

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Biochemischer Teil der Analyse des $\delta$ -Proteins

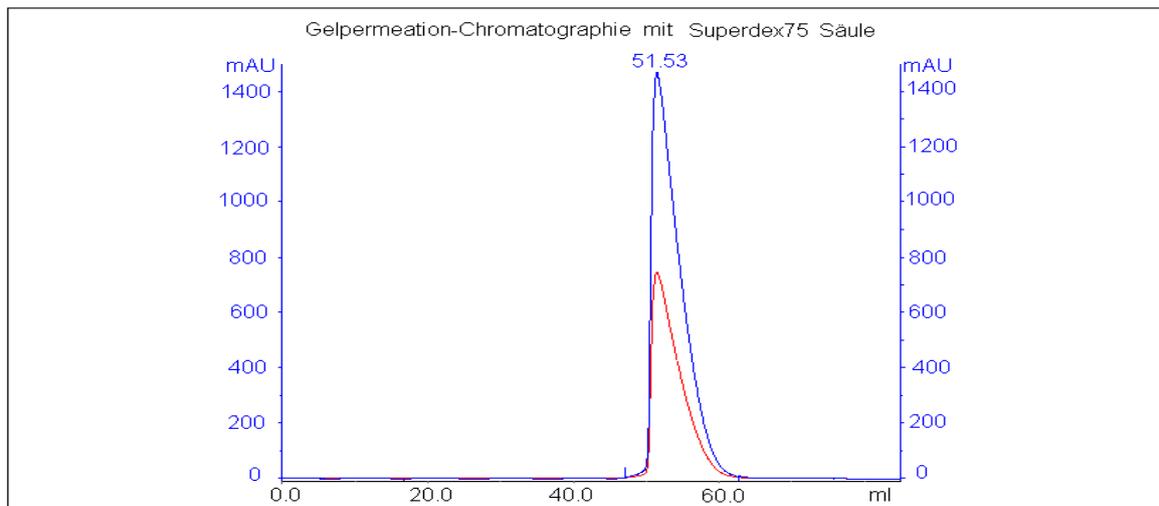
Basierend auf der Primärsequenzanalyse wurden vor der Bestimmung der Kristallstruktur des  $\delta$ -Proteins ( $\delta_2$ ) die erforderlichen biochemischen Analysen am gereinigten Protein durchgeführt. Der Primärsequenzvergleich zeigte, dass das  $\delta_2$ -Protein den hoch konservierten Walker-Typ-ATPasen der in die Plasmidverteilung verwickelten ParA-Familie angehört (Weihofen *et al.*, 2006; Ebersbach, G. und Gerdes, K., 2005; Meinhart *et al.*, 2003; Camacho *et al.*, 2002; de la Hoz *et al.*, 2000; Ceglowski, P. und Alonso, J. C., 1994). Die ATPase-Aktivität von vielen ParA-Proteinen wie ParA des Plasmids R1, SopA des Plasmids F, das chromosomal kodierte Soj von *Bacillus subtilis*, MinD von *Escherichia coli* und ParF von *B. subtilis* war bereits bekannt (Ebersbach, G. und Gerdes, K., 2005).

Das Hauptziel der biochemischen Analysen bestand darin, herauszufinden, ob und inwieweit das Protein als ATPase fungiert. Bei dem ersten Versuch ging es daher um die Frage, ob sich die von der Sequenzanalyse vorhergesagte ATPase-Eigenschaft bestätigen bzw. widerlegen lässt. Darüber hinaus wurde für das Plasmid pSM19035 aus *Streptococcus pyogenes* berichtet, dass es zwar für ein ParA-homologes Protein kodiert, dem Plasmid jedoch das zweite *trans*-wirkende ParB-Protein für komplettes *par*-System fehle (Gerdes *et al.*, 2000). Ob es sich hier um ein komplettes *par*-System handelt, war aufgrund der Vorarbeiten (Gerdes *et al.*, 2000), die jedoch nur auf den Primärsequenzvergleich beruhten, bereits in Frage gestellt. Andererseits ließ sich ein Zusammenhang zwischen dem ParA-homologen  $\delta_2$ -Protein und dem  $\omega$ -Protein ( $\omega_2$ ), dem Transkriptionsregulator des SegB-Operons von pSM19035, als möglicher ParB-Kandidat nicht ausschließen (Weihofen *et al.*, 2006; Dmowski *et al.*, 2006; de la Hoz *et al.*, 2004). Daher wurde bei allen durchgeführten Funktionsanalysen (ATPase-Assay, DLS, Sedimentation, Gelshift-Assay, subzelluläre Lokalisation und EM) auch der mögliche Einfluss von  $\omega_2$  und der zentromer-ähnlichen DNA-Region ( $P_{copS}$ ,  $P_\delta$ - und  $P_\omega$ -Region auch bekannt als *parS*-DNA) berücksichtigt (de la Hoz *et al.*, 2000).

Bevor das  $\delta_2$ -Protein auf seine Funktion hin untersucht wurde, musste die biochemische Charakterisierung des Proteins, die sowohl für die Kristallisation als auch für die *in vitro* Analysen unentbehrlich ist, durchgeführt werden. Dabei wurden die im folgenden Kapitel erwähnten Ergebnisse erzielt.

### 3.1.1 Der Oligomer-Status des $\delta_2$ -Proteins in der Lösung

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich die Ionenaustausch-Chromatographie verwendet (Kap.2.4.4). Als erster Chromatographieschritt wurde eine Kationenaustausch-Chromatographie mit an Trägermaterial gebundenem Heparin durchgeführt (siehe Kap. 2.4.4.1). Im Anschluss daran wurde in einem zweiten Chromatographieschritt ein Anionenaustausch an PL\_SAX-Material durchgeführt, und in einem abschließenden Schritt wurde  $\delta_2$  (34.5 kDa) unter Verwendung von Superdex75 (Superdex-HiLoad™-16/60) als Säulenmaterial einer Gelpermeation-Chromatographie (Größenausschluss-Chromatographie) unterzogen (Abb.15).

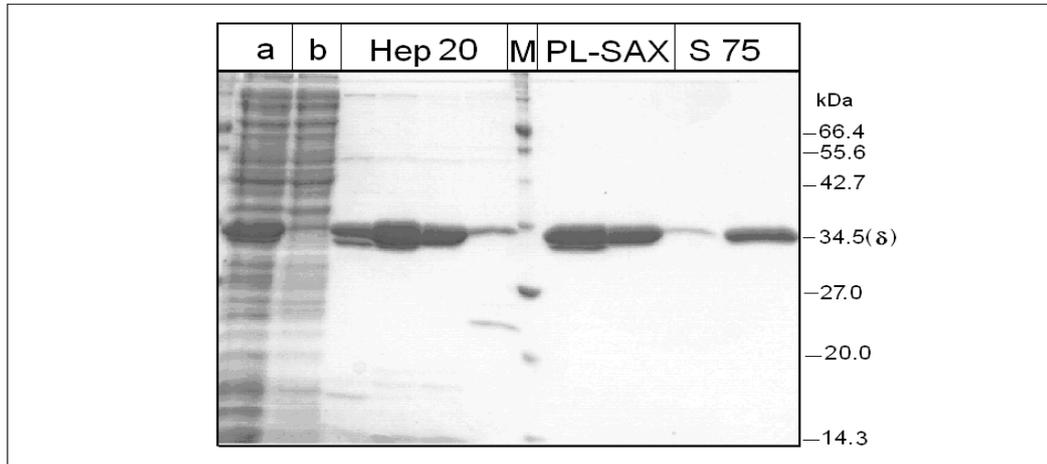


**Abb. 15** Elutionsprofil des  $\delta_2$ -Proteins gereinigt mittels Gelpermeations-Chromatographie (GPC) (Superdex HiLoad™-16/60). Die Elution des  $\delta_2$ -Proteins erfolgte bei 51.53 mL in GPC-Puffer (400 mM NaCl und 20 mM Tris-HCl pH 8.0) ~1500 mAU. Der blaue *Peak* mit dem höchsten Absorptionswert von ~1500 mAU stellt eine Absorption bei UV (280 nm) dar, während der kleinere rote *Peak* mit dem Wert ~800 mAU eine Absorption bei UV (260 nm) abbildet.

Die Elutionsversuche zeigten, dass, wenn der Elutionspuffer aus einer NaCl-Konzentration von 200 mM und 20 mM Tris-HCl pH 8.0 zusammengesetzt wurde, dies meistens zu einer Eluierung des Proteins im Bereich nahe des Ausschlussvolumens führte. Im Gegensatz dazu führte der Puffer mit einer verdoppelten NaCl-Konzentration (400 mM) zu dem Elutionsvolumen von 51.3 mL (Abb.15). Mittels Referenzproteinen wie Albumin (67.0 kDa eluiert bei 54.4 mL) und Ovalbumin (43.0 kDa eluiert bei 60.4 mL) konnte das hier gemessene Elutionsvolumen zu einer Molekularmasse von ~70 kDa ( $2 \times 34,5$  kDa  $\delta_2$ ) angeordnet werden. Der Oligomerstatus des  $\delta_2$ -Proteins in Lösung wurde auch durch Quervernetzung mit Glutaraldehyd überprüft (Kapitel 2.5.5 und 3.1.2) und der dimere Status bestätigt.

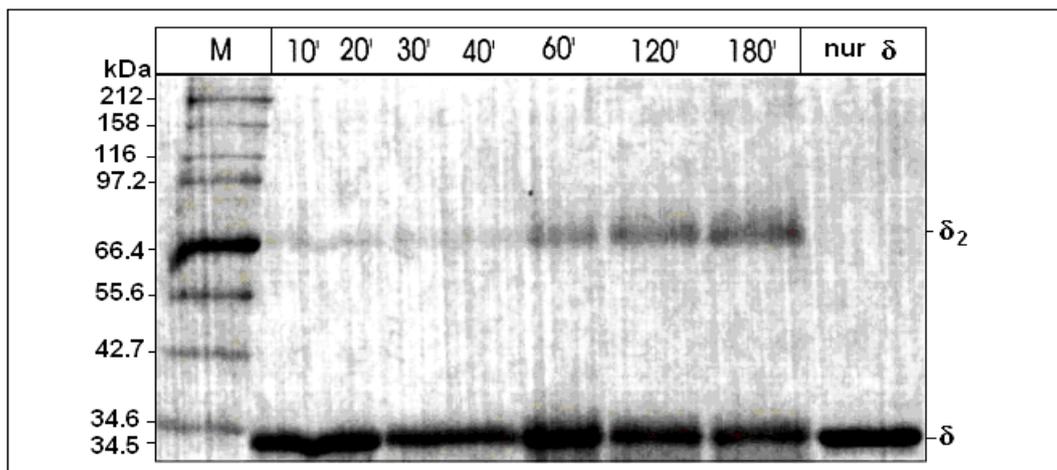
Die gesamten Ergebnisse des Reinigungsvorgangs des  $\delta_2$ -Proteins sind in Abb. 16 dargestellt. Der Reinheitsgrad des Proteins wurde mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

nach Kap. 2.2.2 überprüft und die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt (siehe Kap. 2.4.6). Die Proteinausbeute betrug aus einer typischen 8L Zellauszucht nach allen Reinigungsschritten ~ 40 mg.



**Abb. 16** SDS-PAGE des gesamten Reinigungsvorgangs von  $\delta_2$  durch Ionenaustausch- und Größenausschluss-Chromatographie. Aus der Bakterienkultur wurde eine Probe mit 1mM IPTG induziert (a-Bande). Die Probe vor dem Zellaufschluss (a-Bande) und die Probe nach dem ersten Waschschrift der Säule Poros-Hep-20 (b-Bande). Die Aufreinigung des Proteins nach Zellaufschluss mittels French<sup>®</sup> Press und anschließender Zentrifugation bei 30000 rpm. Die ausgewählten Fraktionen der Poros-Hep-20 (Heparin)-Säule (als Kationenaustauscher) und der PL\_SAX-Säule (als starker Anionenaustauscher) und Superdex75 (S75) stellen die jeweiligen Reinigungsschritte dar. Als Marker (M) wurde der Standard Proteinmarker verwendet.

### 3.1.2 Quervernetzung des $\delta_2$ -Proteins

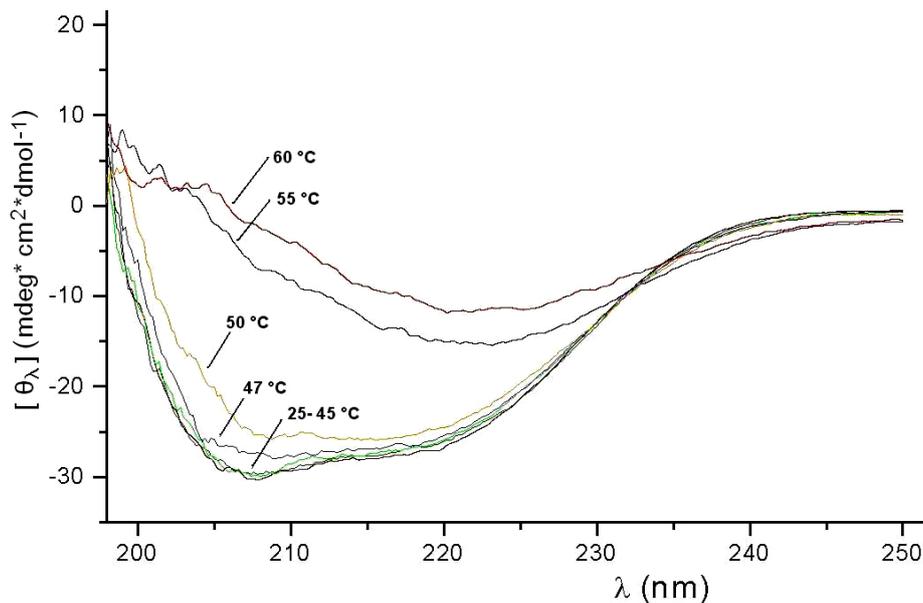


**Abb. 17** SDS-PAGE der Quervernetzung (*Cross-linking*) des  $\delta_2$ -Proteins (1.3 mg/mL) mit 0.1 % Glutaraldehyd bei RT und nach den Bahnen angegebenen Inkubationszeiten (10-180 min). Die Ansätze wurden im GPC-Puffer durchgeführt, die Reaktion mit dem SDS-Laufpuffer gestoppt und anschließend auf 15 %iges denaturierendes SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Als negative Kontrolle wurde auch eine Null-Probe ( $\delta_2$  ohne Crosslinker) verwendet (Spur rechts). Ein Protein-Standard-Marker (M) wurde zum Vergleich aufgetragen.

Die Quervernetzung wurde unter Verwendung von 0.1 %igem Glutardialdehyd durchgeführt und mit Hilfe von SDS-PAGE analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 17 dargestellt. In Abhängigkeit von der Inkubationszeit (10-180 min) konnten im SDS-Gel verstärkt Banden beobachtet werden, die einem  $M_w$  von etwa  $\sim 70$  kDa entsprechen. Dies deutet daraufhin, dass das  $\delta_2$ -Protein in Lösung als Dimer vorliegt, welches durch Glutardialdehyd vernetzt werden kann.

### 3.1.3 Messung der thermischen Stabilität des $\delta_2$ -Proteins

Um den Faltungszustand und die thermische Stabilität des nativen  $\delta_2$ -Proteins zu bestimmen, wurden CD-Spektren (CD, *circular dichroism*) im kurzwelligen Bereich (190-250 nm) aufgenommen (Kapitel 2.5.4). Die Messung der CD-Spektren des  $\delta_2$ -Proteins (15 mg/mL) in Abhängigkeit von der Temperatur (25-60° C) erfolgte mit Hilfe eines Wasserbad-Thermostats, in dem die Proteinprobe auf die erwünschte Temperatur, wie in der Graphik angegeben, erhitzt wurde. Die mittlere molare Ellipzitäten  $[\theta_\lambda]$  angegeben in ( $\text{mdeg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ ) wurden dann graphisch gegen die UV-Bereiche aufgetragen, welche in Abb. 18 dargestellt sind.



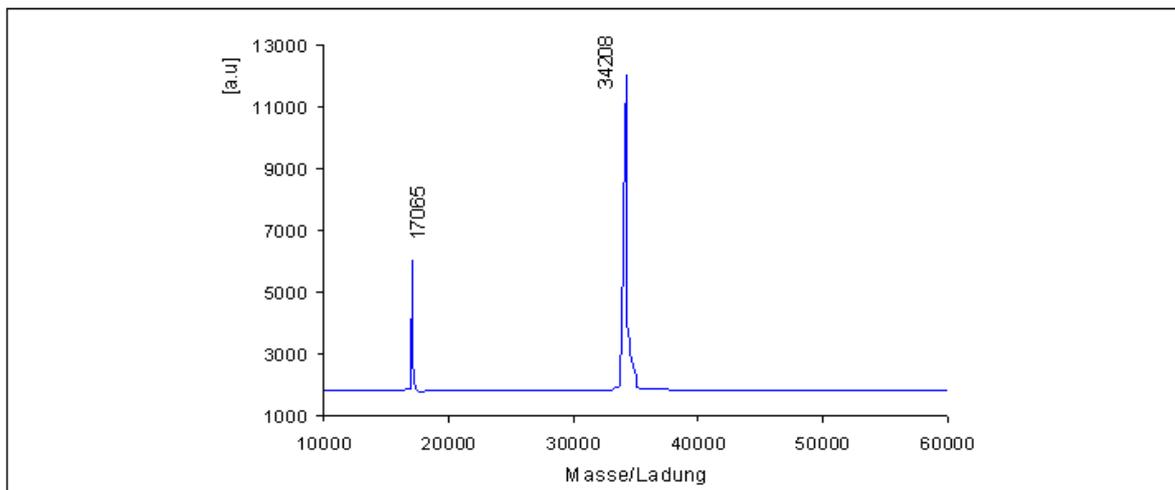
**Abb. 18** CD-Spektren von  $\delta_2$  in Abhängigkeit vom Temperaturanstieg angegeben als mittlere molare Ellipzität  $[\theta_\lambda]$ . Die Messungen wurden mit dem nativen  $\delta_2$ -Protein (32  $\mu\text{M}$ ) im Elutionspuffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0 und 200 mM NaCl) bei 25° C begonnen und im kurzwelligen Bereich des Lichtes ( $\lambda = 250-190$  nm) durchgeführt. Jede Messreihe (Temperaturbereich) wurde in unterschiedlicher Linienfarbe dargestellt.

Die jeweiligen Kurven stellen den Messgang unter der gegebenen Temperatur dar und zeigen, wie sich der Faltungszustand des nativen  $\delta_2$ -Proteins in Abhängigkeit von der Temperatur verhält. Die Messungen zeigen, dass das  $\delta_2$ -Protein bis zu einer Temperatur von 47 °C seine Sekundärstruktur beibehält. Erst ab 50 °C zeichnet sich eine Veränderung der  $\alpha$ -Helikalen- und  $\beta$ -Faltblatt-Struktur aus. Oberhalb von 50 °C wurde eine Entfaltung beobachtet, hervorgerufen durch

die Denaturierung des  $\delta_2$ -Proteins. Diese Studie zeigt, dass  $\delta_2$ -Protein bei RT gefaltet vorliegt, moderat Hitze-stabil ist und sich so für die Kristallisationsexperimente auch bei RT eignet.

### 3.1.4 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die Integrität und Homogenität des nach Kapitel 2.4.4 gereinigten  $\delta_2$ -Proteins wurde durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie (Kap. 2.5.1) untersucht. Das Massenspektrum in Abb. 19 zeigt, dass für  $\delta_2$ -Protein gemessene molekulare Masse von 34208 Da um ca. 220 Da niedriger ist als der theoretisch kalkulierte Wert von 34430.79 Da. Wenn jedoch die Masse des N-terminalen Methionins (149.21 Da) von dem theoretisch kalkulierten Wert subtrahiert (fehlendes Methionin wurde auch durch die N-terminale Sequenzierung des Proteins gezeigt, siehe Kapitel 2.5.2) und ein methodisch bedingter Messfehler, der auf die Wirkung des auf Sinapinsäure basierenden Hintergrundes ( $\pm 120$  Da) zurückzuführen ist, in Betracht gezogen wird, stimmt der gemessene Wert (34208 Da) mit dem kalkulierten Wert (34430 Da) im Bereich des Messfehlers überein. Auch die im Rahmen eines Schweratom-Screenings an den  $\delta_2$ -Kristallen durchgeführten MALDI-TOF-Analysen zeigten ähnliche Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 19** MALDI-TOF-Massenspektrometrie an dem gereinigten  $\delta_2$ -Protein. Die hier detektierte molekulare Masse von 34208 Da entspricht dem theoretisch kalkulierten Wert von 34430 Da, wenn das fehlende N-terminale Methionin und der Einfluss von Sinapinsäure ( $\pm 120$  Da) berücksichtigt werden. Der zweite *Peak* mit der entsprechenden Masse von 17065 Da ist das Resultat der doppelten Ladung der Probe als Kontrolle. (a.u. für *arbitrary unit*).

### 3.1.5 ATPase-Aktivität

Die ATPase-Aktivität des dimeren  $\delta_2$ -Proteins wurde mit Hilfe des  $P_i$ Per-Phosphat-Assays (*Molecular Probes*) analysiert, welcher auf der spektrophotometrischen Detektierung des anorganischen Phosphats basiert. Die Reaktionslösung des Assays enthält ein nicht-fluoreszierendes Reagenz, das *Amplex Red* (10-acetyl-3,7-dihydroxy-phenoxazine), welches sich

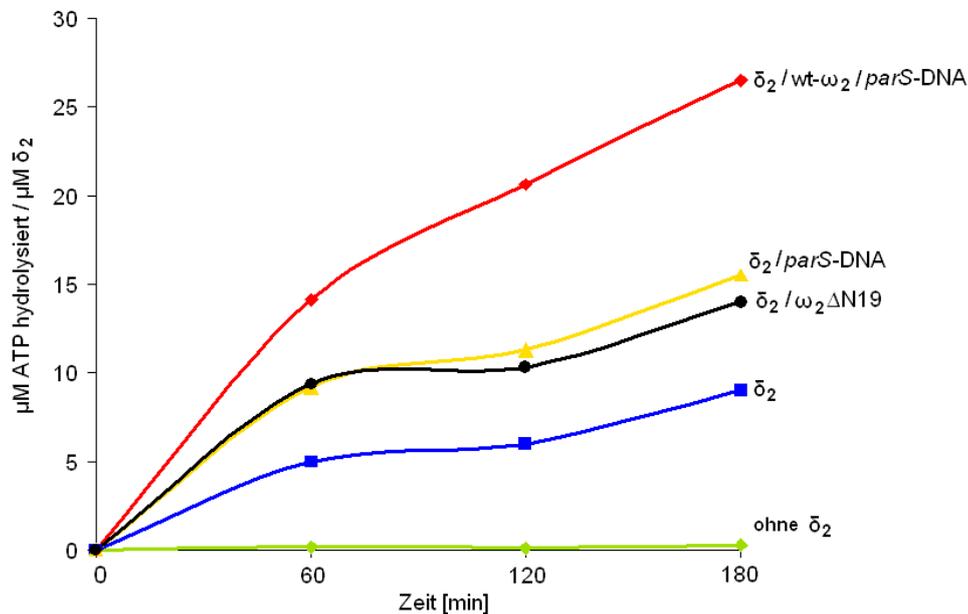
in Gegenwart von freiem anorganischem Phosphat ( $P_i$ ) zum Fluoreszenz emittierenden Molekül, dem Resorufin, umwandelt. Dieses Reaktionsprodukt kann dann mit Hilfe eines Spektrophotometers im Bereich von ca. 565 nm detektiert werden. Die gemessene Absorption oder Fluoreszenz ist dann proportional zu der Menge des  $P_i$  in dem Reaktionsansatz.

