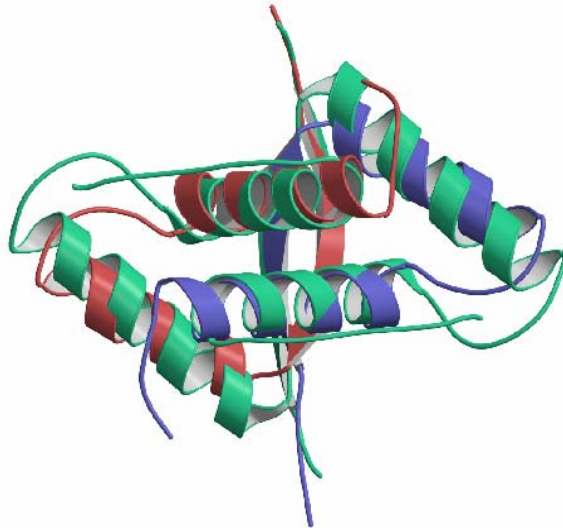


Abbildung 2 Überlagerung der Strukturen des ω -Repressors mit dem MetJ-Repressor. Die Monomere des ω -Repressors sind rot und blau während beide Monomere des MetJ-Repressors sind in grün dargestellt. Die überlagerten $C\alpha$ -Atome zeigen eine rms Abweichung von 2.2 Å für die Überlagerung der Reste 28-68 des ω -Repressors mit entsprechenden Resten des MetJ-Repressors.

1.4 Die Operatoren der RHH-Repressoren

Die strukturell bekannten Repressoren der MetJ/Arc-Überfamilie liegen in Lösung als Dimer vor, binden jedoch kooperativ unter Ausbildung von Dimer-Dimer Kontakten an ihre Operatoren, so dass die Repressoren bei Bindung an Operator-DNA Tetramere (zwei benachbarte Dimere) oder Oligomere formen (mehrere Dimere nebeneinander). Die Affinität für die Bindung der RHH-Dimere an eine einzelne Erkennungssequenz ist in allen bekannten Fällen moderat mit Dissoziations-Konstanten im μM Bereich. Die RHH-Dimere binden jedoch sehr stark an natürliche Operatoren mit mehreren aufeinander folgenden Erkennungssequenzen mit Dissoziations-Konstanten im nM Bereich. Die Operatoren der RHH-Proteine besitzen charakteristische Eigenschaften bezüglich der Anzahl und Länge in Basenpaaren (bp) sowie der Symmetrie ihrer Erkennungssequenzen. So besitzen die Operatoren des MetJ-Repressors zwei- bis fünffach aufeinander folgende Wiederholungen einer 8-bp

langen, palindromischen Sequenz (vergleiche Tab. 1) (Phillips *et al.*, 1989). Die Kristallstruktur des MetJ-Repressors im Komplex mit zwei aufeinander folgenden Erkennungssequenzen zeigte, dass die beiden MetJ-Dimere symmetrisch an die palindromischen Erkennungssequenzen binden (Somers und Phillips, 1992), d. h., die Untereinheiten der Dimere bilden die gleichen Kontakte zur Erkennungssequenz aus.

Dem gegenüber interagieren die Repressoren Arc und CopG asymmetrisch mit zwei nicht-palindromischen Erkennungssequenzen (Raumann *et al.*, 1994; Gomis-Ruth *et al.*, 1998). Die Erkennungssequenzen bilden Halbseiten des Operators und sind invertiert zueinander angeordnet, so dass der gesamte Operator ein teilweise degeneriertes Palindrom darstellt. Die Zentren der Erkennungssequenzen besitzen einen Abstand von 10 und 11 bp für CopG bzw. Arc. Anhand von Hydroxylradikal-Spaltungs-Experimenten (*foot printing*) konnte gezeigt werden, dass ausgehend von den beiden an den palindromischen Operator gebundenen CopG-Dimeren sich weitere Dimere unspezifisch auf der DNA anlagern und so oligomerisieren können (Costa *et al.*, 2001).