Die jeweiligen Reaktionsansätze wurden in Kapitel 2.10.1 beschrieben. Die Konzentrationen der Reaktionskomponente wurden so ausgewählt, dass sie möglichst dem zellulären Level nahe kommen. Die Substratmenge (ATP) jedoch wurde im ca. 500-fachen Überschuss bereitgestellt, um die gesamte enzymatische Aktivität des  $\delta_2$ -Proteins zu erfassen. Auch die Konzentration des Metallions mit 5 mM weicht als solches von dem zellulären Level enorm ab. Die Auswahl des Metallions wurde durch sorgfältige Analyse der Enzymaktivität in Gegenwart von unterschiedlichen zweiwertigen Ionen getroffen. Die Suche nach dem Metallion hat ergeben, dass das  $\delta_2$ -Protein in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  mehr Enzymaktivität zeigt als wenn es mit anderen zweiwertigen Ionen wie  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  inkubiert wird.

Die ersten Reaktionsansätze wurden ausschließlich mit  $\delta_2$  (Enzym), ATP (Substrat) und  $MgCl_2$  durchgeführt, bei dem eine sehr schwache und sogar nicht vom Hintergrund unterschiedene Enzymaktivität festgestellt wurde; auch wenn die Enzymmenge verdoppelt oder vervierfacht wurde, ließ sich die schwache Aktivität kaum erfassen. Daher konnte eine mögliche  $V_{max}$  nicht berechnet werden.

Die Aktivität verdoppelte sich, wenn die Reaktion in Gegenwart von nicht-spezifischer DNA (linearisierte Plasmid-DNA) durchgeführt wurde (Daten nicht gezeigt). Dieser Einfluss wurde auch mit der Zugabe von spezifischer DNA (*parS*-DNA) erzielt (Siehe Abb. 20). Als *parS*-DNA wurde das linearisierte 3.0 kb große Plasmid pUC57 (mit  $P_{copS}$ -Region) verwendet, welches durch unterschiedlich angeordnete  $\omega_2$ -erkennende Heptaden (5'-A/TATCACA/T-3') beinhaltet. Da bereits bekannt war, dass das  $\omega_2$ -Protein an diese Heptaden bindet und so die Transkription von  $\delta$ -,  $\omega$ -, und  $\epsilon/\zeta$ -Genen des SegB-Operons reguliert (Camacho *et al.*, 2002; de la Hoz *et al.*, 2000), lag die Vermutung nahe, dass  $\omega_2$  eventuell die Enzymaktivität von  $\delta_2$  auf irgendeine Weise beeinflussen könnte. Daher wurde bei den Aktivitätsversuchen auch dieser möglicher Einfluss berücksichtigt. Als die Reaktionsansätze auch in Gegenwart von Wildtyp- $\omega_2$  (wt- $\omega_2$ ) durchgeführt wurden (Abb. 20), änderte sich die enzymatische Aktivität von  $\delta_2$  drastisch (auf 20  $\mu\text{mol } P_i$ ), nämlich um das Vierfache der anfänglichen Aktivität (von 5  $\mu\text{mol } P_i$ ). In Gegenwart von  $\omega_2\Delta N19$  ( $\omega_2$ -Mutante) und *parS*-DNA jedoch befand sich die Aktivität von  $\delta_2$  im gleichen Level wie wenn das Enzym nur in Gegenwart von *parS*-DNA, d. h. ohne jeglichen  $\omega_2$ -Einfluss getestet wurde.

Dieser durch  $\omega_2$  verursachte Anstieg der Enzymaktivität von  $\delta_2$  ist allein auf den Einfluss von  $\omega_2$  zurückzuführen.



**Abb. 20** ATPase-Aktivität von  $\delta_2$  ( $\mu\text{M}$  ATP hydrolysiert pro  $\mu\text{M}$   $\delta_2$ ) in Gegenwart von Wildtyp- $\omega_2$  (wt- $\omega_2$ ) und der Deletionsmutante  $\omega_2\Delta N19$  sowie der *parS*-DNA (linearisierte pUC57 mit der  $P_{Cops}$ -Region). Das  $\delta_2$ -Protein zeigt eine niedrige basale ATPase-Aktivität (blaue Linie). Die ATPase-Aktivität von  $\delta_2$  ist in Gegenwart von *parS*-DNA fast zweifach (gelbe Linie) und vierfach in Gegenwart von wt- $\omega_2$  und *parS*-DNA (rote Linie) stimuliert. In Gegenwart von  $\omega_2\Delta N19$  (N-terminale 19 Reste deletiert) und *parS*-DNA ist die enzymatische Aktivität von  $\delta_2$  nicht stimuliert (schwarze Linie), wo die hier gemessene Aktivität jedoch auf den Einfluss der *parS*-DNA zurückzuführen ist.

Wie bereits erwähnt, beruht die Konstruktion von  $\omega_2\Delta N19$  auf den strukturellen Analysen von  $\omega_2$ , die zeigten, dass das Protein ca. 20 nicht strukturierte N-terminale Aminosäuren beinhaltet, welche aufgrund ihrer Beweglichkeit auch die DNA-Bindung des Proteins stören könnten (de la Hoz *et al.*, 2004; Murayama *et al.*, 2001). Das Entfernen dieser Reste hatte dazu beigetragen, dass das Protein nun zusammen mit der DNA (Heptaden) kristallisiert und strukturell determiniert werden konnte (Weihofen *et al.*, 2006). Erst durch die hier erwähnten biochemischen Analysen wurde deutlich, dass der  $\omega$ -Repressor (Weihofen *et al.*, 2006) das ParB-analoge Protein des *par*-Systems von pSM19035 ist und die ca. 20 N-terminalen Reste an der Stimulierung der ATPase-Aktivität des ParA-Proteins - nämlich des  $\delta_2$ -Proteins - beteiligt sind, wie es bei den anderen ParAB/SopAB-Systemen der Fall ist (Leonard *et al.*, 2005; Barilla *et al.*, 2005; Barilla, D. und Hayes, F., 2003; Ravin *et al.*, 2003; Hayashi *et al.*, 2001; Hu und Lutkenhaus, 2001; Radnedge *et al.*, 1998).

Um den Einfluss der Deletionsmutante  $\omega_2\Delta N19$  bzw. ihrer N-terminalen Reste auf  $\delta_2$  genauer anzuschauen, wurden diese Reste als Peptide hergestellt und für die biochemischen

Tests verwendet (ATPase-Assay, DLS und Sedimentation). Die hier nicht ausgeführten Ergebnisse dieser Analyse zeigten, dass diese Peptide, wenn sie anstelle vom wt- $\omega_2$ -Protein eingesetzt werden, keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität von  $\delta_2$  haben. Da andererseits die Deletion der 19 N-terminalen Reste einen deutlichen Einfluss auf die Aktivität von  $\delta_2$  zeigt, ist davon auszugehen, dass für die Stimulation des  $\delta_2$ -Proteins eventuell das gesamte  $\omega_2$ -Protein nötig ist, nicht aber ein Teil davon. Die Ergebnisse des ATPase-Assays deuten daraufhin, dass  $\delta_2$  im *par*-System von pSM19035 als eine schwache ATPase fungiert. Dies steht auch mit der enzymatischen Aktivität der anderen ParA-Familie-Proteine wie Soj (Leonard *et al.*, 2005), MinD (Lutkenhaus J. und Sundaramoorthy M., 2003; Hayashi *et al.*, 2001; Hu und Lutkenhaus, 2001) und ParF (Barilla *et al.*, 2005; Barilla, D. und Hayes, F., 2003; Hayes, F., 2000) im Einklang.

Parallel zu den hier ausgeführten biochemischen Analysen wurden einige Versuche auch vom Kooperationspartner im Centro Nacional de Biotecnología Madrid (Prof. Dr. J. C. Alonso und Florencia Pratto) durchgeführt (siehe Anhang Abb. I A-C).

Auch diese mit dem wt- $\delta_2$  und dem wt- $\omega_2$  sowie mit der Walker A-Mutante  $\delta_2$ K36A und mit dem N-Terminal deletierten  $\omega_2$  ( $\omega_2\Delta N19$ ) durchgeführten *in vitro* Analysen zeigen, dass die ATPase-Aktivität des  $\delta_2$ -Proteins sowohl von wt- $\omega_2$  als auch von *parS*-DNA abhängt. Darüber hinaus konnte man feststellen, dass die Stimulation der enzymatischen Aktivität von  $\delta_2$  von der relativen Konzentration von  $\omega_2$  stark abhängt (siehe Anhang Abb. I-A). Die molaren Verhältnisse zeigten, dass  $\omega_2$  (0.1-1.2  $\mu$ M) in einem geringen molaren Verhältnis von  $\omega_2$ : $\delta_2$  (0.09:1-1.5:1) die durch  $\delta_2$ -katalysierte ATP-Hydrolyse in Gegenwart von *parS*-DNA stimuliert, während dieser Effekt von  $\omega_2$  (2 bis 4  $\mu$ M) in einem höheren molaren Verhältnis von  $\omega_2$ : $\delta_2$  (2:1 bis 5:1) ausbleibt (siehe Anhang Abb. I). Als aber die spezifische *parS*-DNA durch die unspezifische DNA (non-*parS*-DNA) ersetzt wurde und das Verhältnis  $\omega_2$ : $\delta_2$  bei dem höheren Level blieb, wurde die  $\delta_2$ -katalysierte ATP-Hydrolyse durch die höhere Konzentration von  $\omega_2$  (2 bis 4  $\mu$ M) nicht inhibiert. Dies machte deutlich, dass die ATPase-Aktivität von  $\delta_2$  durch die Bindung des  $\omega_2$ -Proteins an die unspezifische DNA stimuliert und die Reaktion auch durch die „höhere Konzentration von  $\omega_2$ “ nicht inhibiert wird. Dies deutet auf eine Verstärkung der ATPase-Aktivität von  $\delta_2$  durch die Bindung des  $\omega_2$ -Proteins an die *parS*-DNA hin. Die Abb. I-C im Anhang zeigt, dass die ATPase-Aktivität von  $\delta_2$  allein durch die Zugabe von  $\omega_2$  nicht stimuliert werden kann. Wenn jedoch *parS*-DNA zu vorinkubierten  $\delta_2$  und  $\omega_2$  zugegeben wurde, stieg die ATPase-Aktivität von  $\delta_2$  um das Vier- bis Sechsfache (Anhang Abb. I B und C).

Der Zusammenhang zwischen DNA-Bindung von  $\omega_2$  und dessen positiven Einfluss auf die ATPase-Aktivität des  $\delta_2$ -Proteins in Gegenwart von *parS*-DNA wird auch durch eine weitere  $\omega_2$ -Variante bestätigt, nämlich durch  $\omega_2$ T29A, welches aufgrund des Austausches von Thr 29 gegen Alanin nicht in der Lage ist, an die Erkennungssequenz zu binden (siehe Anhang Abb. I-B). Dies zeigt, dass für die Stimulation der ATPase-Aktivität sowohl die Bindung von  $\omega_2$  an die DNA-Erkennungssequenz als auch das Vorhandensein von nicht-strukturierten N-terminalen Aminosäuren (AS) notwendig sind.

Für die Überprüfung des Einflusses der N-terminalen 20 Aminosäuren von  $\omega_2$  wurden folgende drei Peptide konstruiert und von der Fa. *Jerini Peptide Technologies* synthetisiert:

**wt-N20**- NH<sub>2</sub>-MIVGNLGAQKAKRNDTPISA-COOH

**K10A**- NH<sub>2</sub>-MIVGNLGAQAAKRNDTPISA-COOH

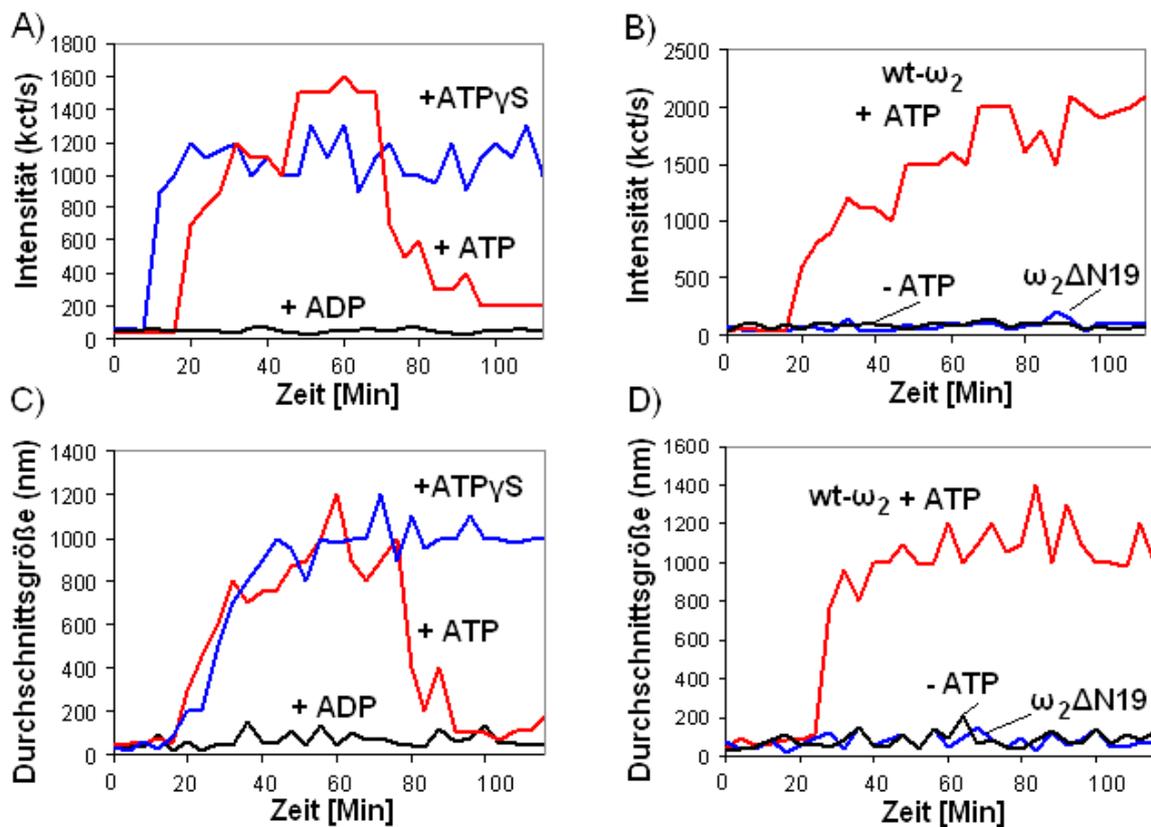
**K12A**- NH<sub>2</sub>-MIVGNLGAQKAARNDTPISA-COOH

Diese anstelle vom  $\omega_2$ -Protein eingesetzten Peptide (wt-N20, K10A und K12A) wurden jeweils in Gegenwart von  $\delta_2$  und *parS*-DNA inkubiert und auf ihre mögliche Stimulation der ATPase-Aktivität überprüft. Trotz mehrerer Versuchskombinationen und Wiederholungen konnte kein möglicher Einfluss der Peptide auf die Aktivität des Proteins beobachtet werden. Dies deutet daraufhin, dass für die Stimulation der Enzymaktivität von  $\delta_2$  im Gegensatz zum *Soj/Spo0J*-System (Leonard *et al.*, 2005) und zum *ParFG*-System (Barilla *et al.*, 2007) das intakte  $\omega_2$ -Protein notwendig ist.

### 3.1.6 Dynamische Lichtstreuung

Die Methode der Dynamischen Lichtstreuung (DLS, *dynamic light scattering*) dient nicht nur zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius der Moleküle in der Proteinlösung, womit dann die Modalität des Proteins ermittelt wird, sondern kann auch beantworten, ob ein gegebenes Protein in Lösung polymerisiert oder nicht. Ist eine zu überprüfende Proteinlösung monodispers, dann bewegt sich die gemessene Intensität (kct/s: kilo count per second) zwischen 50-100 kct/s. Enthält sie aber auf Grund von Verunreinigungen oder auch wegen Denaturierung größere Partikel, dann wird der einfallende Laserstrahl stark gestreut. Der Lösungszustand wird durch eine in jeder Sekunde gemessene Zählrate (dynamisch) aufgenommen und die Streuintensität korreliert mit einer in Lösung befindlichen oder entstehenden Partikelmenge.

Wie im Kapitel 2.5.3 bereits beschrieben, wurden die Reaktionsansätze vorbereitet, 30 min auf Eis vorinkubiert, mit ATP versetzt und sofort gemessen. Um die dynamische Polymerisierung des Proteins aufnehmen zu können, wurden die Messungen minütlich wiederholt, bis ein stabiler Zustand erreicht wurde. Dies variierte jedoch auf Grund des unterschiedlichen Versuchsaufbaus für jeden Reaktionsansatz. Die Datenaufnahme erfolgte über einem Zeitraum von ca. 120 Minuten bis keine weiteren Veränderungen in der Intensität des gemessenen Reaktionsansatzes festgestellt werden konnten. Die gemittelten Intensitätswerte (Abb. 21-A und B) und die durchschnittliche Partikelgröße (Abb. 21-C und D) wurden dann in Abhängigkeit von der Zeit graphisch dargestellt.



**Abb. 21** Polymerisation von  $\delta_2$  in Gegenwart von *parS*-DNA oder nicht-*parS*-DNA, wt- $\omega_2$  oder  $\omega_2\Delta$ N19 und Nukleotid (ADP, ATP oder ATP $\gamma$ S) gemessen als Intensität (kct/s) und als durchschnittliche Partikelgröße (nm). Protein  $\delta_2$  (2  $\mu$ M), wt- $\omega_2$  oder  $\omega_2\Delta$ N19 (1  $\mu$ M) und linearisierte 3.0 kb *parS*-DNA oder nicht-*parS*-DNA (2 nM) wurden gemischt und auf Eis 30 min inkubiert, und die Reaktion wurde gestartet, nachdem dazu 1mM ADP, ATP oder ATP $\gamma$ S gegeben wurde. **A)** Die Polymerisation in Abhängigkeit von ATP (rote Linie), ATP $\gamma$ S (blaue Linie) und ADP (schwarze Linie). **B)** Der Einfluss von wt- $\omega_2$  (rote Linie) im Gegensatz zu  $\omega_2\Delta$ N19 (blaue Linie) in Gegenwart von ATP bzw. ohne ATP (schwarze Linie). **C)** und **D)** Die durchschnittliche „Filament“-Größe (nm) für den jeweiligen Reaktionsansatz (A und B). Die sich in Gegenwart von ATP dynamisch verändernden Partikel (rote Linien) sind über mehrere Stunden stabil, wenn die Reaktion mit ATP $\gamma$ S (C, blaue Linie) statt mit ATP (C und D, rote Linie) gestartet wurde.

Die DLS-Versuche zeigen, dass das Protein  $\delta_2$  in Lösung dynamisch polymerisiert, wenn die Reaktion in Gegenwart von wt- $\omega_2$ , *parS*-/nicht-*parS*-DNA und ATP oder ATP $\gamma$ S, aber nicht in Gegenwart von ADP durchgeführt wird (Abb. 21-A). Wenn die Reaktion jedoch in Gegenwart der

N-terminalen Deletionsmutante  $\omega_2\Delta N19$  anstelle von  $wt-\omega_2$  durchgeführt wird, bleibt eine mögliche Polymerisation von  $\delta_2$  aus (Abb. 21-B).

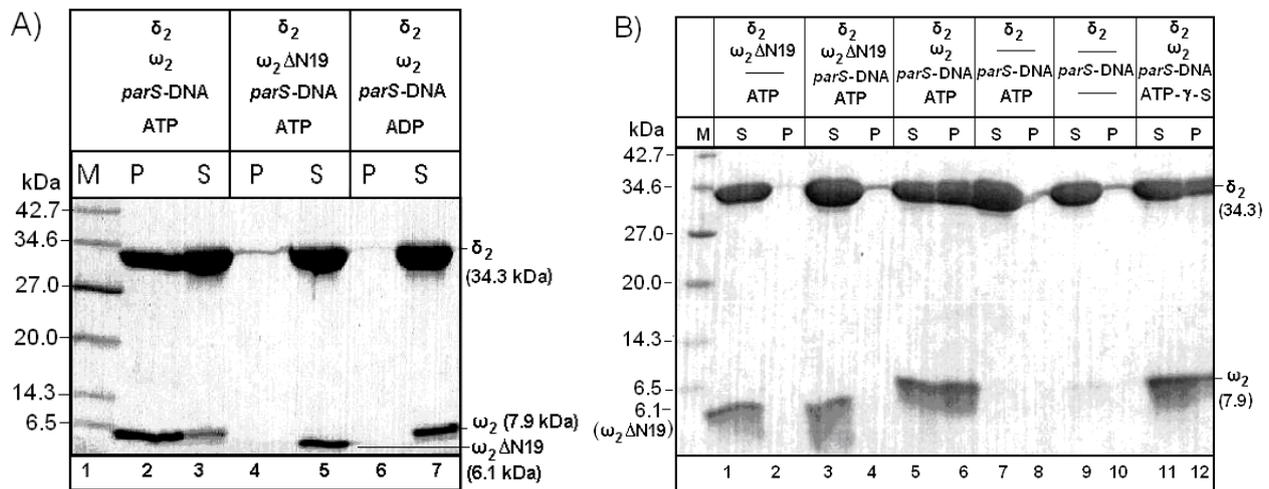
In Gegenwart von ATP oder ATP $\gamma$ S bildet  $\delta_2$ -Protein bei einer durchschnittlichen Intensität von 40-70 kct/s Polymere von ca. 40 nm Durchmesser. Nach etwa ca. 15 min erreichen die Intensität der Lichtstreuung und die Partikelgröße einen Wert von ca. 1300 kct/s bzw. ca. 1000 nm. Nach etwa 75 min Reaktionszeit gehen diese Werte in Gegenwart von ATP zurück, nicht aber in Gegenwart von ATP $\gamma$ S, was bedeutet, dass diese geformten „Filamente“ aufgrund der ATP-Hydrolyse instabil sind bzw. abgebaut werden. Selbst nach einem Tag blieben die geformten „Filamente“ in Gegenwart von ATP $\gamma$ S immer noch stabil, wenn auch mit leichtem Rückgang in der Intensität und in der Partikelgröße, was darauf zurückzuführen ist, dass auch das nicht hydrolysierbare ATP-Analogon zum Teil hydrolysiert wird. Wenn jedoch nach ca. 3 Stunden erneut ATP zu der Reaktion gegeben wurde, ließ sich wieder ein Anstieg in der Intensität und der Partikelgröße beobachten, was auf einen ATP/ADP-Austausch im Komplex  $(\delta\cdot ADP)_2$  zurückgeführt werden kann. Die Polymerisation von  $\delta_2$  findet in Gegenwart von *parS*-DNA oder nicht-*parS*-DNA,  $\omega_2$  und ATP oder ATP $\gamma$ S statt, nicht aber, wenn  $wt-\omega_2$  durch  $\omega_2\Delta N19$  ersetzt wird (Abb. 21-B). Dass  $\delta_2$  aber auch in Gegenwart von ATP $\gamma$ S polymerisiert, bedeutet, dass zwar für die Polymerisierung die ATP-Bindung, aber nicht die ATP-Hydrolyse notwendig ist.

Wie bei dem ATPase-Assay (Kap. 3.1.5) wurde mittels DLS getestet, ob die auf S. 58 befindlichen aus 20 N-terminalen  $\omega_2$ -Resten aufgebauten Peptide Polymerisierung von  $\delta_2$  bewirken. Ein möglicher Einfluss dieser Peptide konnte jedoch nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

### 3.1.7 Sedimentation

Basierend auf den DLS-Daten (Kapitel 3.1.6) wurde die Sedimentation der hoch molekularen  $\delta_2$ -Polymere durch Ultrazentrifugation überprüft (Abb. 22 A und B). Die Sedimentation dieser Nukleoproteinfilamente wurde in Gegenwart von  $wt-\omega_2$  oder  $\omega_2\Delta N19$  und *parS*-DNA in Abhängigkeit von ATP, ADP und ATP $\gamma$ S durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass  $\delta_2$  in Gegenwart von  $wt-\omega_2$ , *parS*-DNA und ATP oder ATP $\gamma$ S aufgrund der Polymerisierung (Kapitel 3.1.6, Abb. 21) sedimentiert, als die Reaktionsansätze bei einer Umdrehung von 100.000 rpm eine Stunde zentrifugiert wurden (Abb. 22 A, Proben 2-3 sowie B, Proben 5-6 und 11-12). Es ließ sich erkennen, dass die Sedimentation der Nukleoproteinfilamente des  $\delta_2$ -Proteins von allen erwähnten Faktoren streng abhängig ist. Auch bei den DLS- und ATPase-Assays ließ sich diese Abhängigkeit des  $\delta_2$ -Proteins eindeutig nachweisen.

Wenn wt- $\omega_2$  entfernt bzw. durch  $\omega_2\Delta N19$  ersetzt wird, lässt sich erkennen, dass  $\delta_2$  in Gegenwart von *parS*-DNA und ATP ausschließlich im Überstand (Abb. 22 A 4-5 und B 3-4 und 7-10) befindet. Dies macht deutlich, dass Polymerisation und Sedimentation des  $\delta_2$ -Proteins von den 20 N-terminalen  $\omega_2$ -Resten streng abhängt. Wenn aber diese  $\omega_2$ -Reste nur als Peptide (siehe Kap. 3.1.5) anstelle des gesamten wt- $\omega_2$ -Proteins eingesetzt werden (Daten nicht gezeigt), lassen sich keine sedimentierbaren Polymere nachweisen, was mit den DLS-Daten übereinstimmt. Dies macht deutlich, dass sowohl für die ATPase-Aktivität als auch für die Polymerisation von  $\delta_2$  das komplette wt- $\omega_2$ -Protein notwendig ist, weil Polymerisation von  $\delta_2$  die Bindung des wt- $\omega_2$ -Proteins an die *parS*-DNA voraussetzt. Lässt man die DNA aus dem Reaktionsgemisch heraus, bleibt  $\delta_2$  im Überstand, was zeigt, dass die Polymerisation von  $\delta_2$  streng von *parS*-DNA oder auch nicht-*parS*-DNA abhängt (Daten nicht gezeigt).



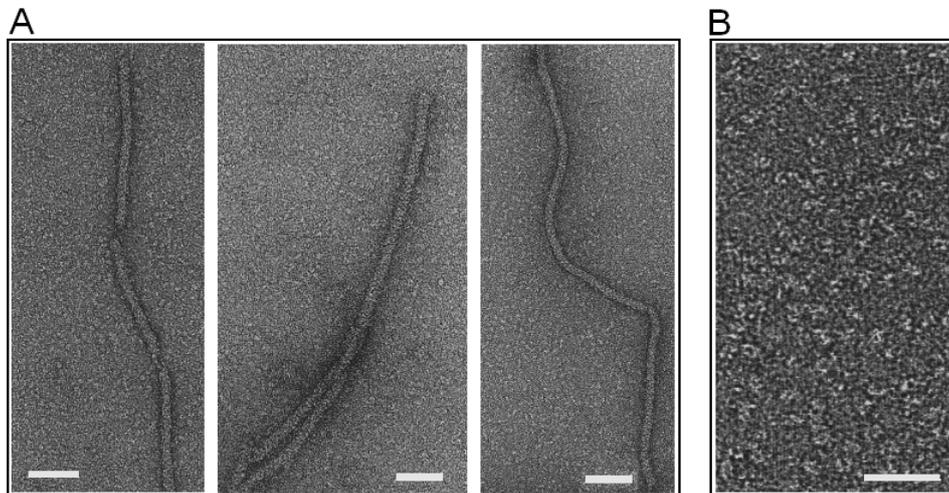
**Abb. 22** Sedimentation von  $\delta_2$  in Gegenwart von  $\omega_2$  oder  $\omega_2\Delta N19$  und *parS*-DNA sowie ihre Abhängigkeit von ATP und ADP. Für jeden Ansatz (2-7) wurden  $\delta_2$  (32  $\mu$ M),  $\omega_2$  oder  $\omega_2\Delta N19$  (8  $\mu$ M), 2 nM linearisiertes 3.0 kb großes pUC57 mit PCopS-Region (*parS*-DNA) und ATP oder ADP (5 mM) sowie  $MgCl_2$  (10 mM) im Reaktionspuffer (0.1 M Tris-HCl pH 7.5 und 0.2 M NaCl) zusammengesetzt. Nach 1 Stunde Inkubation bei RT (Raumtemperatur) wurden die Proben 1 Stunde lang bei 4° C und mit einer Umdrehung von 100.000 r. p. m. zentrifugiert und anschließend wurden Überstand (Supernatant, S) und Pellet (P) getrennt auf ein 15 %iges denaturierendes SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. **A)** Einfluss von wt- $\omega_2$  und ATP auf die Pelletierung von  $\delta_2$  lässt sich deutlich erkennen (2-3), wenn wt- $\omega_2$  durch  $\omega_2\Delta N19$  (4-5) oder wenn ATP durch ADP ersetzt wird (6-7). **B)** Weitere Sedimentationsversuche, bei denen die Bedeutung von wt- $\omega_2$ ,  $\omega_2\Delta N19$  und *parS*-DNA sowie ATP und ATP $\gamma$ S auf die Pellet-Bildung überprüft werden. Der Einfluss von *parS*-DNA (3-4),  $\omega_2\Delta N19$  (3-4), ATP und ATP $\gamma$ S (1-6 und 11-12) auf die Sedimentation von  $\delta_2$  lässt sich deutlich erkennen. Als Marker (M) wurde der Standard Proteinmarker verwendet (*Broad Range* 2-212 kDa, *New England Biolabs*)

Die Sedimentationsversuche zeigen, dass die Polymerisation des  $\delta_2$ -Proteins von allen drei Komponenten (wt- $\omega_2$ , *parS*-DNA und ATP oder ATP $\gamma$ S) streng abhängt, wogegen die anderen ParA-homologen Proteine wie Soj (Leonard *et al.*, 2005) und ParF (Barilla *et al.*, 2005) ein abweichendes Polymerisationsverhalten aufweisen. Die Polymerisation von Soj (ParA) z. B.

ist streng abhängig von DNA und ATP, aber nicht von dem ParB-homologen Protein Spo0J (Leonard *et al.*, 2005). Auch das ParA-homologe ParF des Plasmids TP228 von *Salmonella enterica* zeigt, dass die Polymerisation nur von der ATP-Bindung abhängt (Barilla *et al.*, 2005).

### 3.2 Nukleoproteinfilamente von $\delta_2$

Sowohl die DLS- (Kap. 3.1.6) als auch die Sedimentationsdaten (Kap. 3.1.7) hatten gezeigt, dass  $\delta_2$  abhängig von wt- $\omega_2$ , DNA und ATP polymerisiert und dass für diese Polymerisation zwar die ATP-Bindung, aber nicht die ATP-Hydrolyse notwendig ist. Ob die  $\delta_2$ -Polymere bestimmte räumlich Strukturen annehmen oder ob sie einfach eine Aggregation darstellen, wurde mit Hilfe der Elektronenmikroskopie überprüft.



**Abb. 23** Elektronenmikroskopische Visualisierung der Nukleoproteinfilamente von  $\delta_2$  in Gegenwart von *parS*-DNA (lin. 3.0 kb pUC57), wt- $\omega_2$  oder  $\omega_2\Delta N19$  und ATP oder ATP $\gamma$ S. Die hier verwendeten Konzentrationen der jeweiligen Komponente sind identisch mit denen, die bei den DLS- und Sedimentationsversuchen verwendet wurden. **A)** Nukleoproteinfilamente vom Protein  $\delta_2$  (32  $\mu$ M) in Gegenwart von wt- $\omega_2$  (8  $\mu$ M) und *parS*-DNA (2 nM) und ATP sowie MgCl<sub>2</sub> (10 mM) als Metallion. Alle drei Aufnahmen gehören zu demselben Ansatz. **B)** Alle Komponente wie bei A, nur hier ohne ATP. Die Proben wurden vor der Verdünnung (1:75) und vor der Behandlung mit 1 %igem Kontrastmittel Uranylacetat bei RT eine Stunde vorinkubiert. Die Größe der weißen Balken entspricht 50 nm. Die Bilder wurden mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop (Philips CM12 TEM bei 100kV) aufgenommen.

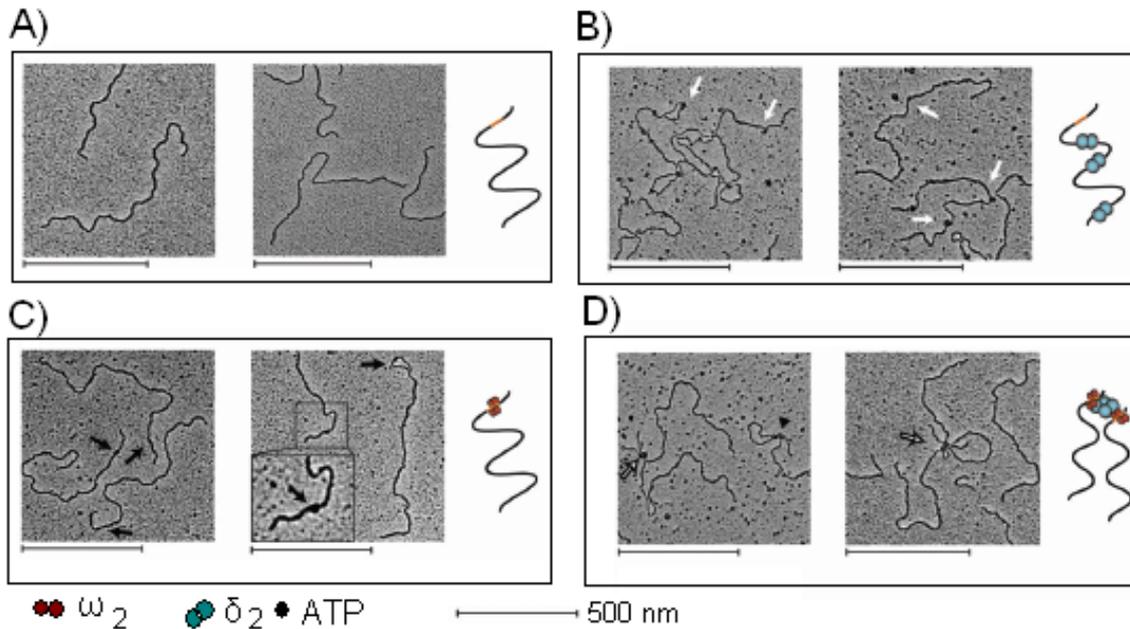
Aus den DLS-Ergebnissen (Kap. 3.1.6) war zu vermuten, dass  $\delta_2$  auf oder um die linearisierte DNA im Komplex mit  $\omega_2$  und abhängig von ATP polymerisiert bzw. eine Filamentlänge von ca. 1000 nm erreichen sollte. Betrachtet man die in Abb. 23-A mit Hilfe der Elektronenmikroskopie visualisierten Filamente, so kann man feststellen, dass diese sowohl der Länge (~900 nm) als auch dem Durchmesser nach (~10 nm) ungefähr mit der erwarteten bzw. bei der DLS gemessenen durchschnittlichen Filament-Länge (~1000 nm) und mit dem Durchmesser der dsDNA (~25 Å) und der räumlichen Ausdehnung der Proteine  $\delta_2$  und  $\omega_2$  (~70 Å)

übereinstimmen. Die Bildung der Nukleoproteinfilamente in Gegenwart von  $\omega_2$  und DNA scheint ein dynamischer Prozess zu sein (Kap.3.1.6), da diese mit der Zeit wieder abgebaut werden und zu Ergebnissen ähnlich in Abb.23 B führten. Variationen der Versuchsbedingungen wie mit oder ohne DNA, mit  $\omega_2$  oder  $\omega_2\Delta N19$  sowie mit oder ohne ADP/ATPyS führten zu ähnlichen Ergebnissen wie in Abb. 23 B bereits dargestellt.

Die Bildung des Protein-DNA-Komplexes zwischen  $\omega_2$  oder seinen Varianten ( $\omega_2\Delta N19$  oder  $\omega_2T29A$ ) und *parS* wurden in Gegenwart oder in Abwesenheit von  $\delta_2$  und der linearisierten *parS*-DNA (3.1 kb großes EcoR1-linearisiertes pCB30, das *parS2* trägt und welches das  $\omega_2$ -Protein in der Nähe (320 bp entfernt) vom DNA-Strang-Ende enthält) von der Kooperationsgruppe in Madrid analysiert. Da die hier erzielten Ergebnisse als weitere Beweise zu der Interaktion der drei Partitionierungs-Komponenten ( $\delta_2$ - $\omega_2$ -*parS*-DNA) dienen, sollen auch diese Resultate Erwähnung finden. Die Abb. 24 stellt die Ergebnisse dieser Versuche dar (F. Pratto, persönliche Mitteilung). Wenn die linearisierte *parS*-DNA mit  $\delta_2$ -Protein in Gegenwart von ATP inkubiert wurde, waren ca. ~85 % der DNA-Moleküle mit diskreten Klumpen belegt, und die Kontur-Längen-Messungen zeigen, dass das Zustandekommen des  $\delta_2$ -DNA-Komplexes nicht von der Sequenz abhängt (Abb. 24 B). Wenn die linearisierte *parS*-DNA mit Protein- $\omega_2$  (60 nM) in Gegenwart oder in Abwesenheit von ATP inkubiert wird, weisen nur ~40 % der DNA-Moleküle das spezifisch an die *parS*-DNA gebundene  $\omega_2$  auf, wie es durch die Messung der Bindungsposition dargestellt wurde (siehe Abb. 24C), während ca. ~1 % der gesamten DNA-Moleküle eine gepaarte Struktur zeigt (siehe Abb. 24D).

Die Kontur-Längen-Messungen des  $\omega_2$ -DNA-Komplexes zeigten, dass die Länge der DNA-Moleküle im Vergleich mit der Protein-freien DNA nicht signifikant modifiziert war. Dies stimmte mit den Beobachtungen überein, dass sich das Protein  $\omega_2$  um die gestreckte B-DNA wickelt (Weihofen *et al.*, 2006).

Da das  $\delta_2$ -Protein allein nicht in der Lage ist, zu polymerisieren und dass auch die ATPase-Aktivität ohne  $\omega_2$  und DNA sehr schwach ist, zeigt, dass für das *par*-System von pSM19035 die Anwesenheit von all diesen Komponenten notwendig ist. Ähnliche Nukleoproteinfilamente wurden auch für Soj von *Thermus thermophilus* in Gegenwart von linearisierter DNA und ATP, aber nicht in Gegenwart von ParB-homologem SpoJ elektronenmikroskopisch festgestellt (Leonard *et al.*, 2005).



**Abb. 24** Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Protein-DNA-Komplexes (F. Pratto, persönliche Mitteilung). Das aus 3.1 kb bestehende, mit *EcoRI* linearisierte und *parS2*-DNA enthaltende Plasmid pCB30 wurde mit  $\omega_2$  und/oder mit  $\delta_2$  inkubiert und für die Elektronenmikroskopie präpariert. **A)** Die lineare *parS2*-DNA (1 nM) in Gegenwart von 1 mM ATP. **B)** In Gegenwart von 1 mM ATP, Protein  $\delta_2$  (100 nM) gebunden an *parS2*-DNA (1 nM) unabhängig von der Sequenz, weiße Pfeile. **C)** Das an asymmetrisch lokalisierte (320 bp weit von einem Ende) *parS2*-DNA (1 nM) gebundene  $\omega_2$ -Protein (60 nM) in Gegenwart von 1 mM ATP, schwarze Pfeile. **D)** Die gepaarten Plasmid-Moleküle (Pfeile) präpariert durch inkubierte *parS2*-DNA (1 nM) mit  $\delta_2$  (100 nM) und  $\omega_2$  (60 nM) und 1 mM ATP. DNA-Protein-Komplexe mit höherer Anordnung, bei der zwei oder mehrere *parS2*-DNA-Stellen und internal gebundene  $\delta_2$ -Moleküle aggregiert sind, wurden ebenfalls beobachtet, wenn auch mit geringer Frequenz. Die Größe der Balken entspricht 500 nm.

Das strukturell noch nicht identifizierte ParA-homologe ParF vom Plasmid TP228 weist auch eine vergleichbare Polymerisation (Protein-Filamente) auf, die sich ausschließlich in Gegenwart von ATP manifestiert (Barilla *et al.*, 2005). Neue Untersuchungen an ParF/ParG-System zeigen, dass die ATPase-Aktivität von ParF durch die N-terminalen 19 Reste des ParG-Proteins, exakt durch das Arginin 19 stimuliert wird (Barilla *et al.*, 2007).  $\delta_2$  und Soj zeigen zwar eine ähnliche ATPase-Aktivität, für die Polymerisation (Nukleoproteinfilamente) jedoch benötigt  $\delta_2$  im Gegensatz zu Soj auch das ParB-analoge  $\omega_2$ -Protein.