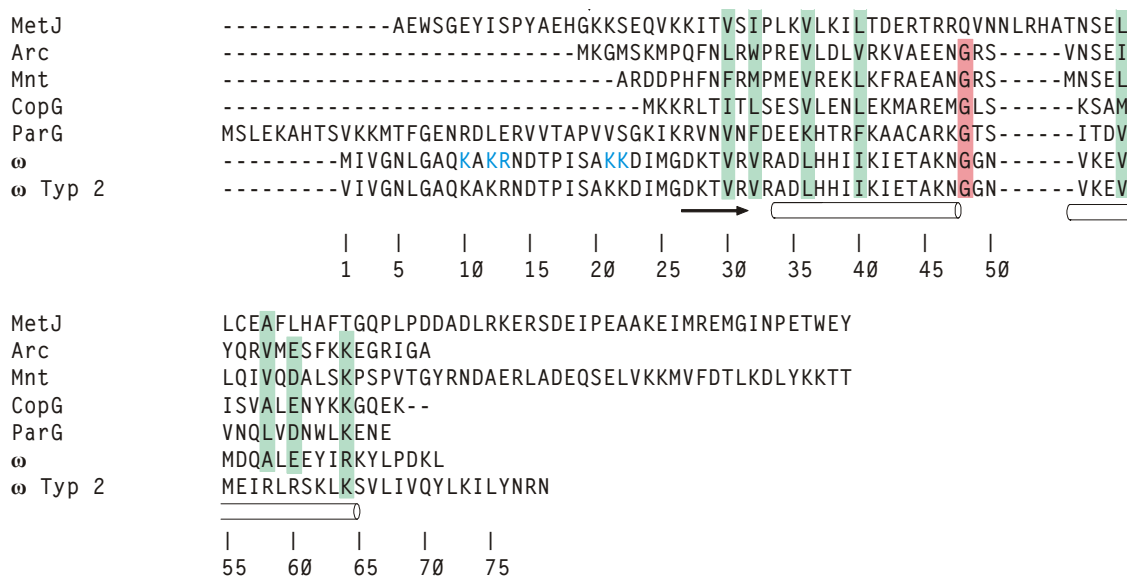


Abbildung 3 Anpassung der Aminosäuresequenzen und Sekundärstrukturelemente des ω-Repressors mit anderen strukturell bekannten Mitgliedern der MetJ/Arc-Repressor Überfamilie. Die Aminosäuresequenzen sind aus den Nucleotidsequenzen der entsprechenden Gene abgeleitet. Der Pfeil kennzeichnet den β-Strang und die Zylinder die α-Helizes des ω-Repressors. Die konservierten Glycine in der Verbindungsregion zwischen den Helizes α1 und α2 sind rot hinterlegt, und konservierte hydrophobe oder geladene Aminosäuren sind grün hinterlegt. Auffällig ist die grosse Zahl positiv geladener Reste N-terminal des β-Faltblatts (blau). Abbildung adaptiert von K. Murayama.

Bisher wurden lediglich die RHH-Domänen der Repressoren beschrieben. Neben dieser besitzen einige Repressoren zusätzliche Domänen. So übernimmt die C-terminale Region von MetJ die Bindung des Co-Repressors S-Adenosyl-Methionin (Rafferty et al., 1989). Der N-Terminus des Arc-Repressors wiederum formt eine 3_{10} -Helix, welche mit dem DNA-Rückgrat interagiert (Raumann et al., 1994). Vom Mnt-Repressor des *Salmonella typhimurium* Bakteriophagen P22 wurde die NMR-Struktur einer N-terminalen RHH-Domäne berichtet (Burgering et al., 1994). Diese liegt in Lösung als Dimer vor, der Wildtyp Mnt-Repressor ist jedoch ein Tetramer, und in einer NMR-Studie konnte gezeigt werden, dass die C-terminalen Domänen des Mnt-Repressors zur Tetramerisierung ein Vier-Helizes-Bündel ausbilden (Nooren et al., 1999). Dementsprechend sind die Bindungsstellen für die Mnt-Dimere nicht unmittelbar aufeinander folgend, sondern durch längere DNA-Bereiche getrennt. Diese Trennung der Bindungsstellen wird auch für den auf Nickel reagierenden Repressor (*nickel responsive repressor*) NikR aus *E. coli* beobachtet, welcher ebenfalls über eine C-terminalen Domäne verfügt, die in Anwesenheit von Ni^{2+} Ionen ein Tetramer bildet. Auch hier ermöglicht die Tetramerisierung eine Verstärkung der DNA-Affinität (Chivers und Sauer, 1999; Schreiter et al., 2003).

Tabelle 1

Strukturell bekannte Repressoren mit RHH-Domäne.