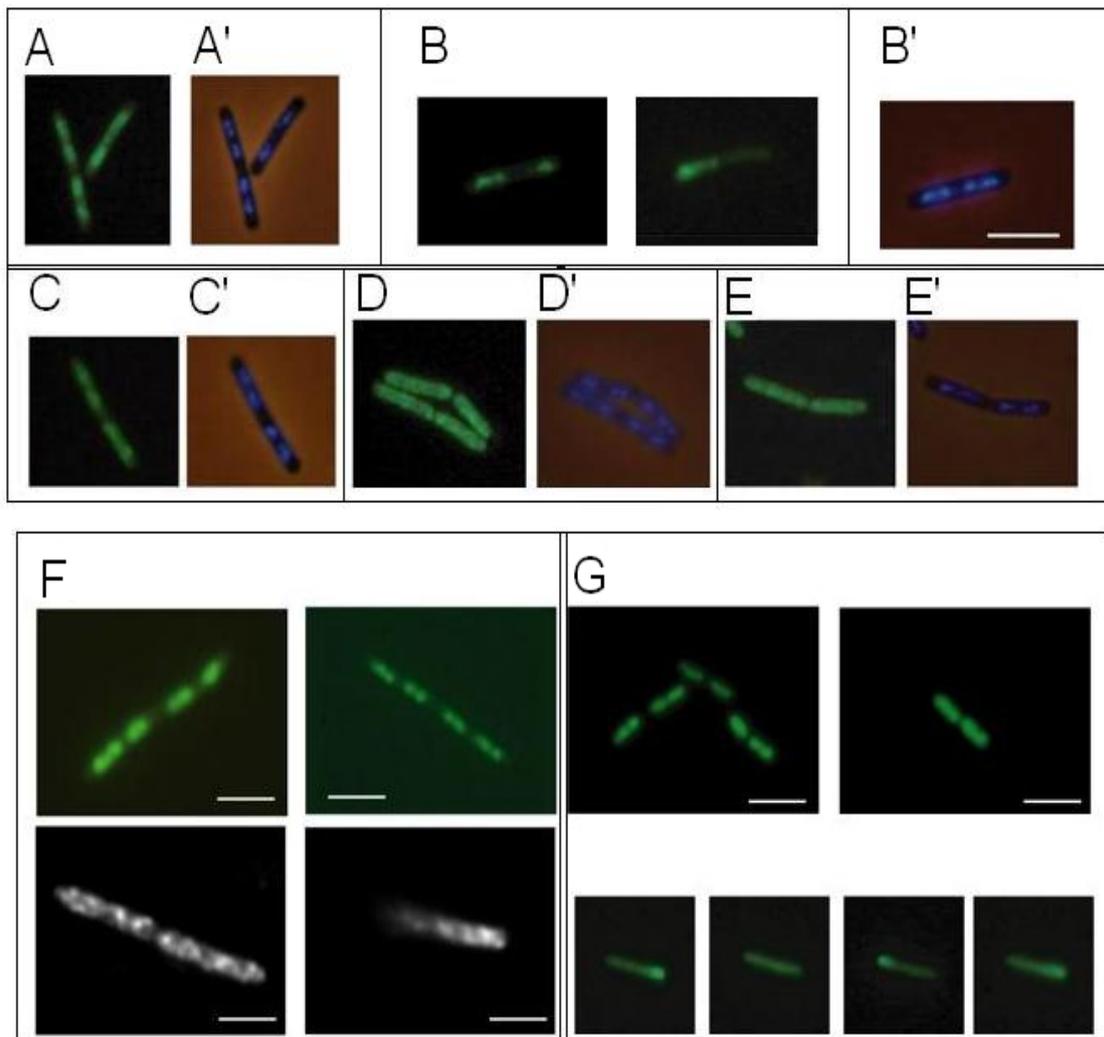
### 3.3 Subzelluläre Lokalisation des $\delta_2$ -Proteins in *B. subtilis*

Die folgenden zellbiologischen subzellulären Lokalisationsversuche wurden im Centro Nacional de Biotecnologia, Madrid von F. Pratto durchgeführt. Für die subzelluläre Lokalisation vom  $\delta_2$ -Protein wurde der pHP13-Vektor (pCB578) konstruiert, welcher die *parS1*-Region und  $\delta$ -*gfp*-Gene trägt. Es wurde festgestellt, dass das Fusionsprotein  $\delta_2$ -GFP in ~90 % der Zellen mit Nukleoiden assoziiert war (Abb. 25 A-F). In Gegenwart vom  $\omega_2$ -Protein ( $\delta$ -*gfp* und  $\omega$  Gene und

*parS1*-Region enthaltene pCB702) verliert das  $\delta_2$ -GFP-Protein seine Assoziation mit dem Nukleoid und erscheint als eine diffuse Wolke, die sich zu den Zellpolen bewegt, wobei sich das Signal des Fusionsproteins  $\delta_2$ -GFP aufgrund der durch das  $\omega_2$ -Protein gehemmten Expression (in fast allen *B. subtilis* Zellen) knapp über dem Rauschen befindet (siehe auch, de la Hoz *et al.*, 2000). Die klaren Abbildungen waren der 2D-Dekonvolution unterworfen und zeigten, dass das  $\delta_2$ -GFP in der Zelle organisierte Strukturen mit einem bestimmten Muster von schräg laufenden und überkreuzenden Banden formt (Abb. 25 F, untere Reihe); dies weist darauf hin, dass  $\delta_2$ -GFP unter „deregulierten“ oder „hoch gestörten“ Bedingungen Polymere bildet, wenn  $\omega_2$  und *parS1* präsent sind.

Um möglichst quantitative Informationen zu erhalten, wurde die Synthese von  $\delta_2$ -GFP unter die transkriptionelle Kontrolle von LacI gestellt und in einem Locus integriert, der als eine einheitliche Kopie im Chromosom vorkommt. Damit wurde die subzelluläre Lokalisation von  $\delta_2$ -GFP unter limitierender Konzentration von IPTG geprüft (Abb. 25). Das  $\delta_2$ -GFP war nun in Form von diskreten globulären Foci zu erkennen, welche in ~90 % der Zellen mit einem Großteil der DNA co-lokalisieren (Abb. 25 A und A'). Wenn jedoch  $\delta$ -*gfp*-Gen durch das  $\delta K36A$ -*gfp* ersetzt wurde, zeigte sich, dass das Protein  $\delta_2 K36A$ -GFP, welches nicht in der Lage ist, ATP zu hydrolysieren, überall in der Zelle verteilt war (Abb. 25 D und D'). Dies lässt sich durch mindestens zwei Gründe erklären, nämlich, dass  $\delta_2 K36A$ -GFP mit einer geringeren Affinität als wt- $\delta_2$  an die DNA bindet, und dass  $\delta_2 K36A$ -GFP eine schwache ATPase-Aktivität aufweist (siehe Kapitel 3.1.5 und Kap.7 Abb. I).

Das asymmetrische Muster der  $\delta_2$ -GFP-Lokalisation in Abwesenheit oder in Gegenwart von einer *parS*-Region und dem  $\omega$ -Gen wurde auch bei *E. coli*-Zellen beobachtet (Abb. 25 G). Die Lokalisation des Proteins  $\delta_2$ -GFP in Zeitaufgelösten-Experimenten (Zeitauflösung von 0 bis 24 min, siehe Abb. 25 G) weist auf ein dynamisches Verhalten hin, das in nur ~40 % der Zellen und in Gegenwart von beiden Komponenten (*parS* und  $\omega$ -Gen) stattfindet. Hier schien die Expression von  $\delta_2$ -GFP bestimmend zu sein, weil das  $\omega_2$ -Protein nicht in der Lage war, aus seiner DNA-Erkennungsregion in *E. coli* die Transkription zu blockieren. Dies deutet darauf hin, dass die Nutzung der  $P_\delta$ -Region und die *parS1*-Aktivität parallel co-existieren kann. Das Fusionsprotein  $\delta_2$ -GFP scheint ähnlich wie bei dem Soj-Spo0J-*parS*-System (Marston und Errington, 1999; Quisel *et al.*, 1999) vom Nukleoid zu den Polen hin und her in einer Zeitskala von Minuten zu pendeln (Abb. 25 G), während beim MinCDE-System dieses Pendeln innerhalb von Sekunden stattfindet (Raskin und de Boer, 1999).



**Abb. 25** Subzelluläre Lokalisation des Fusionsproteins  $\delta_2$ -GFP (*Green Fluorescence Protein*) in Gegenwart von Plasmid-kodierter *parS*-DNA und  $\omega$  Genen (F. Pratto, persönliche Mitteilung). Abbildungen von *Bacillus subtilis*-Zellen zeigen die Fluoreszenz von  $\delta_2$ -GFP (A-G, grüne Zellen) und DNA gefärbt mit DAPI (A'-E', blaue Zellen). **A)**  $\delta_2$ -GFP, **B)**  $\delta_2$ -GFP und  $\omega_2$  und *parS*-DNA, **C)** wie in Abb. B, aber anstelle vom wt- $\omega_2$  wurde  $\omega_2\Delta N19$  eingesetzt, **D)** wie in Abb. A, aber das  $\delta_2$ -GFP wurde durch  $\delta_2K36A$ -GFP ersetzt, **E)** wie in Abb. B, aber das  $\delta_2$ -GFP wurde durch  $\delta_2K36A$ -GFP ersetzt. **F)**  $\delta_2$ -GFP-Fusion in Gegenwart von Plasmid-kodierte *parS*-DNA und  $\delta$ -*gfp* (obere Reihe) oder Plasmid-kodierte *parS*-DNA,  $\delta$ -*gfp*- und  $\omega$ -Genen (untere Reihe). Die in unterschiedlichen Ebenen aufgenommenen Abbildungen waren der 2D-Dekonvolution (Entfaltung) unterworfen. **G)** Zeitaufgelöste-Mikroskopie zeigt die Bewegung (Messung alle 6 Minuten bis zur 24. Minute) des  $\delta_2$ -GFP-Fusionsproteins in Gegenwart von *parS*,  $\delta$ -*gfp* und  $\omega$  Genen und die Fluoreszenz-Mikroskopie von *E. coli* Zellen. Alle Proben wurden aus exponentiell wachsenden Zellen genommen. Aufnahmen wurden mit einem Olympus BX61 Fluoreszenz-Mikroskop und einer Olympus DP70 Farb-CCD-Kamera gemacht. Die Größe der weißen Balken entspricht 2  $\mu$ m (A-G).

In Gegenwart von einer *parS1*-Region und  $\omega$ -Gens zeigte das Fusionsprotein  $\delta_2$ -GFP ein ungewöhnliches irreguläres Muster und befand sich in der Nähe des Zellpols. Das Protein oszillierte auch vom Nukleoid zu den Polen, mit einem höheren Anteil von Protein, was sich an dem einen oder anderen Ende der Zellen (in ~60 % der Zellen) konzentrierte (Abb. 25 B und B').

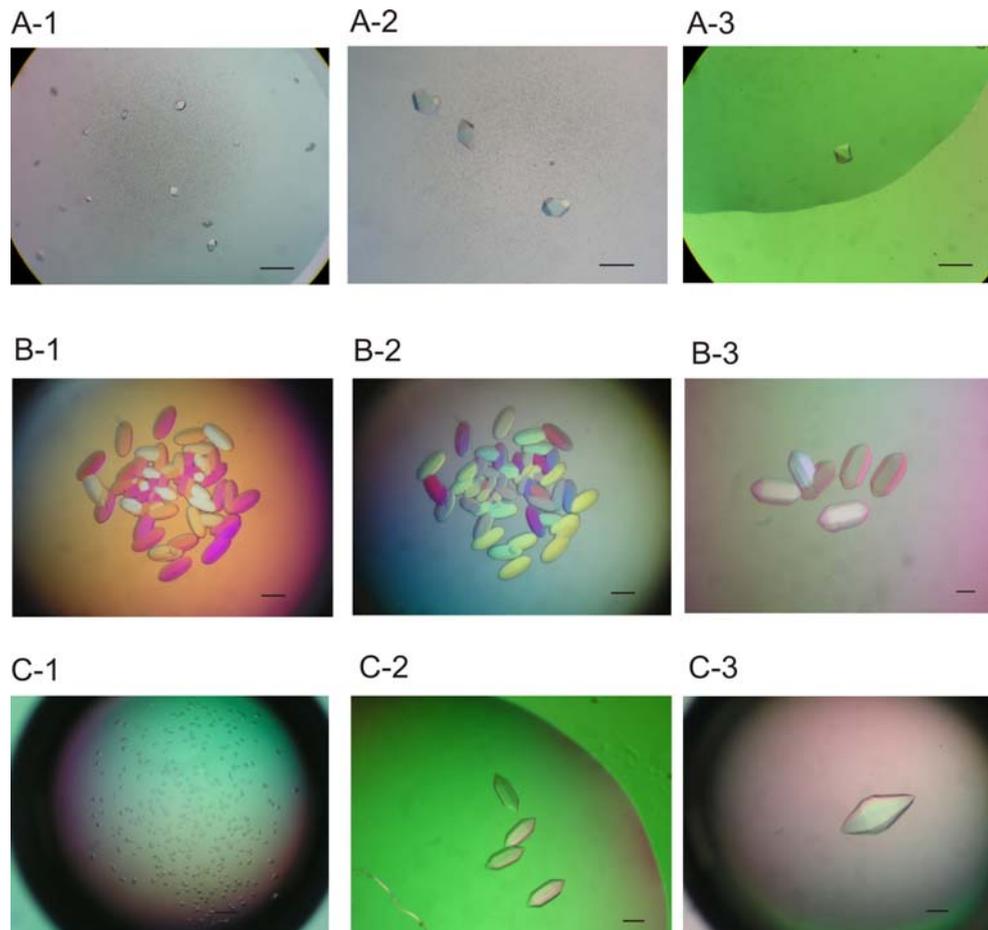
Die Oszillation von  $\delta_2$ -GFP ist auch durch die Bindung von  $\omega_2$  zur *parS1*-Region gegeben, denn die Re-Lokalisation von  $\delta_2$ -GFP war aufgehoben, wenn anstelle von *wt*- $\omega_2$  die mutierten Gene  $\omega_2\Delta N19$  oder  $\omega_2T29A$  verwendet wurden (Abb. 25 C und C'); da die Proteine  $\omega_2\Delta N19$  und  $\omega_2T29A$  ähnlich gefaltet sind wie *wt*- $\omega_2$  (Dostal *et al.*, 2006; Weihofen *et al.*, 2006; Welfle *et al.*, 2005). Die Komplex-Bildung von  $\omega_2$ •*parS* und der unstrukturierte N-Terminus vom  $\omega_2$ -Protein sind für die dynamische Bewegung von  $\delta_2$ -GFP unentbehrlich.

Mit der Repression der Expression von  $\delta_2$  und  $\omega_2$  gerät die Dynamik des *par*-Systems von pSM19035 aus dem Gleichgewicht (de la Hoz *et al.*, 2000). Abhängig von der Konzentration hat  $\omega_2$  mehrere Aufgaben: Bei einem geringeren molaren Verhältnis  $\omega_2$ : $\delta_2$  löst das  $\omega_2$ -Protein die  $\delta_2$ -unterstützte Plasmid-Paarung aus, stimuliert die Bildung der Nukleoproteinfilamente durch das  $\delta_2$ -Protein und unterstützt die ATP-Hydrolyse von  $\delta_2$ . Bei einem höheren molaren Verhältnis  $\omega_2$ : $\delta_2$  und in Gegenwart von ATP und *parS*-DNA inhibiert das  $\omega_2$ -Protein jedoch die Polymerisation, die Filamentbildung und die ATPase-Aktivität von  $\delta_2$  und übt damit einen negativen Effekt auf die Plasmid-Paarung aus. Dies deutet darauf hin, dass die Stöchiometrie des  $\omega_2$ : $\delta_2$ -Komplexes die dynamische Beständigkeit der Nukleoproteinfilamente bestimmt, was damit übereinstimmt, dass MinE die ATPase-Aktivität von MinD stimuliert und zum Abbau von MinD-Polymeren führt (Hu *et al.*, 2002; Suefuji *et al.*, 2002). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für das ParAB-System des Plasmids P1 beobachtet, bei dem die Verstärkung des ParB-*parS*-Komplexes bei höherem ParB:ParA-Verhältnis festgestellt wurde und das ParA-Protein die Dissoziation des ParB-Proteins von der *parS*-DNA bei geringerem ParB:ParA-Verhältnis unterstützt (Bouet und Funnell, 1999).

## 3.4 Kristallographischer Teil der Analyse von $\delta_2$

### 3.4.1 Kristallisation

Die Kristallisation des  $\delta_2$ -Proteins erfolgte, wie in Kapitel 2.6 ausführlich beschrieben, nach der isothermen Dampfdiffusionsmethode (Ducruix und Giegé, 1999). Die Suche nach der optimalen Kristallisationsbedingung wurde mit Hilfe des *Crystal Screens*, der dem *sparse-matrix* Protokoll von Jancarik und Kim (1991) entsprechend aus 48 verschiedenen Reservoirösungen besteht, bei 18 °C durchgeführt. Die *Crystal Screens* I und II (*Hampton Research*) wurden unter Änderungen der Konzentration des Proteins mehrmals wiederholt, bis eine optimale Bedingung gefunden wurde.



**Abb. 26** Kristallisation und Co-Kristallisation von  $\delta_2$  mit ATP $\gamma$ S mittels *Hanging-Drop*-Methode. Die Größe der schwarzen Balken entspricht 100  $\mu$ m. **A-1-3)**  $\delta_2$ -Proteinkristalle in 0.2 M K, Na-Tartrat und 0.05 M Trimethylamin-Hydrochlorid (Additive-Screen I). 1  $\mu$ L der Protein-Probe (14 mg/mL) wurde mit 1  $\mu$ L der Reservoirlösung (0.2 M K, Na-Tartrat und 0.1 M Trimethylamin-Hydrochlorid) gemischt. **B-1-3)** Co-Kristallisation von  $\delta_2$  mit ATP $\gamma$ S mit 5% MPD und 0.1 M Na-HEPES pH 7.5. Vor der Kristallisation wurden zur Proteinlösung (14 mg/mL) 1mM ATP $\gamma$ S und 5 mM MgCl<sub>2</sub> supplementiert. Anschließend wurde für die Co-Kristallisation die Protein-Nukleotid-Mischung (14 mg/mL) mit der Reservoirlösung (5 % MPD und 0.1 M Na-HEPES pH 7.5) in einem Volumenverhältnis von 1:1 gemischt. In B-3 wird eine bei dieser Bedingung gebildete hexagonale Kristallform dargestellt **C-1-3)** Co-Kristallisation von  $\delta_2$  mit ATP $\gamma$ S in 0.9 M Na-HEPES pH 7.5 und 4 % Ethanol. Zu 15 mg/mL Proteinlösung wurden 1mM ATP $\gamma$ S und 5 mM MgCl<sub>2</sub> gemischt und zur Kristallisation mittels *Hanging-Drop*-Methode wurde 1  $\mu$ L der Protein-ATP $\gamma$ S-Mischung (14 mg/mL) mit 1  $\mu$ L der Reservoirlösung (0.9 M Na-HEPES pH 7.5 und 4 % Ethanol) zusammengesetzt. Die 50 bis 400  $\mu$ m großen Kristalle konnten erst nach 5-8 Tagen mittels Binokular-Lichtmikroskop beobachtet und dokumentiert werden.

Bei einer der Bedingungen (0.2 M K, Na-Tartrat) des *Crystal-Screens* (*Hampton Research*) wurden zusammengewachsene Kristalle beobachtet. Diese ersten Kristalle wurden durch Tests wie Widerstandfähigkeit gegenüber mechanischer Berührung und Polarisierung des Lichtes von den in anderen Bedingungen auftauchenden Salzkristallen unterschieden.

Für die Verbesserung der Kristallisationsbedingung wurden die *Additive Screens* 1-4 (*Hampton Research*) getestet. Der mögliche Einfluss dieser Zusatzlösungen wurde mittels der

*Hanging-Drop*-Methode überprüft, indem 1  $\mu\text{L}$  der  $\delta_2$ -Proteinlösung (14 mg/mL) mit 1  $\mu\text{L}$  der Reservoirlösung (0.2 M K, Na-Tartrat und 0.1 M TMA-HCl (Trimethylamin-Hydrochlorid) und 0.5  $\mu\text{L}$  vom Reservoir zusammengemischt wurden. Dies führte zur Präzipitat-Bildung in der Lösung. Aus dieser Präzipitat-haltigen Lösung wuchsen binnen 5-8 Tage Kristalle (Abb. 26 A1-A3). Diese Kristalle mit hexagonalem Habitus wurden in Quarzkapillaren montiert und am hauseigenen Röntgengenerator mit einem *Imageplate*-Detektor (mar345, *MAR research*, Norderstedt) bei Raumtemperatur gemessen. Die ausgewählten Kristalle diffraktierten max. bis 7 Å, und es konnte trotz mehrmaliger Versuche keine Verbesserung der Diffraktion erzielt werden.

### 3.4.2 Co-Kristallisation von $\delta_2$ im Komplex mit ATP $\gamma$ S

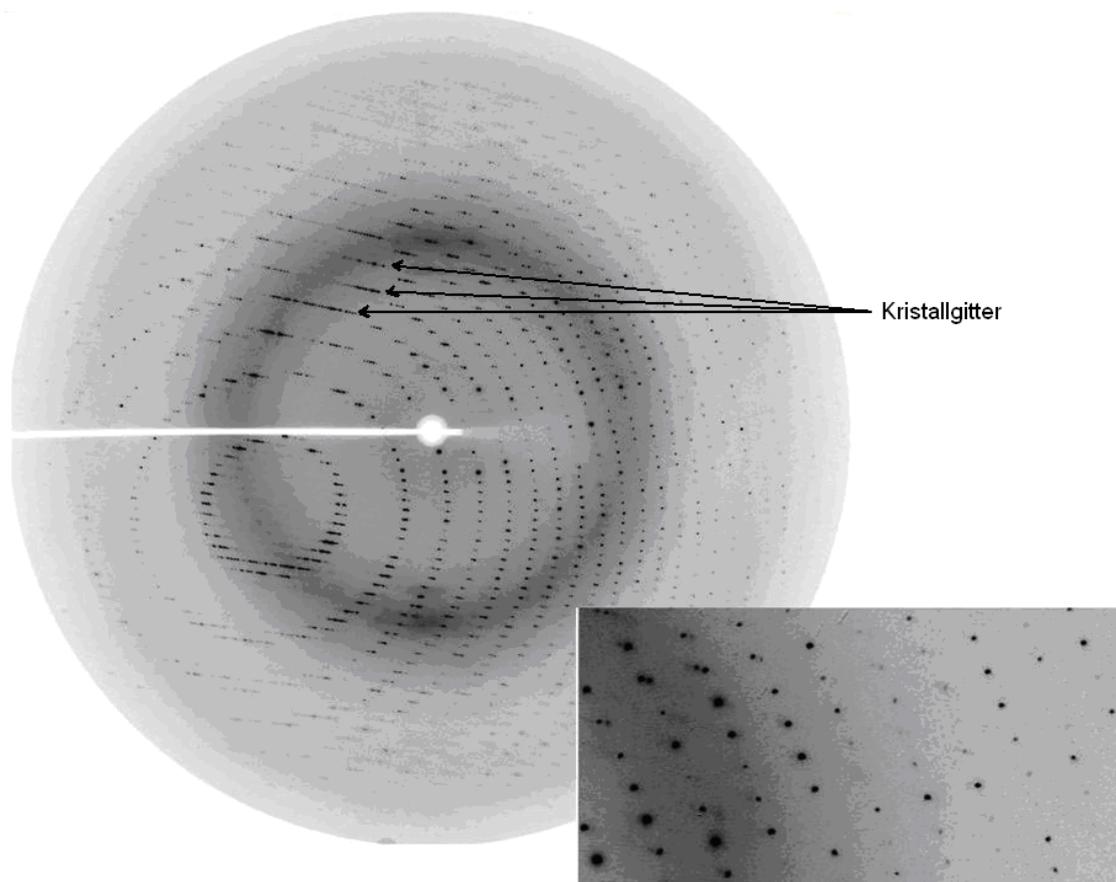
Basierend auf den funktionellen Eigenschaften des  $\delta_2$ -Proteins als ATPase wurden parallel zu den Kristallisationsversuchen ohne Substrat (ATP) auch Ansätze mit ATP, ADP und ATP $\gamma$ S angefertigt. Wie in Kapitel 2 beschrieben, wurde der Proteinlösung vor der Kristallisation ein Nukleotid (ATP, ADP oder ATP $\gamma$ S) bis zu einer Endkonzentration von 1-2 mM und 5 mM  $\text{MgCl}_2$  supplementiert. Lediglich das  $\delta_2$ -Protein konnte mit ATP $\gamma$ S co-kristallisiert werden (Kap.3.4.1 Abb. 26 B). Die zugehörige Kristallisationsbedingung enthielt 10 % MPD und 0.1 M Na-HEPES pH7.5. Diese Bedingung wurde optimiert, indem sowohl die MPD-Konzentration als auch der pH-Wert variiert wurden. Die MPD-Konzentration von 5 % und 0.1 mM Na-Hepes pH7.5 lieferten bessere Kristalle. Trotz des ausgeprägten Habitus dieser Kristallform konnte keine Verbesserung der Diffraktion erreicht werden (Abb. 26 B-1, B-2, B-3). Diese Kristalle streuten bis zur max. Auflösung von 10 Å.