Außerdem sind die Strukturen von RHH-Repressoren im Komplex mit Operatoren aufgelistet. Die Sequenzen, Anzahl der Wiederholungen und Orientierungen der Erkennungssequenzen der Operatoren sind angegeben. Fett gedruckte Nucleotide sind konserviert und werden durch die Symmetrieachse des Palindroms wiederholt. In Klammern sind die Einträge der Strukturen in die Brookhaven Protein-Datenbank (PDB) angegeben. IR bedeutet invertierte Wiederholung (*inverted repeat*). |< >| symbolisiert den Abstand zwischen den Zentren benachbarter Erkennungssequenzen.

RHH-Protein	Freies RHH ₂ PDB Eintrag	RHH ₂ -DNA PDB Eintrag	Erkennungssequenz für RHH ₂		# Wiederholungen	Symmetrie Interaktionen RHH ₂ -DNA	Dimer-Dimer-Kontakt
			Sequenz	< >			
ω	X-ray (1IRQ) (Murayama <i>et al.</i> , 2001)		5'- ^A / _T ATCAC ^A / _T -3'	7	4 - 10	asym	
MetJ	X-ray (1CMB, 1CMC) (Rafferty <i>et al.</i> , 1989)	X-ray (1CMA) (Somers und Phillips, 1992)	5'-AGACGTCT-3' (Palindrom)	8	2-5	sym	Helix α1
CopG	X-ray (2CPG) (Gomis-Ruth <i>et al.</i> , 1998)	X-ray (1B01) (Gomis-Ruth <i>et al.</i> , 1998)	5'-ATT GCA TTG-3' (Operator-Halbseite)	10	2 als IR	asym	Helix α2
Arc	NMR (1AAR) (Breg <i>et al.</i> , 1990)	X-ray (1PAR) (Raumann <i>et al.</i> , 1994)	5'-ATAG TAG AGTG-3' (Operator-Halbseite)	11	2 als IR	asym	Schlaufenregion zw. α1 und α2
Mnt	NMR (1MNT) (Burgering <i>et al.</i> , 1994)				2 getrennt voneinander		
ParG	NMR (1P94) (Golovanov <i>et al.</i> , 2003)				?		
NikR	X-ray (1Q5Y) (Schreiter <i>et al.</i> , 2003)				2 getrennt voneinander		

1.5 Modell eines ω-DNA Komplexes

Wie in Kapitel 1.3.1 beschrieben, zeigt der ω-Repressor die größte Strukturverwandtschaft zum MetJ-Repressor. Die Erkennungssequenz des ω-Repressors ist eine Heptade mit der Sequenz 5'-^A/_T ATCAC ^A/_T-3' und der Abstand von 7-bp zwischen wiederholten Erkennungssequenzen kommt den 8-bp des MetJ-Repressors nahe (Tab. 1). Anhand der MetJ-Operator Struktur (PDB Eintrag 1CMA) wurde ein Modell des an DNA gebundenen ω-Repressors erstellt (Abb. 4). Die potentiell an der direkten Erkennung von Nucleotid-Basen beteiligten Reste Arg31 zeigen in die große Furche der DNA und könnten dort Kontakte zu den beiden Guaninen der Heptade ausbilden. In diesem Fall würden die beiden Arg31 des pseudo-symmetrischen ω-Dimers

asymmetrisch an die nicht-palindromischen Heptaden binden (de la Hoz *et al.*, 2004). Weitere potentiell an direkten Basenkontakten beteiligte Aminosäuren sind die beiden Thr29 in der Mitte des β -Faltblatts. Aufgrund des Modells in Abb. 4 sollten die ω -Dimere eine linksgängige Protein-Matrix um die rechtsgängige DNA bilden, wenn alle 7 bis 10 Heptaden in natürlichen Promotoren des Plasmids pSM19035 besetzt werden (Kap. 1.6.3.1). Die kooperative Bindung an die Heptaden könnte durch Interaktionen der Helizes $\alpha 1$ vermittelt werden, dazu müssten sich diese weiter nähern als es im Modell von Abbildung 4 der Fall ist. Dies könnte z. B. durch Biegung der DNA ermöglicht werden.



Abbildung 4

ω -DNA Komplex modelliert auf Basis des MetJ-DNA Komplexes.

Drei ω -Dimere als Bänderdarstellung (gelb/orange, grün/dunkelgrün und blau/dunkelblau) wurden an ein 25-bp langes, gerades DNA-Fragment modelliert, das drei Wiederholungen der Erkennungs-Heptaden trägt. Die Sequenz der Erkennungsheptaden lautet $5' \text{ }^A\text{ }_T \text{ ATCAC } \text{ }^A\text{ }_T \text{ } 3'$. Die zu den drei zentralen Nucleotiden $5' \text{ }^A\text{ }_T \text{ } 3'$ der Heptade komplementären Nucleotide $5' \text{ }^A\text{ }_T \text{ } 3'$ sind in grün dargestellt. Die auf dem zweisträngigen β -Faltblatt lokalisierten Arg31 jedes Dimers ragen in die große Furche der DNA und sind potentielle Bindungspartner für Guanine. Die Helizes $\alpha 1$ der Dimere haben in diesem Modell einen zu großen Abstand, um Dimer-Dimer-Kontakte auszubilden und so eine kooperative Bindung zu vermitteln. Es wurde vermutet, dass ω die DNA in natürlichen Operatoren biegt und so Interaktionen zwischen den Helizes $\alpha 1$ ermöglicht werden. Wenn ω -Dimere in der dargestellten Weise an 7 bis 10 aufeinander folgende Heptaden in natürlichen Promotoren binden, bilden sie eine linksgängige Protein-Matrix um die rechtsgängige DNA (de la Hoz *et al.*, 2004).

1.6 Die Funktionen des ω -Repressors

1.6.1 Dauerhafte Erhaltung von Plasmiden in Prokaryoten

Plasmide sind extrachromosomale genetische Elemente, die sich selbständig replizieren und in fast allen Bakterienspezies vorkommen. Darüber hinaus erfolgt die Replikation und Vererbung vieler Plasmide sehr exakt und jede Tochterzelle wird während der Zellteilung mit mindestens einer Plasmidkopie versorgt. Die Plasmide können so über viele Generationen mit konstanter Kopienzahl in ihren Wirtsbakterien erhalten bleiben. In den meisten Fällen wird diese dauerhafte Erhaltung der Plasmide durch Genkassetten ermöglicht, deren Genprodukte aktiv einem Plasmidverlust entgegenarbeiten. Neben Mechanismen zur Kontrolle der Replikation existieren Systeme zur Verteilung von Plasmiden mit den Chromosomen auf die Tochterzellen. Die bekannten Mechanismen der Plasmid-Stabilisierung wurden in drei Klassen eingeteilt (de la Hoz *et al.*, 2000):

1. Funktionen zur Maximierung der Kopienzahl der Plasmide, die anschließend auf die Tochterzellen verteilt werden können (Alonso *et al.*, 1996; Summers, 1998).
2. Tötungssysteme (*postsegregational killing systems*, PSK) bzw. Toxin/Antitoxin-System zur Plasmidstabilisierung. Sowohl Toxin als auch Antitoxin werden vom Plasmid kodiert, wobei das Antitoxin die Wirkung des Toxins maskiert oder dessen Synthese verhindert (Jensen und Gerdes, 1995; Gerdes, 2000). Das Antitoxin wird schneller abgebaut als das Toxin und muss deshalb ständig nachgebildet werden. In Nachkommen, die kein Plasmid mehr enthalten, kann kein Antitoxin nachgebildet werden, und das demaskierte Toxin löst den programmierten Zelltod (Apoptose) aus.
3. Mechanismen zur aktiven Verteilung (Partitionierung) der Plasmide. Mindestens eine Plasmidkopie wird dabei an Orte künftigen Zellwand-Wachstums lokalisiert (Gordon *et al.*, 1997; Niki und Hiraga, 1997; Wheeler und Shapiro, 1997).

Die Funktionen der zweiten und dritten Klasse wurden für einige Plasmide aus gram-positiven Bakterien beschrieben, dazu zählen unter anderen die Plasmide P1, F,

RK2 und R1 (Nordstrom und Austin, 1989; Hiraga, 1992; Williams und Thomas, 1992; Jensen und Gerdes, 1995).

Werden Plasmide vererbt, die mit niedriger Kopienzahl im Wirtsbakterium vorliegen (*low-copy number plasmids*), wird die exakte Aufteilung der Plasmide prinzipiell durch aktive Verteilung (Partitionierung) (3. Klasse) gefördert (Moller-Jensen *et al.*, 2000). Allgemein können die Plasmid-Partitionierungssysteme in zwei Typen unterteilt werden:

1. ATPasen mit Walker-Typ ATP-Bindungsmotiv, die allgemein ParA genannt werden (Ebersbach und Gerdes, 2004).
2. Evolutionär nicht verwandte Actin-ähnliche ATPasen (ParM) (Motallebi-Veshareh *et al.*, 1990; Koonin, 1993; Bignell und Thomas, 2001; van den Ent *et al.*, 2002).