#### 3.4.2.1 Die hexagonale Kristallform

Die Beobachtungen der *Screens* I-II (*Hampton Research*) und der *Salt-RX-Screens* haben die Vermutung nahe gelegt, dass das  $\delta_2$ -Protein unter höherer Pufferlösung als Fällungsmittel Phasen bildet. Da solche Phasentrennungen in der Regel als Vorstufen der Kristallbildung bekannt sind, wurden einige Ansätze mit höheren Konzentrationen von Pufferlösungen und Salzen getestet, in der Hoffnung, bessere Kristallformen und damit eine bessere Diffraktion zu erreichen. Die Phasentrennung, die durch die Mischung von  $\delta_2$ -Protein (14 mg/mL), ATP $\gamma$ S (1-2 mM) und  $\text{MgCl}_2$  (5 mM) mit der Reservoir-Lösung (0.9 M Na-Hepes pH 7.5) zustande kam, konnte erst nach der Behandlung mit 2-4 %igen Ethanol als Additive zu einer neuen Kristallform verbessert werden (Abb. 26 C-1, C-2, C-3). Diese Kristalle lieferten bessere Daten bzw. streuten bereits am hauseigenen Röntgengenerator in Quarzkapillaren bis zu einer Auflösung von 2.5 Å.

### 3.5 Datensammlung

Ein vollständiger Datensatz eines ~500  $\mu\text{m}$  großen Co-Kristalls ( $\delta_2$ -Protein im Komplex mit ATP $\gamma$ S) wurde am Strahlrohr BL1.4 des Synchrotrons BESSY nach der Oszillationsmethode, wie in Kapitel 2.9.1 beschrieben, gesammelt. Die Indizierung und Integration der Reflexe der einzelnen Diffraktionsmuster (Abb. 27) erfolgten mit DENZO (Otwinowski und Minor, 1997). Mit Hilfe von SCALEPACK (Otwinowski und Minor, 1997) wurden die Daten skaliert und zu einem Datensatz zusammengefasst. Die Zellparameter  $a = b = 82.96 \text{ \AA}$ ,  $c = 233.9 \text{ \AA}$  konnten mittels DENZO automatisch bestimmt werden. Auf diese Weise indizierte Datensätze zeigten ein relativ gutes Signal-über-Rauschen Verhältnis ( $I/\sigma = 11$ ). Die Reflexe konnten bis zu einer Auflösung von  $1.83 \text{ \AA}$  beobachtet werden (siehe Tabelle 8).



**Abb. 27** Diffraktionsbild von hexagonalen Kristallen der Raumgruppe  $P6_522$ . Reflexe am Detektorrand entsprechen einer Auflösung von  $1.83 \text{ \AA}$ . Deutlich sichtbar ist die lange kristallographische  $c$ -Achse (Kristallgitter) mit eng benachbarten Reflexen. In dem seitlich dargestellten Zoom aus der Reflexreihe lässt sich erkennen, dass die Reflexe kaum überlappen und gut ausgewertet werden können. Drei Reflexreihen in Richtung der langen  $c$ -Achse für das Kristallgitter sind mit schwarzen Pfeilen markiert. Das Diffraktionsbild wurde am Strahlrohr BL1.4 des Synchrotrons BESSY (Berlin) aufgenommen.

**Tabelle 8** Statistik der kristallographischen Daten.

Kristall	$\delta$ -ATP $\gamma$ S/Mg <sup>2+</sup>
Strahlrohr	BL1.4 (BESSY)
Wellenlänge [Å]	0.972
Raumgruppe	P6 <sub>5</sub> 2 2
Zellkonstanten a, b, c [Å]	a = 82.96, b = 82.96, c = 233.99
Auflösungsbereich [Å]	50.00-1.83
Gemessene Reflexe	400 760
Unabhängige Reflexe	42966
Vollständigkeit (%)	99.9 (86.3)
Redundanz	9.2 (8.1)
I/ $\sigma$ (I) <sup>a</sup>	11.8 (3.9)
R <sub>merge</sub> (%) <sup>b</sup>	6.5

<sup>a</sup> Werte im Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale.

<sup>b</sup> R<sub>merge</sub>:  $(\sum |I_{hkl} - \langle I \rangle|) / (\sum I_{hkl})$  wobei I<sub>hkl</sub> die beobachtete Intensität und  $\langle I \rangle$  die durchschnittliche Intensität von Mehrfachmessungen symmetrieverwandter Reflexe ist.

### 3.6 Strukturbestimmung

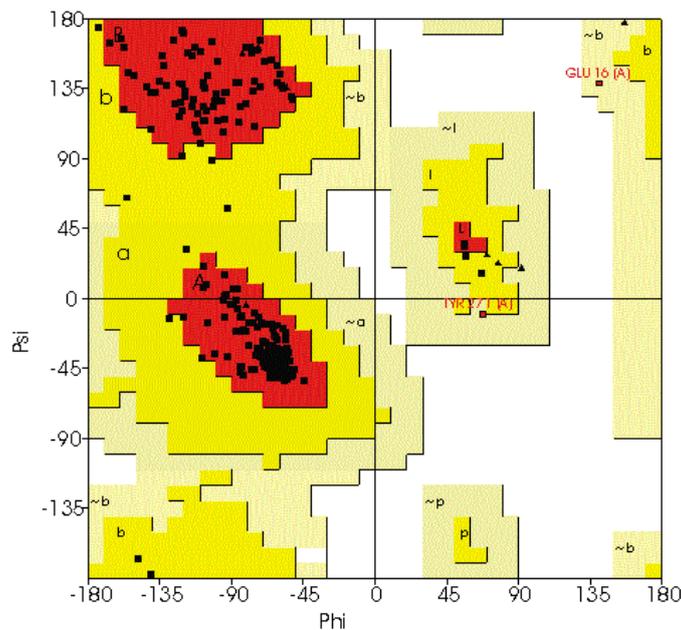
Mit Hilfe des Programms PHASER (Storoni *et al.*, 2004) konnten die Atomkoordinaten der Soj-Kristallstruktur innerhalb der asymmetrischen Einheit für die Bestimmung der Koordinaten der  $\delta_2$ -Kristallstruktur verwendet werden (Kapitel 2.9.3.1). Basierend auf den Ergebnissen des Primärsequenz-Vergleichs wurden die Strukturparameter des Soj-Monomers aus *T. thermophilus* (PDB-Eintrag 2bej) als Suchmodell bei der Berechnung der Phaseninformationen eingesetzt. Das Programm PHASER konnte ein  $\delta$ -Molekül in der asymmetrischen Einheit lokalisieren. Als Kriterium für die Feststellung der korrekten Lösung wurde der LLG-Wert (*Log Likelihood Gain*, Logarithmus des Wahrscheinlichkeitsanstieges) herangezogen (Storoni *et al.*, 2004). Der Wert stellt ein Maß für den Anstieg der Differenz zwischen der Wahrscheinlichkeit des Modells zu der aus einer Wilson-Verteilung berechneten Wahrscheinlichkeit dar. Es misst, wie gut die Daten mit Daten vom Modell vorhergesagt werden. Die erhaltene Lösung wurde mit dem Programm REFMAC5 einem *restrained Refinement* unterzogen. Die berechneten 2 F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub> und F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub> Elektronendichtekarten konnten für die Positionierung der 298 Reste herangezogen werden. 284 Resten der  $\delta$ -Kette, konnte anschließend manuell mit dem Programm O (Jones *et al.*, 1991) in die Elektronendichte angepasst und das erweiterte Modell weiter verfeinert werden. Durch mehrere Operationen konnten anschließend 95 % des Grundgerüsts des Moleküls erstellt und unter Betrachtung des R-Wertes (R<sub>free</sub> und R<sub>work</sub>) auch einige Korrekturen an den Positionen der Aminosäurereste manuell durchgeführt werden (Tabelle 9).

**Tabelle 9** Verfeinerungsstatistiken.

Kristall	$\delta \cdot \text{ATP}\gamma\text{S}/\text{Mg}^{2+}$
Anzahl der Reste	284
Anzahl der Wassermoleküle	256
$R_{\text{work}}$ (%)	19.2 (25.0)
$R_{\text{free}}^a$ (%)	21.8 (29.5)
Reflexe $R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	40 877 (2 886) / 2 054 (156)
Auflösungsbereich (Å)	28.5-1.83 (1.87-183)
Mittlerer B-Wert / gebunden (Å <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	26.44 / 2.081
Bindungslänge (Å) <sup>b</sup>	0.013
Bindungswinkel (°) <sup>b</sup>	1.34
Ramachandran <sup>c</sup>	94.3 % / 0.4 %
PDB Eintrag <sup>d</sup>	2OEZ

<sup>a</sup>Durchschnittlicher Temperaturfaktor für alle Atome und r.m.s.d-Werte (Root mean square deviation, mittlere quadratische Abweichung) des Temperaturfaktors zwischen den Atomen.

<sup>b</sup>R.m.s.d-Werte von idealen Bindungslängen und Winkeln (Engh, 1991). <sup>c</sup>Prozentsatz der Reste in der bestfavorisierten Region des Ramachandran-Diagramms und der Prozentsatz der Ausreißer (PROCHECK; Laskowski et al., 1993). <sup>d</sup>Identifikationsnummer für den Eintrag in die Protein-Datenbank.

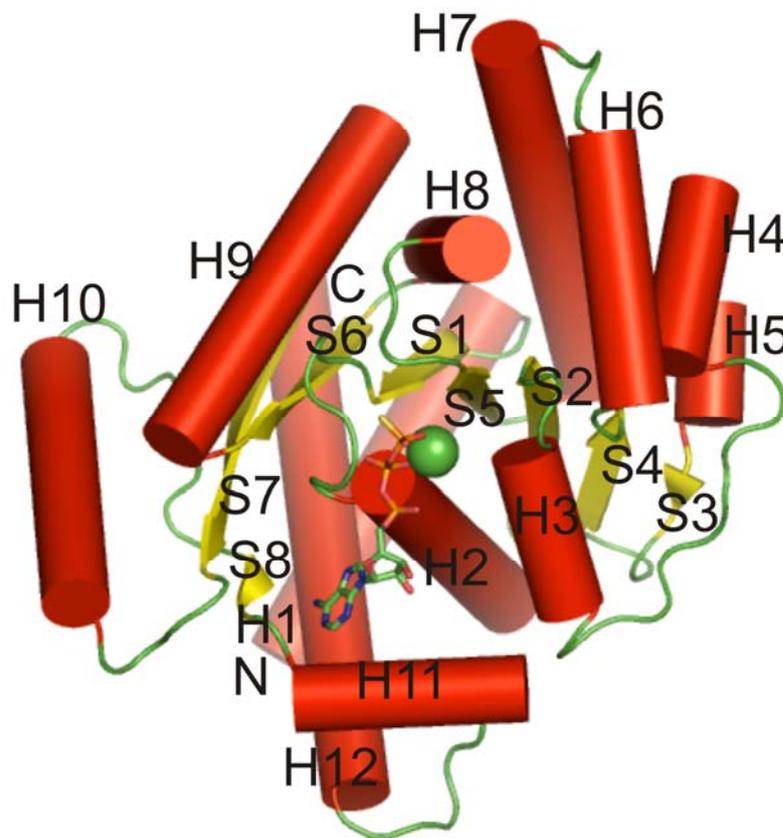


**Abb. 28** Ramachandran-Diagramm aller AS-Reste. Phi und Psi Werte sind in Grad angegeben. Die roten Bereiche (A, B, L) gelten als die meist favorisierten Regionen des Ramachandran-Diagramms (249 Reste = 94,7 %), während die gelbe Fläche (a, b, l, p) die zusätzlich erlaubten Regionen (12 Reste = 4,6 %) sowie der leicht gelbe Bereich (~a, ~b, ~l, ~p) die generell erlaubten (2 Reste = 0,8%; Tyr271 und Glu16) und die weiße Fläche die unerlaubten Regionen der Phi-Psi-Wert darstellt.

Die mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) durchgeführte Datenanalyse (Ramachandran-Plot) zeigt, dass sich die Phi und Psi Werte der einzelnen Aminosäurereste (284 Reste) des  $\delta$ -Strukturmodells, mit Ausnahme von Glu16 und Tyr271, überwiegend (94.7 %) innerhalb des meistfavorisierten Bereichs befinden (Abb. 28).

### 3.7 Kristallstruktur des Komplexes $\delta \cdot \text{ATP}\gamma\text{S}/\text{Mg}^{2+}$

#### 3.7.1 Hauptkettenverlauf und Tertiärstruktur von $\delta$

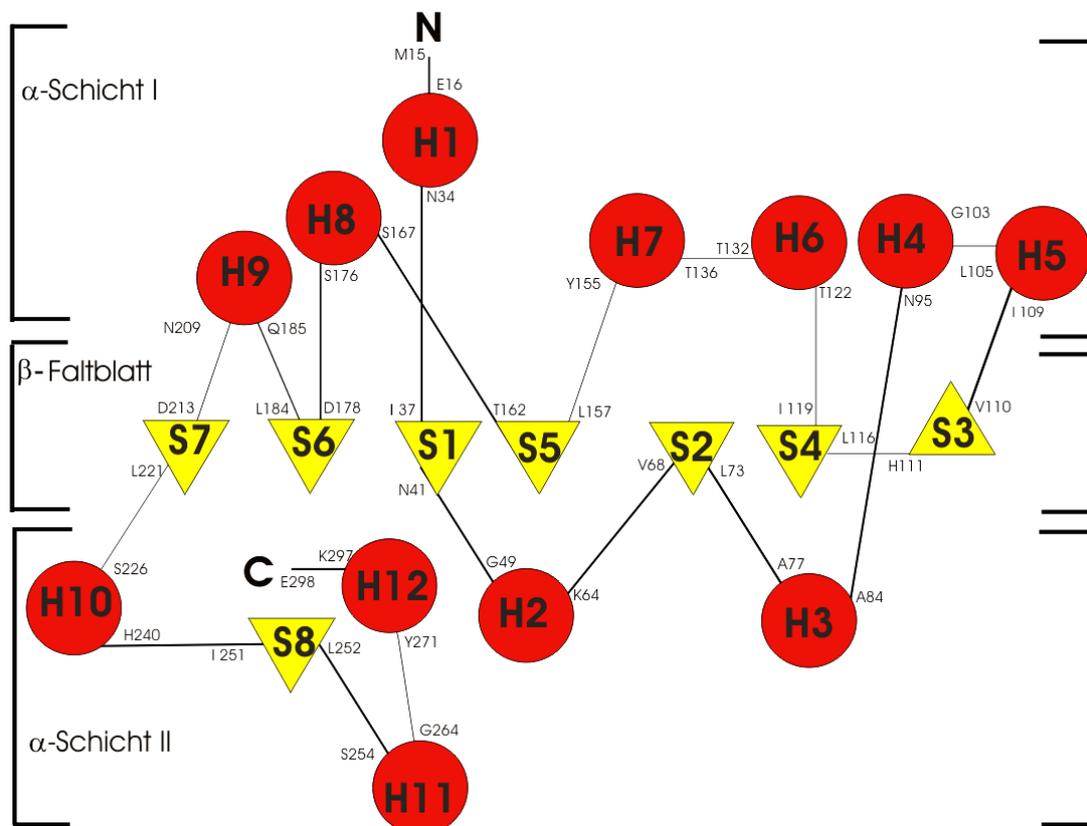


**Abb. 29** Zylindermodell der Kristallstruktur des  $\delta$ -Proteins im Komplex mit  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  (grüne Kugel). Die Buchstaben N und C bezeichnen die N- und C-terminalen Enden, während die  $\alpha$ -Helices (rote Zylinder) und  $\beta$ -Stränge (gelbe Pfeile) mit den Buchstaben H und S markiert und vom N- zum C-Terminus durchnummeriert sind. Um die Nummerierung der Strukturelemente besser sichtbar zu machen, wurde das  $\delta$ -Protein in der dargestellten Perspektive abgebildet.

Die Sekundärstrukturelemente eines  $\delta$ -Monomers umfassen ein 8-strängiges  $\beta$ -Faltblatt, das auf beiden Seiten von jeweils 6  $\alpha$ -Helices umgeben ist und so eine  $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$  Sandwich Struktur bildet. Abgesehen von dem antiparallelen  $\beta$ -Strang 3 (S3) sind die übrigen 7  $\beta$ -Stränge S1 bis S8 parallel orientiert. Werden diese von N- zu C-terminaler Richtung nummeriert, so lautet die Abfolge

der  $\beta$ -Stränge innerhalb des  $\beta$ -Faltblattes (von links nach rechts): 8 / 7 / 6 / 1 / 5 / 2 / 4 / 3. Der  $\beta$ -Strang 8 liegt außerhalb des Kernstückes nahe dem C-terminalen Ende (Abb. 29). Zwischen den  $\alpha$ -Helices 1, 2 und 3 sind die  $\beta$ -Stränge S1 und S2 eingefügt. Die anschließenden Helices 4 und 5 werden von den  $\beta$ -Strängen 3 und 4 gefolgt, an die Helices 6 und 7 anschließen. Nach dem  $\beta$ -Strang S5 folgen H8-S6-H9-S7-H10-S8 (Abb. 29-30).

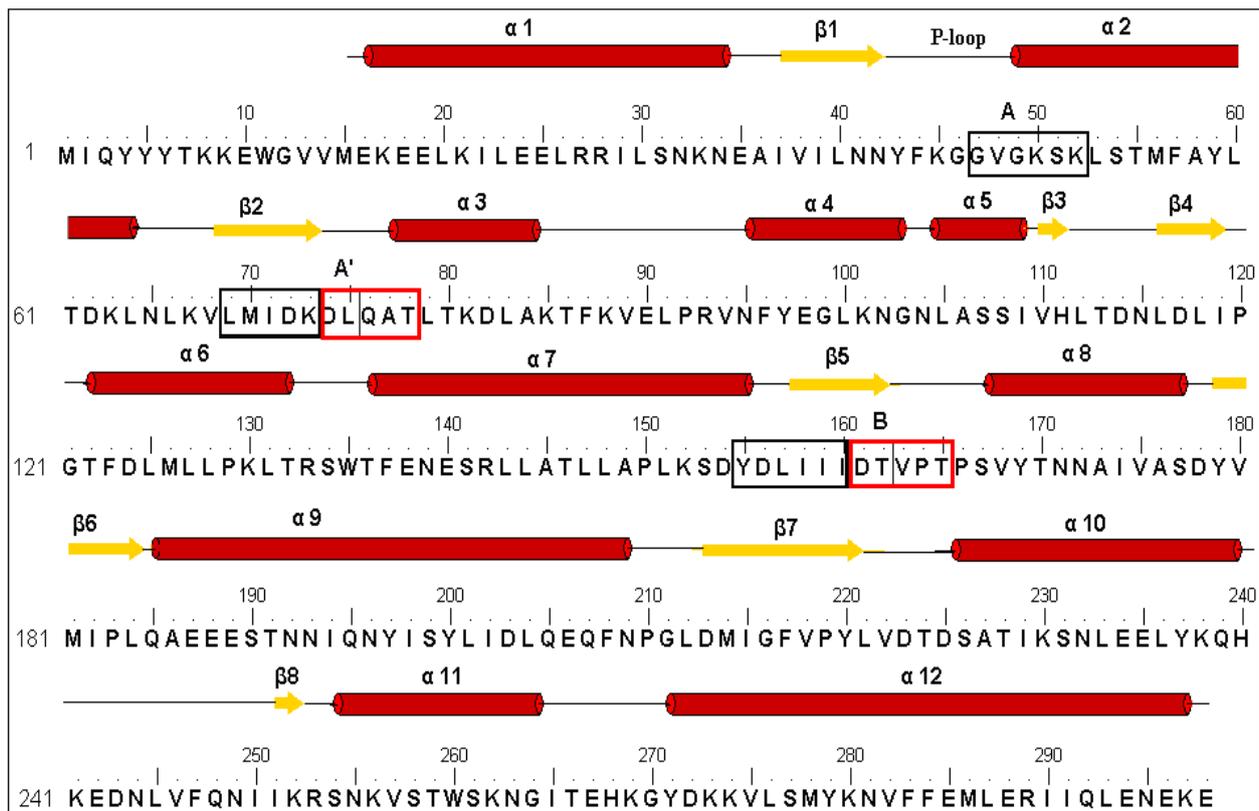
Mit jeweils zwei Aminosäureresten sind S8 und S3 die kürzesten  $\beta$ -Stränge der  $\delta$ -Struktur. Das  $\beta$ -Faltblatt ist im Bereich der  $\beta$ -Stränge 1, 6 und 7 gebogen. Der  $\beta$ -Strang 7 ist in sich gewunden und sorgt so mit dem  $\beta$ -Strang 8 für eine starke Wölbung des Faltblattes an seinem C-terminalen Ende. Die Helices H11 und H12 folgen unmittelbar aufeinander und bilden somit das C-terminale Ende des Proteins.



**Abb. 30** Topographische Darstellung des  $\delta$ -Kristallstrukturmodells.  $\beta$ -Stränge sind als gelbe Dreiecke dargestellt. Die Spitze der Dreiecke zeigt jeweils die C- und N-terminale Richtung, so wie sie in Abb. 29 zu sehen ist.  $\alpha$ -Helices werden durch rote Kreise repräsentiert. Die erste und die letzte Aminosäure (nach Einbuchstaben-Kodierung) eines Sekundärstrukturelements sind als Zahlenfolge angegeben. Die  $\alpha$ -Helices sind als H (für  $\alpha$ -Helix) und  $\beta$ -Stränge als S (für  $\beta$ -Sheet) vom N- bis C-terminalen Ende durchnummeriert (H1-H12 und S1-S8). Die erste und die letzte Aminosäure eines Sekundärstrukturelements sind im Zahlen- und Buchstabencode (als S254-G264) angegeben. Die  $\alpha$ -Schicht I und die  $\alpha$ -Schicht II deuten auf eine auffällige Verteilung der Sekundärstrukturelemente hin.