In beiden Fällen bindet ein zweites Partitionierungs-Protein (ParB) an eine „*cis*-wirkende“ DNA-Partitionierungsstelle (oft *parS* genannt) und rekrutiert die ATPase, um einen Nucleoprotein-Partitionskomplex zu formen. Dieser sorgt dann kurz vor der Zellteilung für entgegengesetzte Bewegung der Plasmide in Richtung der beiden Zellpole (Bouet und Funnell, 1999; Barilla und Hayes, 2003; Figge *et al.*, 2003; Moller-Jensen *et al.*, 2003; Surtees und Funnell, 2003).

Nutzt das System zur Plasmid Partitionierung die Walker-Typ ATPase (ParA), wurde kürzlich folgender Mechanismus vorgeschlagen: kurz vor der Abschnürung der Tochterzellen werden die Plasmid Paare zur „mittleren“ Zellposition transloziert, um dann vom Partitionierungs-Apparat mit den Proteinen ParA und ParB bidirektional in die zukünftigen Tochterzellen befördert zu werden. Die Bewegung des Plasmids wird wahrscheinlich durch Polymerisation der ParA-ATPase vorangetrieben (Moller-Jensen *et al.*, 2003; Leonard *et al.*, 2004) (Leonard *et al.*, 2005) (Aslan Cicek, Dissertation in Vorbereitung).

1.6.2 Mechanismen zur dauerhaften Erhaltung von pSM19035

Die Plasmide der *inc18* Familie (pIP501, pAM β 1 und pSM19035) weisen charakteristische Eigenschaften wie eine geringe Kopienzahl in den Wirtszellen sowie ein breites Wirtsspektrum von gram-positiven Bakterien auf und zeigen ausgeprägte

Sequenzhomologie von mehr als 90% in ihren Replikations- (Cop, RNA III, Rep, ori) und Stabilitätsregionen (SegA und SegB) (Brantl, 1994; Ceglowski und Alonso, 1994; Pujol *et al.*, 1998). Sehr ungewöhnlich ist die Eigenschaft des Plasmid pSM19035, dass 80% der gesamten Plasmidsequenz invertiert wiederholt vorliegen. Auch die Sequenzen, die zur Replikation und stabilen Aufrechterhaltung des Plasmids benötigt werden, sind in diesen invertiert wiederholten Genregionen lokalisiert (Ceglowski *et al.*, 1993a; Ceglowski *et al.*, 1993b) und liegen doppelt vor. Dabei nutzt pSM19035 alle drei in Kap. 1.6.1 vorgestellten Mechanismen zu seiner dauerhaften Erhaltung im jeweiligen Wirt.

1.6.2.1 Kontrolle der Plasmid-Kopienzahl

Die Replikation und damit die Plasmid-Kopienzahl wird durch zwei negative Regulatoren gesteuert, wobei jeder die Menge an mRNA reduziert, welche für das Replikations-Initiationsprotein rep kodiert. Zum Einen ist das cop-Protein ein negativer Regulator und hemmt die Transkription der rep mRNA, der andere Regulator ist eine stabile *antisense* RNA (RNA III), welche an das 5'-Ende der rep mRNA bindet und eine Abschwächung der Transkriptionsrate induziert (Brantl *et al.*, 1993; Brantl, 1994; Le Chatelier *et al.*, 1994; Brantl und Wagner, 1997). So können nach unten gerichtete Fluktuatione der Kopienzahl des Plasmids korrigiert werden (Brantl und Wagner, 1997; de la Hoz *et al.*, 2000). Dabei reguliert der ω -Repressor über die Bindung an den *PcopS* Promotor die Transkriptionsrate des *cop* Gens.

1.6.2.2 „Besser-als-Zufall-Verteilung“ von pSM19035

Zwei unabhängige Genregionen, SegA und SegB, sind an der Verteilung (Partitionierung) des Plasmids pSM19035 beteiligt (Ceglowski *et al.*, 1993b). Proteine, die durch die SegA-Region kodiert werden, sind an der Umwandlung von Plasmid-Oligomeren in getrennt vorliegende Monomere beteiligt (Alonso *et al.*, 1996). Die SegB Region in Abb. 5, welche die „Besser-als-Zufall-Verteilung“ des Plasmids pSM19035 (Ceglowski *et al.*, 1993b) gewährleistet, umfasst die Gene δ , ω , ϵ und ζ (Ceglowski *et al.*, 1993a; de la Hoz *et al.*, 2000). Das δ -Protein zeigt Sequenzhomologie zur ParA Familie von Walker-Typ ATPasen, die zu einer aktiven Partitionierung von bakteriellen Plasmiden beitragen und gehört damit zur 3. Klasse der in Kap. 1.6.1. vorgestellten

Mechanismen zur dauerhaften Plasmid-erhaltung (Motallebi-Veshareh *et al.*, 1990; Ceglowski *et al.*, 1993b; Lin und Grossman, 1998). Die Proteine ζ und ε hingegen bilden ein Toxin/Antitoxin System (2. Klasse) und töten Plasmid-freie Tochterzellen (Gerdes, 2000). Dieses Abhängigkeits- bzw. Tötungssystem tritt nach der Zellteilung in Kraft, falls eine Tochterzelle kein Plasmid erhalten hat. ζ wirkt dabei als Toxin, während das Antitoxin ε durch Bindung an das Toxin dessen Wirkung unterbindet. Das Antitoxin ε wird schneller durch Proteasen abgebaut als das Toxin ζ und solange die Zelle das Plasmid trägt, kann das Antitoxin in ausreichender Menge nachgebildet werden, um das Toxin zu maskieren. Die Struktur des $\varepsilon_2\zeta_2$ -Komplexes konnte in unserer Arbeitsgruppe (Meinhart *et al.*, 2003) aufgeklärt werden.

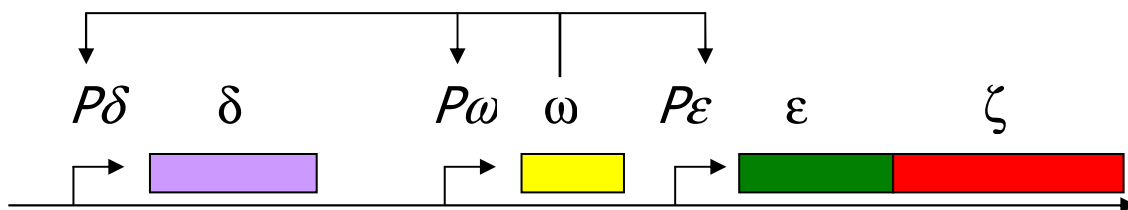


Abbildung 5 Die SegB-Genregion des Plasmids pSM19035. Der ω -Repressor bindet an die Promotoren $P\delta$, $P\omega$ und $P\varepsilon$ und reguliert so die Transkription der zugehörigen Gene.

1.6.3 Von ω regulierte Promotoren des Plasmids pSM19035

Die in Kap. 1.6.2 genannten Funktionen kennzeichnen den ω -Repressor als allgemeinen Regulator, der über die Kontrolle des *PcopS* Promotors aktiv an der Kontrolle der Kopienzahl und über die Kontrolle der Promotoren $P\omega$ und $P\varepsilon$ an der dauerhaften Vererbung der Plasmide der *inc18* Familie beteiligt ist (de la Hoz *et al.*, 2000). Die Gene ω , ε und ζ bilden ein Operon mit den zwei separaten Promotoren $P\omega$ und $P\varepsilon$ (Abb. 5). $P\omega$ stellt den Ausgangspunkt der Transkription der Gene ω und ε dar, außerdem kann eine vollständige Auslese des Operons mit allen drei Genen ω , ε und ζ erfolgen (Ceglowski *et al.*, 1993a; Ceglowski *et al.*, 1993b; Ceglowski *et al.*, 1993c; de la Hoz *et al.*, 2000).

Neben dem ω -Protein wurde eine ähnliches so genanntes ω_2 -Protein isoliert, welches an den Aminosäurepositionen 1-55 dieselbe Sequenz aufweist und an seinem C-terminalen Ende eine acht Reste lange Erweiterung trägt (Abb. 3). Beide Proteine

werden von der *inc18* Plasmidfamilie kodiert, ω ausschließlich durch das nicht-konjugative Plasmid pSM19035 und beide, sowohl ω als auch $\omega 2$, durch die konjugativen Plasmide pIP501 und pAMbeta1 (de la Hoz, nicht veröffentlichte Ergebnisse).