Die in Abb. 30 illustrierte Topographie der Sekundärstrukturelemente des  $\delta$ -Proteins zeigt, dass die Polypeptidkette aus einem Kernbereich besteht, der sich überwiegend aus  $\beta$ -Strängen zusammensetzt. Dieser Innenteil wird von zwei Helix-Schichten umgeben (Abb. 30).

Sowohl die N-terminalen Sequenzierungsergebnisse (siehe Kap. 2.5.3) als auch die Ergebnisse der MALDI-TOF-MS-Analyse von aufgelösten  $\delta_2$ -Kristallen zeigten, dass nur eine Aminosäure nämlich, die N-terminale Aminosäure Methionin fehlt (Kapitel 3.1.4).



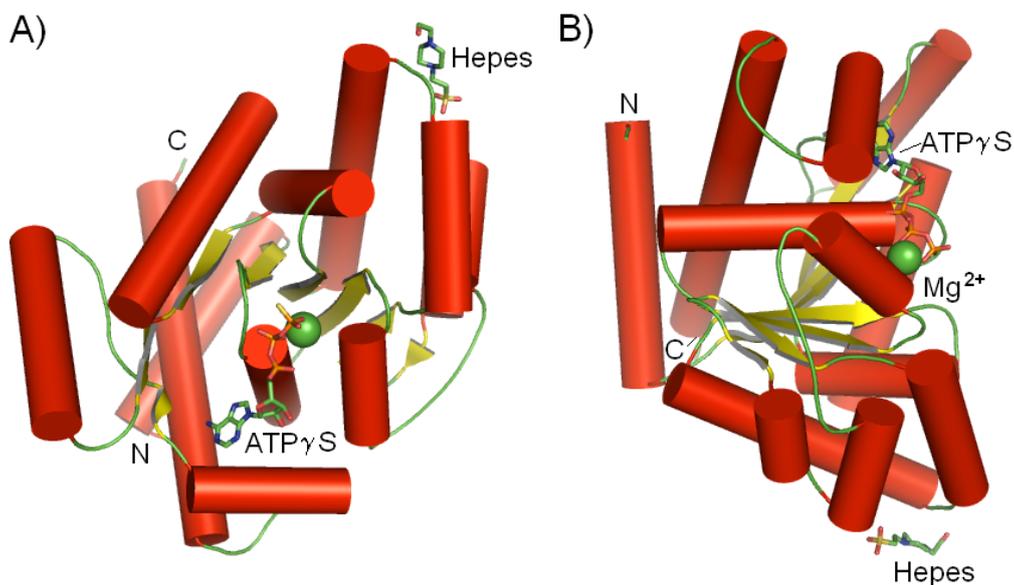
**Abb. 31** Aminosäure-Sequenz und Sekundärstruktur des  $\delta$ -Proteins.  $\alpha$ -Helices (1-12) sind durch rote Zylinder und  $\beta$ -Stränge (1-8) durch gelb-orangefarbene Pfeile dargestellt, während die Schleifen-Regionen durch einfache schwarze Linien angedeutet werden. Für die ersten 14 (M1-V14) Aminosäuren wurde keine Elektronendichte beobachtet, so dass der N-Terminus im Kristall ungeordnet vorliegt. Die als P-Loop bezeichnete Schleifen-Region stellt die charakteristische Schleife des Walker A-Motivs (KGGVGKS) dar. Konservierte Reste der Walker A-Box sind umrahmt und mit A markiert sowie die weiteren an der ATP-Bindung beteiligten konservierten Reste mit A' und das Walker B-Motiv mit B bezeichnet. Die rot umrahmten konservierten Bereiche stellen Erweiterungen der jeweiligen Walker-Box dar.

Die mit Hilfe des Programms PROF (Rost *et al.*, 2004) kalkulierte Vorhersage zeigt, dass sich das N-terminale Ende (M1-V14) des  $\delta_2$ -Proteins überwiegend aus nicht-strukturierten Schleifen zusammensetzt (Abb. 32 Sub sec). In der Kristallstruktur jedoch wurde keine Elektronendichte für die ersten 14 Aminosäuren beobachtet. Das Fehlen dieser Reste in der

Kristallstruktur konnte darauf zurückgeführt werden, dass der N-Terminus des Proteins im Kristall ungeordnet bzw. beweglich und flankiert sein könnte.

	.....10.....20.....30.....40.....50.....60
<u>AA</u>	MIQYYYTRKEMGVVMEKRELKILBELRRLSNKWEAIVILNNYFKGGVGRSKLSTMFAYL
<u>PROF sec</u>	EEEEEE EE EEE HHHHHHHHHHHHHH EEEEEHHH HHHHHHHHHH
<u>Rel_sec</u>	902576302001331368887888887764266823665020013676732677788775
<u>SUB sec</u>	L EEE ..... HHHHHHHHHHHH LLL EEE ..... LLL HHHHHHHH
<u>P 3 acc</u>	e e eee e bbbee bebbe b e beeeeebbbbbb beee ee bbbbbb b
<u>Rel_acc</u>	424232223612200634217225591401303228799700203510221323466447
<u>SUB_acc</u>	e.e ..... e ..... e.e.e.eil.e ..... bbbbb ..... e ..... bbbblb

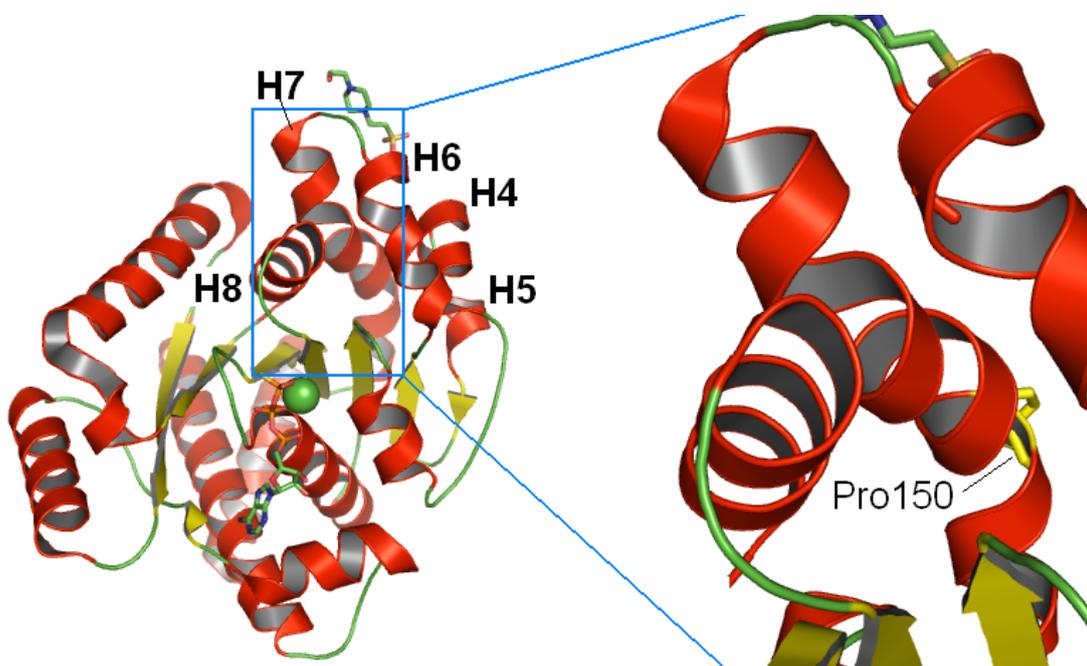
**Abb. 32** Sekundärstruktur-Vorhersage für das  $\delta_2$ -Protein (hier sind nur die ersten N-terminalen 60 Aminosäuren dargestellt), erstellt mit dem Programm PROF (Rost *et al.*, 2004). Die Bedeutungen der Abkürzungen: **PROF sec**: Mittels PROF vorhergesagte Sekundärstruktur: H = Helix, E =  $\beta$ -Strang, freies Feld = Schlaufen-Region. **Rel sec**: Index für die Verlässlichkeit der Vorhersage (0 = niedrig, 9 = hoch), **SUB sec**: Untermenge dieser PROF-Vorhersage für alle Reste mit erwarteter durchschnittlicher Genauigkeit >82 %. Bedeutung der Symbole H und E siehe PROF sec, L = Schlaufe, „.“ = keine Vorhersage, da die Verlässlichkeit <5 ist. **P 3 acc**: Von PROF vorhergesagte relative Zugänglichkeit zu Solvensregionen mit den drei Unterteilungen verdeckt (b), intermediär (i) und dem Lösungsmittel ausgesetzt (e). **Rel acc**: Verlässlichkeit für die Vorhersage der Zugänglichkeit zu Solvensregionen (0 = niedrig, 9 = hoch). **SUB acc**: Untermenge der PROF Vorhersage für alle Reste mit einer erwarteten durchschnittlichen Korrelation > 0,69.



**Abb. 33** Darstellung des  $\delta$ -Proteins im Komplex mit dem Liganden ATP $\gamma$ S, dem Mg-Ion (Mg<sup>2+</sup>) und dem zusätzlich in der Kristallstruktur beobachteten HEPES-Molekül. **A)** Gleiche Darstellung der Sekundärstrukturelemente wie in Abb. 29. **B)** Diese willkürlich als Seitenansicht des Strukturmodells definierte Abbildung stellt die Ausgangsposition in weiteren Darstellungen dar und ist durch mehrere Drehungen um die vertikale und horizontale Achse zu erhalten. Die  $\beta$ -Stränge sind gelb koloriert, während die Helices als rote Zylinder abgebildet sind. Das Mg-Ion wurde als grüne Kugel dargestellt und ist unmittelbar zwischen dem  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphat des ATP $\gamma$ S lokalisiert.

Weiterhin wurde in der asymmetrischen Einheit zusätzliche Elektronendichte an der Hauptkette als HEPES-Molekül identifiziert (Abb. 33). Die hohe Konzentration an HEPES im Kristallisationsansatz (siehe Kap. 2.6.4.1) könnte als eine mögliche Erklärung für die Bindung des Moleküls an das Protein herangezogen werden. Da die Kristallisation des  $\delta$ -Proteins im Komplex mit ATP $\gamma$ S/Mg $^{2+}$  nur unter der HEPES-Bedingung zu besser diffraktierenden Kristallen führte, ist davon auszugehen, dass das HEPES-Molekül bei der Stabilisierung des  $\delta$ -Proteins während der Kristallisation eine entscheidende Rolle spielt.

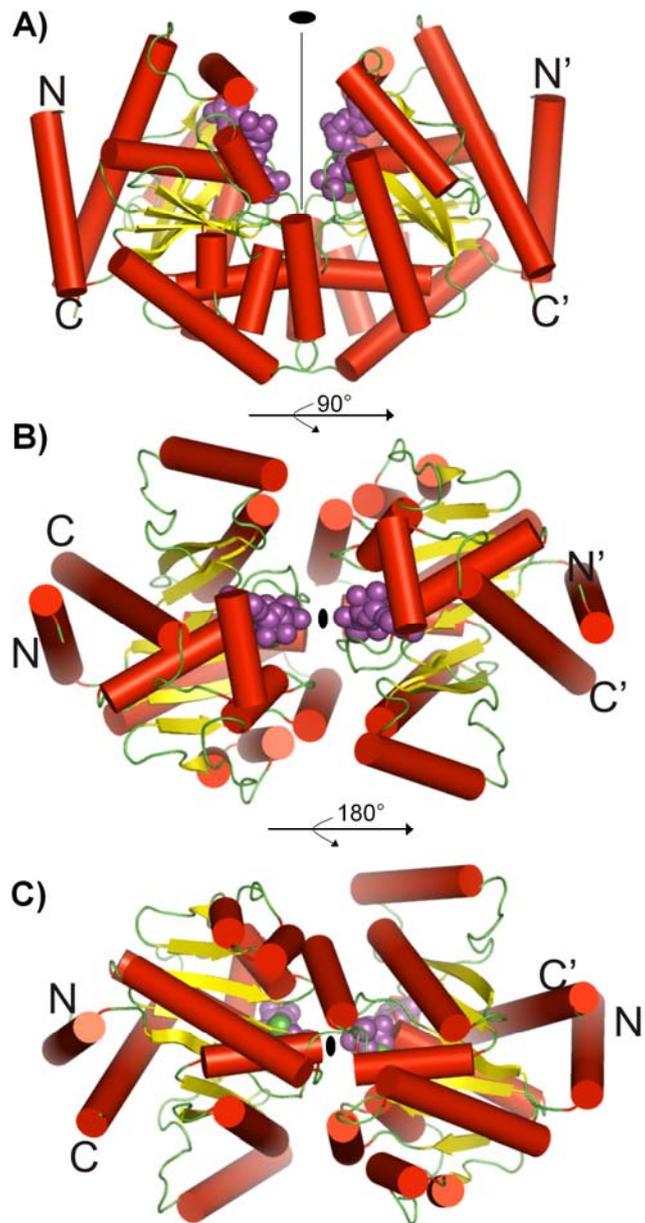
Die Überprüfung der Sekundärstrukturelemente des  $\delta$ -Proteins zeigt, dass die Helix 7 ( $\alpha$ 7) einen Knick aufweist (Abb. 34), welcher durch die Anwesenheit von Pro150 verursacht wird. Prolin schränkt die möglichen Hauptkettenwinkel ein und wirkt daher als Helixbrecher.



**Abb. 34** Bänderdarstellung des  $\delta$ -Monomers (links) und der Knick in der Helix 7 verursacht durch den Helixbrecher Pro150. Die rechte Abbildung zeigt die Hervorhebung des durch blaue Linien umrahmten Bereiches der linken Darstellung.

### 3.8 Quartärstruktur des $\delta_2$ -Homodimers

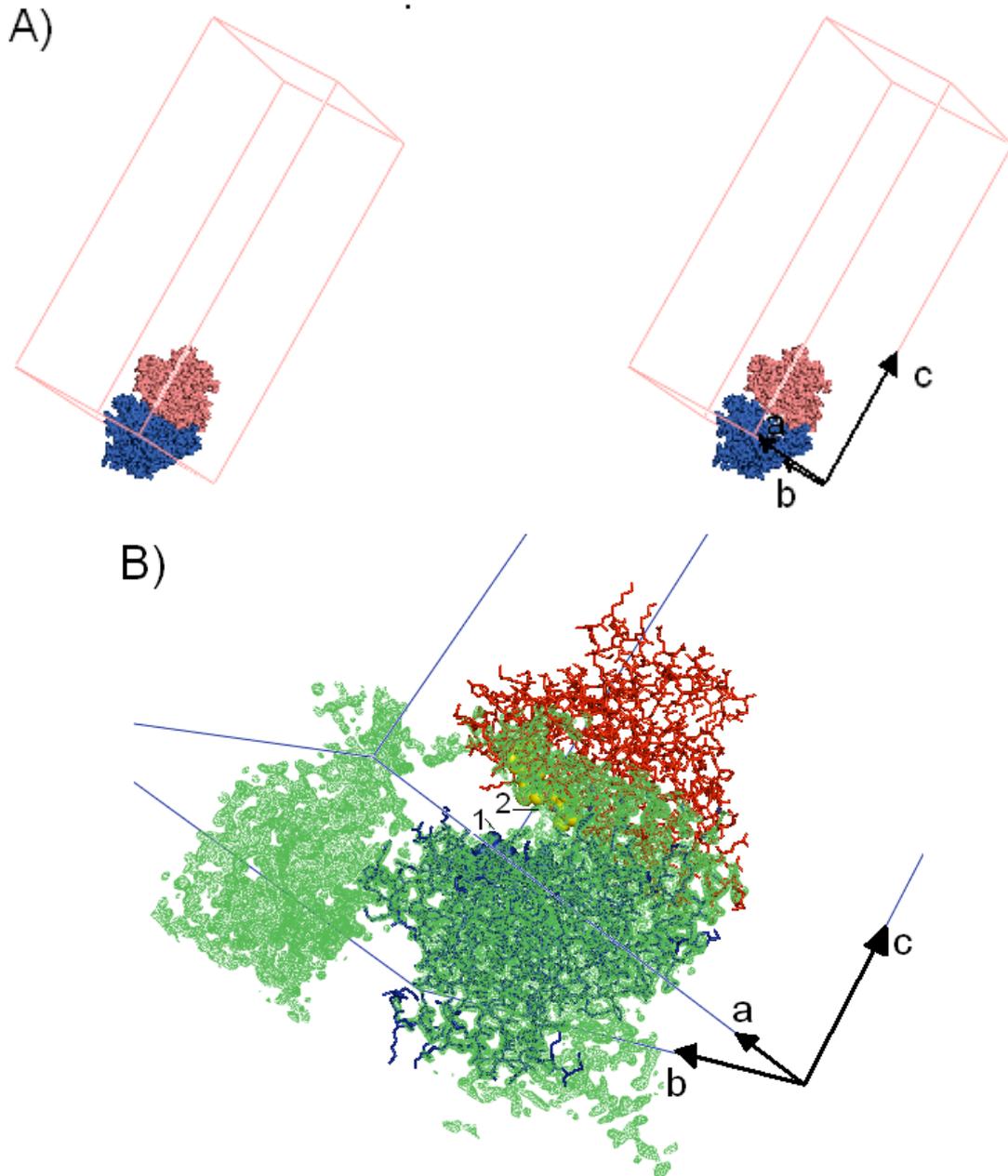
Die mit Hilfe des Molekularen Ersatzes berechneten Phasen und die daraus kalkulierte Elektronendichtekarte zeigt, dass sich in der asymmetrischen Einheit nur ein Molekül bzw. der Komplex ( $\delta$ •ATP $\gamma$ S•Mg $^{2+}$ ) befindet. Zwölf Symmetrie-verwandte  $\delta$ -Moleküle besetzen die Einheitszelle. Die Berechnung der Dimer-Grenzfläche zwischen zwei Monomeren ergibt, dass die Kontaktfläche 2197 Å $^2$  beträgt.



**Abb. 35**  $\delta_2$ -Homodimer aus drei Perspektiven. Helices sind als rot kolorierte Zylinder und  $\beta$ -Stränge als gelbe Pfeile abgebildet. Die zweizählige kristallographische Symmetrieachse ist in allen drei Perspektiven als schwarze Ellipse und Linie dargestellt. Die C- und N-terminalen Enden wurden mit den Buchstaben N und C bzw. N' und C' markiert. Die ATP $\gamma$ S-Moleküle (violett) und das  $Mg^{2+}$  (grün) wurden als CPK-Modelle dargestellt und befinden sich in der intermolekularen Kluft, die von den beiden Monomeren mit der ATP-Bindungstasche gebildet wird. **A)** Die „V“-förmige Seitenansicht stellt die Ausgangsposition für die weiteren Perspektiven dar. **B)** Die durch 90°-Drehung der Seitenansicht um die horizontale Achse erstellte Perspektive von oben. **C)** Die Perspektive von unten.

Die relativ große Kontaktfläche 2197 Å<sup>2</sup> deutet auf eine Dimer-Bildung hin. Die Form des in Abb. 35 A dargestellten  $\delta_2$ -Homodimers erinnert an den Buchstaben „V“. Die beiden ATP $\gamma$ S-Moleküle befinden sich in der Kluft der Monomer-Monomer-Kontaktfläche und sind damit einer möglichen Interaktion (eventuell durch ParB-Protein) zugänglich. Der Komplex hat eine maximale räumliche Ausdehnung von 45x61x75 Å<sup>3</sup>.

### 3.9 Die Kristallpackung

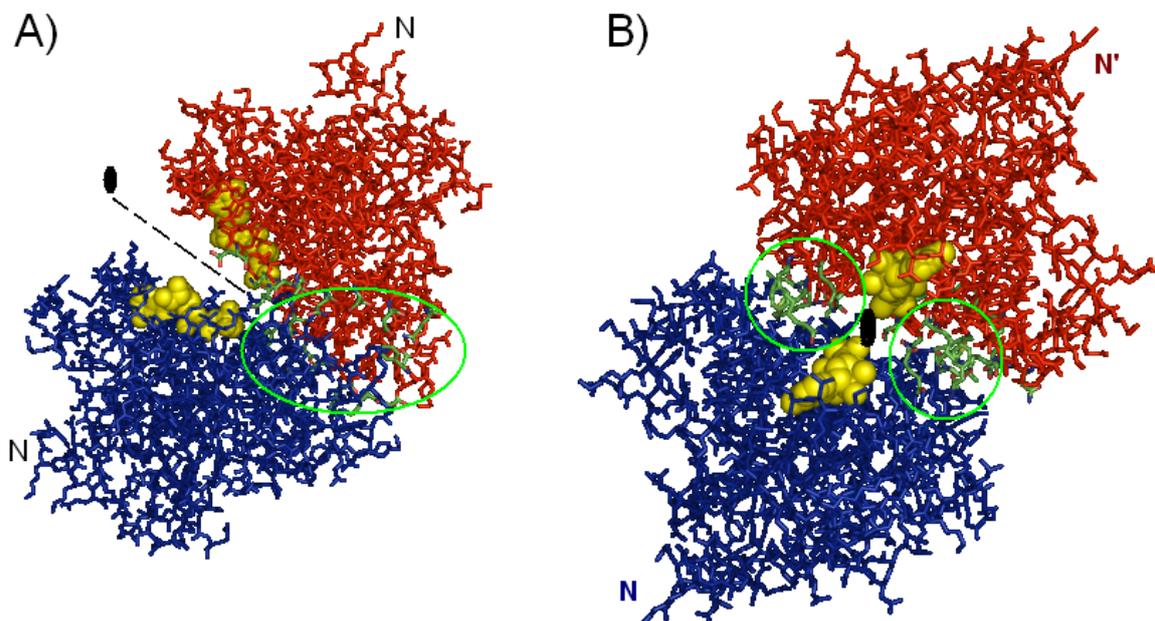


**Abb. 36** Stereo-Darstellung der Kristallpackung von  $\delta_2$ . **A)** Der Komplex  $[\delta \cdot \text{ATP}\gamma\text{S}]_2$  kristallisierte in der Raumgruppe  $P6_522$ , und die jeweiligen Zellachsen der Elementarzelle sind durch schwarze Pfeile markiert ( $a = 82.96$ ,  $b = 82.96$ ,  $c = 233.99$  Å). AS-Reste der Polypeptidkette des jeweiligen Monomers wurden als rotes bzw. blaues CPK-Modell gezeigt. **B)** Eine asymmetrische Einheit macht ein Zwölftel der Elementarzelle aus und enthält einen Protein-ATP- $\gamma$ -S-Komplex der Stöchiometrie  $[\delta \cdot \text{ATP}\gamma\text{S}]$  und ein  $\text{Mg}^{2+}$ -Ion. Elektronendichte wurde hier mit einem  $\sigma$ -Level von 2.0 konturiert und befüllt die gesamte asymmetrische Einheit (in hellgrün dargestellt). Die hier in der asymmetrischen Einheit grün dargestellte zusätzliche Dichte stellt die Dichte außerhalb der  $\text{C}\alpha$ -Kette des  $\delta_2$ -Proteins dar. Das symmetrieverwandte zweite  $\delta$ -Molekül wurde als rotes Stabmodell, während Ligand-Moleküle als blaues (1) und gelbes (2) CPK-Modell abgebildet werden. Grenzen der Elementarzelle wurden in blau gezeichnet.