1.6.3.1 Die Operatoren des ω -Repressors

ω bindet mit hoher Kooperativität (Hill Koeffizient 2,5) an mindestens zwei aufeinander folgende Kopien der Erkennungs-Heptade mit der Sequenz 5'-^A/_T ATCAC ^A/_T-3' (de la Hoz *et al.*, 2000; Misselwitz *et al.*, 2001). Die Heptaden sind entweder in einem zusammenhängenden Block mit sieben direkten und zwei invertierten Kopien ($\rightarrow\rightarrow\rightarrow\rightarrow\rightarrow\rightarrow\rightarrow\leftarrow\leftarrow$) wie in der Promotorregion $P\delta$ (Abb. 6) organisiert, oder in n Kopien der Blöcke $(\rightarrow\rightarrow\leftarrow)_n$, mit n = 2 oder 3 und einer zusätzlichen direkten oder invertierten Wiederholung stromabwärts des Blocks, wie in $P\omega$ ($\rightarrow\rightarrow\leftarrow\rightarrow\rightarrow\leftarrow\leftarrow$) und in $PcopS$ ($\rightarrow\rightarrow\leftarrow\rightarrow\rightarrow\leftarrow\rightarrow\rightarrow\leftarrow\rightarrow$). Der Mechanismus der Transkriptionskontrolle der Promotoren $PcopS$, $P\delta$ und $P\omega$ durch den ω -Repressor ist bisher unbekannt, die Bindung der RNA Polymerase an den Promotor wird jedoch nicht durch ω -Bindung unterbunden (de la Hoz *et al.*, 2000).

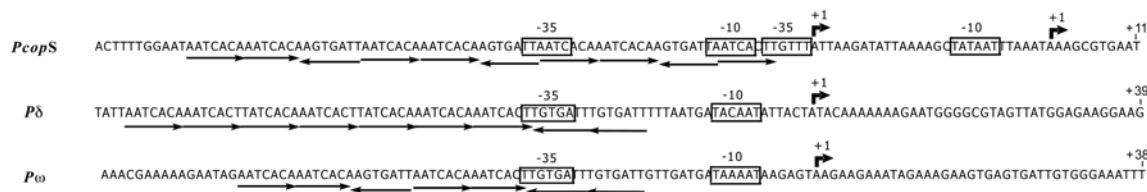


Abbildung 6 Vergleich der Nucleotidsequenzen der Operatoren des ω -Repressors. Die Abbildung ist (de la Hoz *et al.*, 2000) entnommen. Die konservierten -35 und -10 Regionen der P_{copS} , P_{δ} und P_{ω} Promotoren sind mit schwarzen Rahmen gekennzeichnet. Geknickte Pfeile und +1 bezeichnen bekannte Startstellen der Transkription. Die Erkennungs-Heptaden des ω -Repressors und deren Orientierungen zueinander werden durch Pfeile unterhalb der Sequenz angezeigt.

Wie in Kapitel 1.4 erläutert, benötigen alle RHH-Repressoren mindestens zwei Erkennungssequenzen für je ein RHH-Dimer, um mit hoher Affinität an DNA zu binden. So zeigt der ω -Repressor vergleichbare Dissoziations-Konstanten (k_D) von ~ 20 nM für die Bindung an minimale Operatoren mit direkt oder invertiert wiederholten Heptaden ($\rightarrow\rightarrow$) bzw. ($\rightarrow\leftarrow$), aber eine sechsfach erhöhte k_D von 120 nM, wenn die Richtungen

der Heptaden divergieren ($\leftarrow\rightarrow$) (Tab. 13). Liegen drei aufeinander folgende Heptaden wie in ($\rightarrow\rightarrow\leftarrow$) oder ($\rightarrow\rightarrow\rightarrow$) organisiert vor, verbessert sich die Affinität nochmals mit einer k_D von ~ 12 nM. Leider wurde nur die Affinität für die Bindung des ω -Repressors an die natürliche Promotorregion $P\delta$ bestimmt. Es ist anzunehmen, dass die natürlichen Promotoren ihre Affinität zu ω durch die Anzahl und Orientierung der Heptaden steuern (de la Hoz *et al.*, 2004). So könnte die Promotoraktivität und damit auch die Transkriptionsrate der entsprechenden Gene moduliert werden.

Ähnlich organisierte Promotorregionen mit mehreren Kopien von Erkennungssequenzen sind für eukaryotische Transkriptionsfaktoren bekannt. Beispiele sind die Transkriptionsfaktoren TFIIIA (Rhodes und Klug, 1986) STAT (Xu *et al.*, 1996), HSF Protein (Xiao *et al.*, 1991) und die Kernrezeptor-Proteinfamilie, welche ein Zink-Finger-Motiv zur spezifischen DNA-Bindung aufweist (Naar *et al.*, 1991; Umesono *et al.*, 1991; Rastinejad *et al.*, 1995).

Im Gegensatz zu den Heptaden des ω -Repressors werden die Erkennungssequenzen dieser Transkriptionsfaktoren je nach Orientierung zueinander durch eine bestimmte Anzahl von Basenpaaren getrennt (Glass, 1994). Die kooperativen Interaktionen dieser monomeren Transkriptionsfaktoren werden über verschiedene Bereiche des Proteins aufgebaut, die wiederum von der Anordnung der Erkennungssequenzen abhängig sind.

Bisher ist keine dreidimensionale Struktur eines Repressors im Komplex mit einem nicht-palindromischen oder palindromischen Operator bekannt, bei dem die Erkennungssequenzen nicht in Abhängigkeit von der Orientierung durch eine bestimmte Anzahl von Basenpaaren getrennt sind.

1.7 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit wurde 2001 begonnen. Zu diesem Zeitpunkt war in unserer Arbeitsgruppe die Kristallstruktur des ω -Repressors mit 20 N-terminal abgespaltenen Aminosäuren ($\Delta 20\omega_2$) bestimmt worden (Kapitel 1.3). Es wurde gezeigt, dass der ω -Repressor zur Familie der RHH-Proteine gehört und ein Modell für die Bindung des Repressors an DNA erstellt, doch blieben grundlegende Fragen zum

kooperativen Bindungsmechanismus offen. Auch gab es keine Erklärung für die unterschiedliche Affinität des ω -Repressors für die Bindung an Heptaden mit unterschiedlichen Orientierungen. Erste Versuche der Kokristallisation von ω -Repressor im Komplex mit verschiedenen DNA-Fragmenten wurden unternommen, die jedoch keine röntgentauglichen Kristalle hervorbrachten.

In dieser Arbeit sollten deshalb folgende Problemstellungen bearbeitet werden:

1. Wie erfolgt die spezifische Erkennung der nicht-palindromischen Heptaden durch den pseudo-symmetrischen ω -Repressor?
2. Welche Unterschiede werden bei der Bindung an direkt oder invertiert wiederholte Heptaden beobachtet?
3. Wie ist die sechsfach erniedrigte Affinität für die invertiert wiederholte Anordnung ($\leftarrow\rightarrow$) zu erklären?
4. Welche konformationellen Änderungen ergeben sich für die DNA, nachdem der Repressor gebunden hat, und wie stark wird dabei die DNA gebogen?
5. Wie interagieren mehrere benachbarte ω -Dimere und tragen so zur kooperativen Bindung bei?
6. Wie wird die Affinität des ω -Repressors und damit die Promotoraktivität durch die Anzahl und Anordnung der Heptaden moduliert?

Um diese Fragen zu klären, wurde zunächst der WT ω -Repressor und später ein N-terminal gekürztes Konstrukt ($\Delta 19\omega$) mit verschiedenen Operatoren mit je 2 – 3 Heptaden kokristallisiert. Zunächst sollte die Lösung des Phasenproblems mittels der Methode des Molekularen Ersatzes unter Verwendung des freien $\Delta 20\omega_2$ als Suchmodell versucht werden. Sollte diese Strategie nicht zum Erfolg führen, sollten die Kristalle mit Schweratomen derivatisiert werden, um das Phasenproblem über die Methoden multipler isomorpher Ersatz (MIR) bzw. multipler isomorpher Ersatz mit anomaler Streuung (MIRAS) zu lösen.

Die Röntgenstrukturanalysen von ω -DNA Komplexen mit möglichst verschiedenen Operator-Sequenzen und Vergleiche der ermittelten Strukturen sollten Rückschlüsse auf die kooperativen Bindungsmechanismen ermöglichen und zur Klärung der genannten Fragen beitragen.