Die Kristalle von  $\delta_2$  im Komplex mit ATP $\gamma$ S und Mg $^{2+}$  in der Raumgruppe P6 $_5$ 22 wurden zur Strukturbestimmung verwendet. Wie in Abb. 36-A dargestellt enthält die Elementarzelle dieser Raumgruppe mit den Zellkonstanten  $a = b = 82.96$ ,  $c = 233.99$  Å 12 Symmetrieoperationen der C $\alpha$ -Kette eines  $\delta$ -Monomers. Bezogen auf die 12 Symmetrieoperationen eines Monomers lässt sich erkennen, dass die erwähnte Elementarzelle 6 Dimere ( $\delta_2$ ) enthält. Die Abb. 36-A zeigt die Stereo-Darstellung eines Dimers, wo die jeweiligen Monomere in rot bzw. blau koloriert sind. In der asymmetrischen Einheit wurde die Elektronendichte für ein komplettes Monomer im Komplex mit ATP $\gamma$ S/Mg $^{2+}$  beobachtet (Abb. 36-B).

### 3.9.1 Monomer-Monomer Kontaktfläche

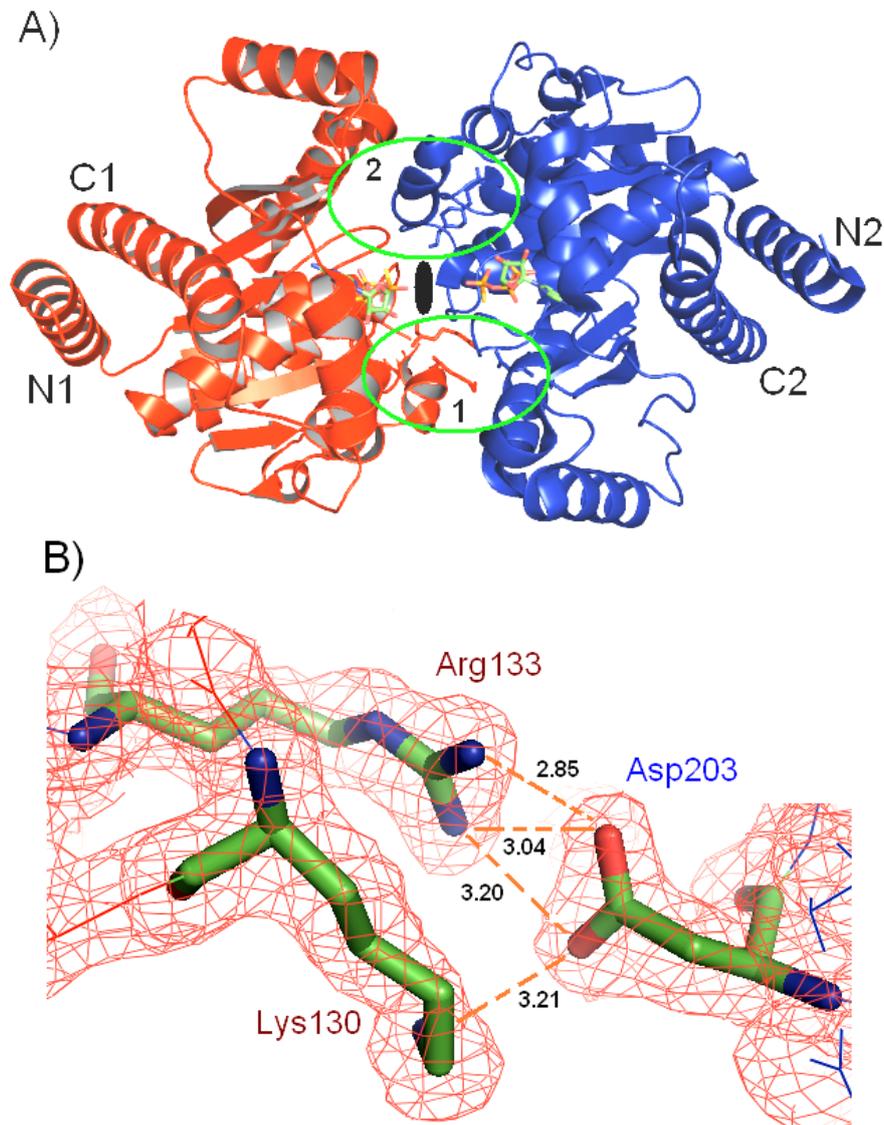
Die asymmetrische Einheit beinhaltet, wie bereits erwähnt, nur eine komplette Polypeptidkette des  $\delta_2$ -Proteins. Die durch die Umlagerung der C- $\alpha$ -Positionen eines kompletten Monomers berechneten symmetrieverwandten Moleküle (12 Symmetrieoperationen) von  $\delta$  ergaben, dass das Protein in der Elementarzelle als 6 Dimere vorliegt und dass die Dimere durch eine größere Kontaktfläche miteinander interagieren (Abb. 37 A-B).



**Abb. 37** Die Monomer-Monomer-Kontaktfläche von  $\delta_2$  im Komplex mit ATP $\gamma$ S und Mg $^{2+}$ . **A)** Seitenansicht des Komplexes [ $\delta \cdot \text{ATP}\gamma\text{S}$ ] $_2$  und [Mg $^{2+}$ ] $_2$ . Jedes Monomer wurde unterschiedlich koloriert (blau und rot) und ATP $\gamma$ S als gelbes CPK-Modell dargestellt. Die kristallographische zweizählige Symmetrieachse wurde als schwarze Linie gezeichnet. Die grüne Ellipse umrandet die Monomer-Monomer-Kontaktfläche in seitlicher Ansicht. **B)** Monomer-Monomer-Kontaktfläche von oben. Die Symmetrieachse wurde als schwarze Ellipse gezeichnet, während die jeweiligen Kontaktbereiche durch grüne Kreise umrahmt wurden.

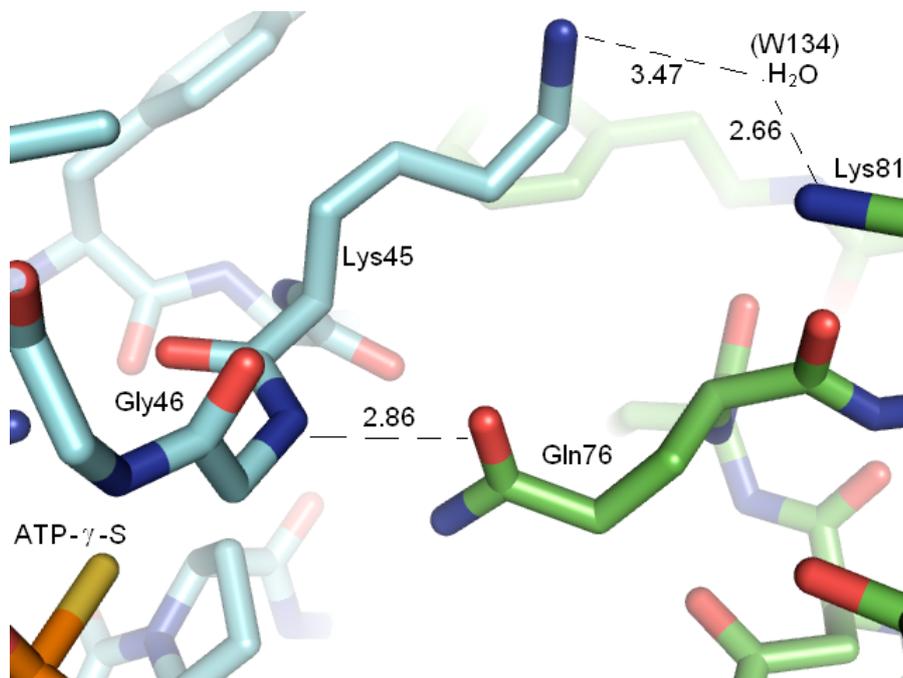
Die Dimerisierung von  $\delta_2$  in Lösung wurde auch durch die biochemische Charakterisierung des Proteins mittels Gel-Permeations-Chromatographie (Kapitel 3.1.1) und Glutardialdehyd-Crosslinking (Kapitel 3.1.2) nachgewiesen. Darüber hinaus sind auch alle bis jetzt strukturell

bekanntes chromosomal kodiertes ParA-Proteine wie Soj (Leonard *et al.*, 2005) und MinD (Suzanne C. Cordell und Jan Löwe, 2001) sowie ParA-homologe NifH (*nitrogenase iron protein*) in ihrer Nukleotid-bindenden Form als Dimere identifiziert (Georgiadis *et al.*, 1992; Schindelin *et al.*, 1997).



**Abb. 38** Darstellung der Monomer-Monomer-Grenzfläche und der polaren Kontakte vom  $\delta_2$ . **A)** Das Bändermodell der Tertiärstruktur des  $\delta_2$ -Dimers von oben. Die N- und C-terminalen Enden der beiden Monomere wurden mit N1 und C1 bzw. N2 und C2 markiert, die zweizählige Symmetrieachse wurde als schwarze Ellipse eingezeichnet. Der für die Darstellung der Monomer-Monomer-Kontakte wichtige Bereich wurde durch die grünen Ellipsen (1 und 2) angedeutet. **B)** Die an der Dimerisierung beteiligten Aminosäurereste bzw. die Seitenketten der Reste Asp203, Arg133 und Lys130 weisen in der hydrophoben Interaktionsfläche drei polare Kontakte auf. Die mit einem  $\sigma$ -Level von 1.0 dargestellten AS-Reste des jeweiligen Monomers wurden in unterschiedlicher Farbe illustriert. Stickstoff in blau und Sauerstoff in rot dargestellt, während die unterbrochenen orangefarbenen Linien auf die polaren Kontakte und die Zahlen auf die Länge der Kontakte in Angström hinweisen. Die Aminogruppe (NH<sub>2</sub>) von Arg133 hat damit den dichtesten Abstand (2.85 Å) zum OD2 der Seitenkette von Asp203 des anderen Monomers.

Die beiden durch die kristallographische zweizählige Symmetrieachse getrennten Monomere weisen mehrere polare Kontakte auf. Diese Reste werden in den Abb. 38 und 39 dargestellt. Wie bereits in Abb. 38 A dargestellt, sind Monomer-Monomer-Kontakte an zwei Stellen zu beobachten. Die Seitenkette von Arg133 des einen Monomers weist mit Asp203 des anderen Monomers zwei polare Kontakte auf, während die Seitenkette von Lys130 mit der Seitenkette von Asp203 einen polaren Kontakt in einem Abstand von 3.21 Å bildet. So weist z. B. OD2 von Asp203 der einen Polypeptidkette einen polaren Kontakt mit dem NH2 von Arg133 der anderen Polypeptidkette in einem Abstand von 2.85 Å auf (Abb. 38 B).



**Abb. 39** Darstellung der polaren Monomer-Monomer Kontakte von Gly46, und Lys45 der einen Polypeptidkette mit Gln76 und Lys81 der zweiten Polypeptidkette. Die Abbildung illustriert die an der Dimerisierung beteiligten Reste mit ihren Abständen zueinander. Die C-Atome der beiden Polypeptidketten wurden unterschiedlich koloriert (hellblau und grün). Die Abstände sind in Angström angegeben. Das Wasser-Molekül (W134) verbindet Lys81 mit Lys45.

Darüber hinaus scheinen Lys45 und Gly46 der Walker A-Box an der Dimerisierung beteiligt zu sein (Abb. 39). Dies stimmt mit den Daten des Soj-Proteins überein, bei dem Lys15 der Walker A-Box auch an der Dimerisierung von Soj beteiligt zu sein scheint (Leonard *et al.*, 2005). Für Soj wird berichtet, dass es in Gegenwart von ATP in Lösung als Dimer vorliegt und durch die Bindung von ATP dimerisiert wird und durch dessen Hydrolyse wieder in den monomeren Zustand übergeht (Leonard *et al.*, 2005).

**Tabelle 10** Übersicht der an der Dimerisierung beteiligten Aminosäurereste (AS) und die Abstände der Seitenketten bzw. Atome zueinander. Kodierung der Atome: OD2 ( $\beta$ -Sauerstoff von Aspartat), OE1 ( $\alpha$ -Sauerstoff von Glutamin) NZ (endständiger Stickstoff) und W: Wasser. <sup>a</sup> Der jeweilige Symmetrieoperator (Kette B).

AS-Rest	Kette (A) Atom	AS-Rest (Y, X-Y, 2/3 + Z) <sup>a</sup>	Kette (B) Atom	Abstand [Å]
Asp203	O2	Arg133	NH2	2.85
Asp203	O2	Arg133	NH1	3.04
Asp203	O1	Arg133	NH1	3.20
Asp203	O1	Lys130	NZ	3.21
Arg133	N	Lys130	O	3.26
Gly46	N	Gln76	O1	2.86
Phe44	O	Gln76	N2	3.44
Lys45	NZ	W134	O	3.47
W134	O	Lys81	NZ	2.66

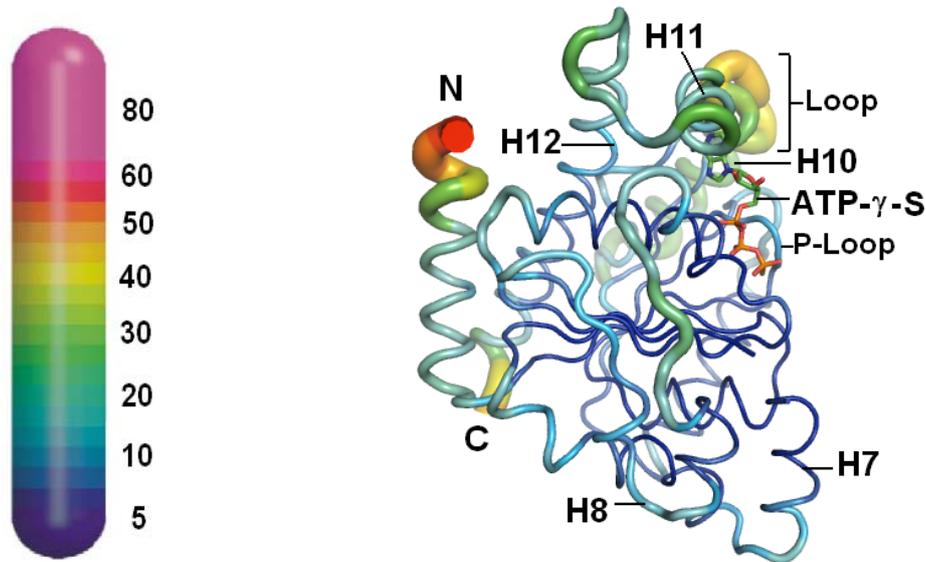
Wie in der Tabelle 10 gezeigt, bildet NZ der Seitenkette von Lys45 des einen Monomers mit NZ des Lys81 des anderen Monomers über einen polaren Kontakt mit dem O von H<sub>2</sub>O (W134), das einen Abstand von ca. 2.66 Å zu NZ des Lys81 und ca. 3.47 Å NZ des Lys45 aufweist. Gly46 dagegen überbrückt mit Hilfe seines im Rückgrat befindlichen Stickstoffatoms die intermolekulare Kluft, indem es mit dem OE1 der Seitenkette von Gln76 einen polaren Kontakt mit einem Abstand von 2.86 Å eingeht. Alle direkten Kontakte in der Monomer-Monomer-Grenzfläche des Komplexes sind auch in Tab. I (Kap. 7 Anhang) aufgelistet.

### 3.10 Temperaturfaktorverteilung

Die hohe Auflösung des nativen Datensatzes (1.83 Å) ermöglichte eine Verfeinerung der atomaren isotropen Temperaturfaktoren. Der durchschnittliche B-Wert für die Polypeptidkette, der als Temperaturfaktor gilt, betrug ca. 26 Å<sup>2</sup>. Wenngleich die N- und C-terminalen Bereiche der Polypeptidkette vergleichsweise hohe B-Faktoren zeigten (50-60 Å<sup>2</sup>), so wies der Hauptkettenverlauf größtenteils geringe Temperaturfaktoren (ca. 12-15 Å<sup>2</sup>) auf (Abb. 40). Die Interpretation der Elektronendichte erwies sich in N- und C-terminalen Bereichen mit jeweils 2-3 Resten als schwierig. Unordnungsphänomene führten zu verschmierten, schwer interpretierbaren

Elektronendichten der Seitenketten der endständigen Reste des Proteinrückgrats. Dies kann als Grund für die hohe Temperaturfaktorverteilung an dem Bereich angesehen werden.

Die in Abb. 40 illustrierte B-Faktor-Verteilung entlang der  $\delta$ -Monomer-Hauptkette zeigt, dass das Protein im Kern-Bereich, wo sich nur  $\beta$ -Stränge befinden, sehr stabil ist, während die relativ hohen B-Werte der meist im äußeren Bereich angeordneten Helices (H1, H10, H11) auf Beweglichkeit hinweisen.

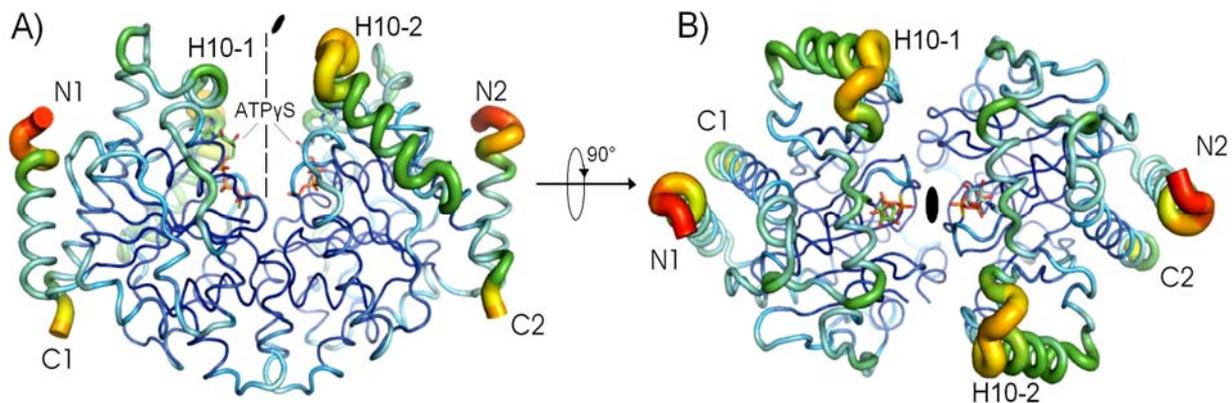


**Abb. 40** Temperaturfaktorverteilung des Monomers  $\delta$  mit dem Liganden  $\text{ATP}\gamma\text{S}$ . Die links abgebildete Skala zeigt die Anordnung der durchschnittlichen B-Faktoren zu der jeweiligen Farbe. Während der hoch konservierte ATP-Bindungsbereich als P-Loop gekennzeichnet ist, stellt H7 (Helix 7) den an der Dimerisierung beteiligten Bereich dar. Die weiteren hohe B-Werte aufweisenden Regionen sind als H10, H11 und H12 markiert. Das C-terminale Gln298 und die N-terminalen Met15 und Gln16 weisen aufgrund der schwer interpretierbaren Elektronendichte höhere B-Werte auf und sind dementsprechend rot bis gelb dargestellt. Das Ligandmolekül  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  wurde orangefarben (Phosphatgruppe) und grün (Base- und Ribose-Rest) illustriert. Die Abbildung wurde mit PYMOL erstellt.

Abgesehen von den oben erwähnten N- und C-terminalen Resten lässt sich im Verlauf der Temperaturfaktoren entlang des Proteinrückgrats ein flexibler Bereich erkennen, der sich unmittelbar über der ATP-Bindetasche befindet (H10 und Loop-Bereich zwischen S7 und H10). Innerhalb der Polypeptidkette weist dieser flexibler Bereich (Asp223, Thr224, Asp225, Ser226, Ala 227 und Thr228) Temperaturfaktoren bis zu  $35\text{-}50 \text{ \AA}^2$  auf (Abb. 40). Die an der Dimerisierung beteiligten Reste hingegen Lys130, Arg133, Asp203 besitzen relativ geringere B-Werte von  $18\text{-}25 \text{ \AA}^2$  (Abb. 40).

Die Abb. 41 stellt die Temperaturfaktorverteilung des  $\delta_2$ -Dimers mit  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  in einer Orientierung dar, wo die „V“-förmige Kluft zwischen beiden Monomeren und die ATP-Bindetasche zum Vorschein kommt. Wie auch hier zu erkennen ist, befindet sich die flexible Helix 10 (als H10-1

und H10-2) unmittelbar an dem Öffnungsbereich der Kluft und deutet damit auf eine mögliche Konformationsänderung des Proteins (Offen-Geschlossen) hin.



**Abb. 41** Temperaturfaktorverteilung des  $\delta_2$ -Dimers mit ATP $\gamma$ S. Die in Abb.40 dargestellte Skala bzw. die B-Werte gelten auch bei dieser Abbildung. **A)** Seitenansicht. **B)** Perspektive von oben.

### 3.11 Aktive Zentren und konservierte Domänen

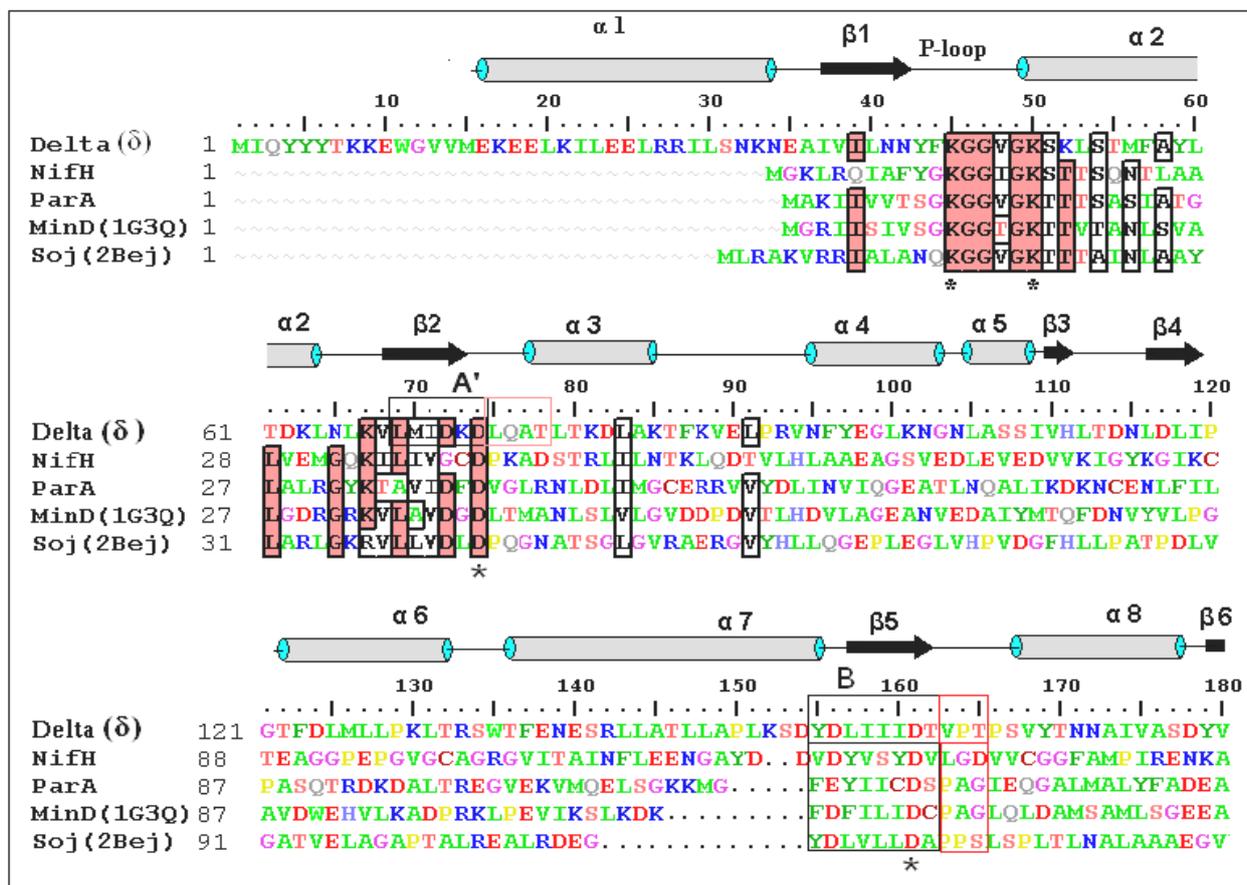
Sowohl der Primärsequenz-Vergleich mit dem Programm CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) und mit BLAST-Search als auch der Tertiärstruktur-Vergleich mit dem Programm DALI (Holm und Sander, 1993; Holm L. und Park J., 2000) des  $\delta_2$ -Proteins mit bereits bekannten ParA-homologen Proteine hat ergeben, dass  $\delta_2$  zu der Familie der ParA-Proteine gehört. Wie die anderen ATPasen dieser Familie Soj, MinD, ParA, ParF und NifH (Leonard *et al.*, 2005; Suzanne C. Cordell und Jan Löwe, 2001; Davey und Funnell, 1997 Hayes, F., 2000; Schindelin *et al.*, 1997; Jang *et al.*, 2000) weist auch das  $\delta_2$ -Protein eine schwache ATPase-Aktivität auf (Kap. 3.1.5).

#### 3.11.1 Konservierte P-Loop-Region

Der bereits mit dem Programm BLAST-Search erstellte Primärsequenz-Vergleich zeigte, dass  $\delta_2$  ein für ATP/GTP-bindende Proteine typisches Sequenzmotiv aufweist. Dieses Motiv setzt sich aus einer starren Schleife (Abb. 42, P-Loop) zwischen einem N-terminal vorgelagerten  $\beta$ -Strang (Abb. 42,  $\beta_1$ ) und einer C-terminal anschließenden  $\alpha$ -Helix (Abb. 42,  $\alpha_2$ ) zusammen und wird als Walker A-Motiv (Walker *et al.*, 1982; Yin *et al.*, 1986) bezeichnet. Es besteht aus zwei Glycin-Resten mit zwischengeschalteten Aminosäuren und dem Motiv GKT/S in C-terminaler Richtung (Abb. 42).

Dieses Motiv ist in Mononukleotid-bindenden Proteinen, wie zum Beispiel Nukleotid-Nukleosidkinasen, Nitrogenase-Eisenprotein-ähnlichen Proteinen und RecA-ähnlichen Proteinen zu finden (Murzin *et al.*, 1995). Obwohl nur das konservierte Sequenzmotiv GXXXXGKT/S als

Walker A-Motiv (Walker *et al.*, 1982) bezeichnet wird, zeigt eine Sequenzanpassung, dass dieses Motiv auf KGGGxGKT/S („abweichendes“ Walker A-Motiv) erweitert werden kann (Koonin, E.V., 1993). Diese Sequenzabfolge bildet als P-Schleife (Abb. 42, P-loop) ein starres Strukturmerkmal aus und wird als eine neue Subgruppe der ATP-/GTP-asen bezeichnet. Charakteristisch für dieses erweiterte Motiv ist, dass es im Gegensatz zum klassischen Motiv ein zusätzliches Lysin am Anfang des Motivs aufweist (Abb. 42, K45 und K50). Die auf den Sequenzanalyse basierenden Ergebnisse zeigen, dass dieses Motiv auch bei einer Subgruppe der GTPasen auftaucht (Leipe *et al.*, 2002).



**Abb. 42** Primärsequenz-Vergleich von homologen ParA-Familie-Proteinen wie ParA von *E. coli*, MinD (1G3Q), Soj (2Bej) und  $\delta$  sowie NifH Nitrogenase-Eisenprotein (1N2C-H) in ihren Walker A-Motiven. Die hoch konservierten Reste sind rot markiert. Die beiden konservierten Lysine (K45 und K50 von  $\delta$ ) sind durch zwei Sterne angedeutet. Der die Reste 1 bis 180 umfassende N-terminale Abschnitt von  $\delta$  wurde auch zusammen mit den Sekundärstrukturelementen als Zylinder ( $\alpha$ -Helix) und Pfeil ( $\beta$ -Strang) illustriert. Mit wurde der Bereich L69-D74 und mit B der Bereich Y155-T165 markiert, darüber hinaus wurde die auf strukturellen Daten basierende Erweiterung der jeweiligen Sequenzbereiche (bis Thr78) rot markiert, und die Reste Asp74 des Motivs A', und Asp161 des B wurden mit einem Stern markiert.

Die Abb. 42 illustriert weiterhin das hoch konservierte „abweichende“ Walker A-Motiv von ParA-homologen Proteinen. Die ATP-Bindetasche ist im P-Loop lokalisiert, der sich im Protein  $\delta_2$  zwischen  $\beta 1$  (S1) and  $\alpha 2$  (H2) befindet, und die Sequenzabfolge KGGVVGKST(S) aufweist. Dieses

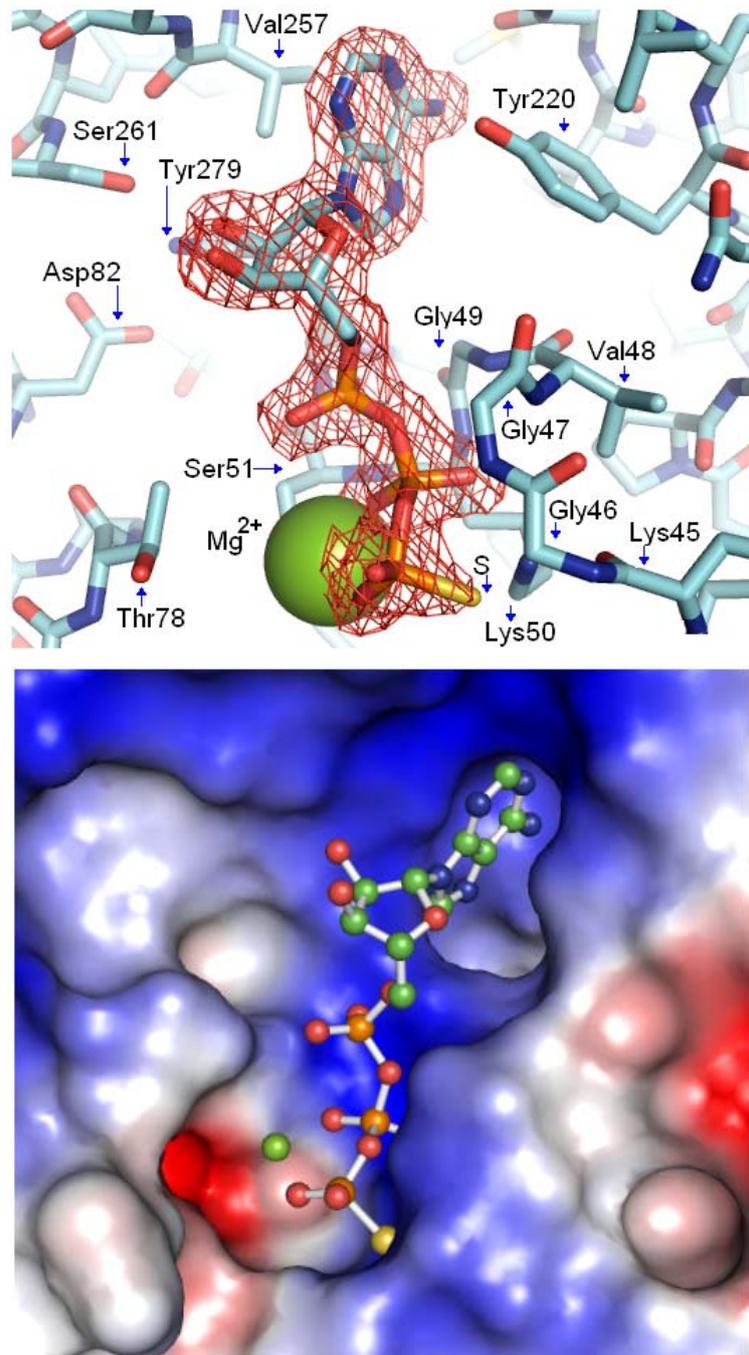
Motiv beginnt im Protein  $\delta_2$  mit Lys45 und erstreckt sich bis Ser51. Die „Signatur“ Lysine 50 (K50 von  $\delta_2$ ) stabilisiert während der Hydrolyse-Reaktion die entstehende negative Ladung um das  $\gamma$ -Phosphat. Darüber hinaus zeichnen sich die Walker-Typ-ATPasen dadurch aus, dass neben der Walker A-Box noch weitere konservierte Domänen - bezeichnet als *Switch* (Schalter) - an der Metallion-Bindung bzw. an der Hydrolyse von  $\gamma$ -Phosphat beteiligt sind (Gasper *et al.*, 2006). Das Par A-homologe  $\delta_2$ -Dimer weist sowohl *Switch I* (Abb.42 markiert als A') als auch *Switch II* (markiert als B) auf.

Die Aminosäurereste im P-Loop binden meistens die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phosphate von Nukleotiden, während die Reste im Walker A'- (LMIDKDLQAT) und Walker B-Motiv (YDLIIIDTVPT) in der Regel das Vorhandensein oder das Fehlen von  $\gamma$ -Phosphat erkennen (Abb. 42). Walker A' befindet sich zwischen  $\beta_2$  und  $\alpha_3$  und umfasst die Reste 74-79, wobei Asp74 mit Thr78 zusammen für die Koordinierung des Mg-Ions an der ATP-Bindetasche sorgt, indem es die negative Ladung um das  $\gamma$ -Phosphat neutralisiert (Kap. 3.11.2 Abb. 43). Das erste Aspartat (Asp74) des Motivs A' scheint bei allen verwandten Strukturen wie Soj, MinD und NifH konserviert zu sein; so z. B. ist bei MinD von *Archaeoglobus fulgidus* die Konsensussequenz für das Walker A' „DITMAN“ und für NifH von *Rhodobacter capsulatus* dagegen „DPKAD“, wobei in allen Strukturen das erste Aspartat neben der Koordinierung des Metallions auch bei der Stabilisierung des nukleophilen Angriffes um das  $\gamma$ -Phosphat eine wichtige Rolle spielt (Suzanne C. Cordell und Jan Löwe, 2001).

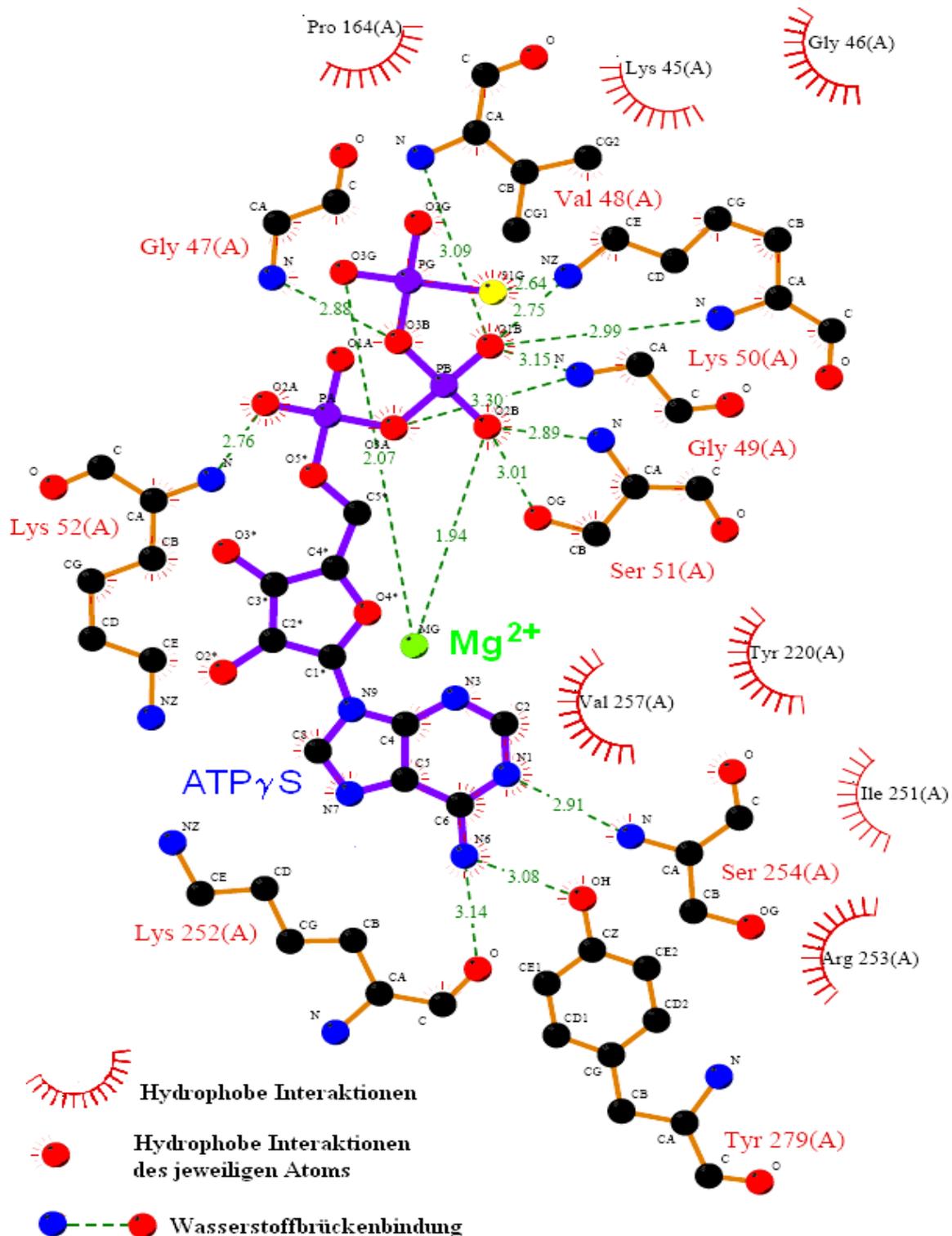
Das Walker B-Motiv dagegen erstreckt sich von Tyr155 bis Thr165. Die Reste Asp161 und Thr162 befinden sich im S5, während die restlichen Aminosäuren im Loop-Bereich zwischen S5 und H8 lokalisiert sind (Abb. 42). Auch hier ist dieses Aspartat (Asp161) hoch konserviert und an der Koordinierung des Metallions beteiligt. Obwohl das zweite Aspartat Asp156 in dem Primärsequenz-Vergleich genauso konserviert ist, scheint es bei der ATP-Bindung keine direkte Rolle zu spielen.

### 3.11.2 Die ATP- Bindetasche

Die biochemischen Analysen (ATPase-Aktivitätassay) (Kap. 3.1.5) deuteten darauf hin, dass Protein  $\delta_2$  eine - wenn auch zum Teil schwache - ATPaseaktivität besitzt. Deshalb wurden auch einige Kristallisations-Screens in Gegenwart des ATP-Analogons ATP $\gamma$ S durchgeführt, die anschließend zum Erfolg führten. Die enzymatische Aktivität des Proteins und die daraus resultierende Instabilität während der Kristallisation könnten ein Grund dafür sein, dass die Ansätze mit ATP nicht zum Erfolg führten. Die anschließend bestimmte Kristallstruktur von  $\delta_2$  in Gegenwart von nicht hydrolysierbarem ATP-Analogon ATP $\gamma$ S bestätigte die Annahme, dass es sich bei dem  $\delta_2$ -Protein um ein Nukleotid-/ Nukleosid-Tri-Phosphat bindendes Protein handelt.



**Abb. 43** ATP-Bindetasche des  $\delta_2$ -Proteins. **(oben)** Die mit einem  $\sigma$ -Level von 1.0 konturierte Elektronendichte (das rote Netz) von ATP $\gamma$ S und das Mg $^{2+}$ -Ion. Die AS-Reste sind als Stabmodelle und das Mg-Ion ist als grünes CPK-Modell dargestellt, die Phosphor-Atome sind in orangefarben, die C-Atome in hellblau, Sauerstoffatome in rot, die Stickstoffatome in blau und das Schwefelatom ( $\gamma$ S) ist in gelb abgebildet. **(unten)** Das Oberflächenpotential der ATP-Bindetasche mit ATP $\gamma$ S als Stabmodell und dem Mg $^{2+}$ -Ion als CPK-Modell (frei stehende grüne Kugel). Die blau dargestellten Flächen kennzeichnen die positiv geladenen Bereiche, während die rosafarbenen und rot kolorierten Flächen die negativ geladenen Bereiche illustrieren.



**Abb. 44** Übersicht der an der ATP $\gamma$ S und Mg $^{2+}$ -Ionen-Bindung beteiligten Aminosäurereste. Die jeweiligen Atome werden schwarz (C, Kohlenstoff), blau (N, Stickstoff), rot (O, Sauerstoff), violett (P, Phosphor), gelb (S, Schwefel) und grün (Magnesium) dargestellt. Aminosäurereste wurden nach der Drei-Buchstaben-Kodierung beschriftet. Die hoch konservierten Reste des Walker A-Motivs (Gly49, Lys50 und Ser51) und von Walker A' (Asp74) und Walker B (Asp161, Thr162 und Pro164) sind um die Phosphoratome (violette Kugel) des ATP $\gamma$ S lokalisiert, während die sich nahe des C-Terminus befindlichen Reste wie Tyr220 (S7), Lys252 (S8), Ser254 (H11), Val257 (H11), Ser258 (H11), Ser261 (H11) und Tyr279 (H12) unmittelbar mit Adenosin und Ribosemolekül interagieren.

Betrachtet man die in Abb. 43 und 44 dargestellten ATP-Bindetaschen von  $\delta_2$  genauer, so stellt man fest, dass das Ligandmolekül ATP $\gamma$ S an die „Anionenlücke“ (Dreusike und Schulz, 1986), die durch die Helices 11 und 12 (Tyr279) des C-terminalen Helixbereiches und den  $\beta$ -Strang S7 (Tyr220) gebildet ist, anbindet. Die Lage des Adenosins von ATP $\gamma$ S stimmt genau mit der erwarteten Bindetasche überein. Sie befindet sich in einem Bereich, wo sich auch die voluminösen Seitenketten von Tyr220 und Tyr279 befinden, welche eine sandwichartige  $\pi$ -Wechselwirkung zu der planaren Adenin-Base zustande bringen (Abb. 43). Der Abstand zwischen der aromatischen Gruppe von Tyr279 und der N6 des Adenosins beträgt 3.08 Å (Abb. 44), während Tyr220 mit seiner aromatischen Seitenkette an O4\* des Ribose-Moleküls durch die Koordinierung eines Wassermoleküls bindet.

**Tabelle 11** Übersicht der Aminosäurereste (AS) und ihre direkten Wasserstoffbrückenbindungen zu dem Liganden ATP $\gamma$ S (D, für *distance*). Die jeweiligen Positionen der Sauerstoffatome werden als A =  $\alpha$ , B =  $\beta$  und G =  $\gamma$  gekennzeichnet. O3B: Dritter Sauerstoff des  $\beta$ -Phosphats. <sup>1</sup>: Atom des AS-Restes, <sup>2</sup>: Atom des Ligandmoleküls.

AS	Atom <sup>1</sup>	ATP $\gamma$ S	Atom <sup>2</sup>	D (Å)
<b>Gly47</b>	<b>N</b>	<b><math>\beta</math>-P</b>	<b>O3B</b>	<b>2.88</b>
<b>Val48</b>	<b>N</b>	<b><math>\beta</math>-P</b>	<b>O1B</b>	<b>3.09</b>
Gly49	N	$\beta$ -P	O1B	3.15
Gly49	N	$\beta$ -P	O3A	3.30
<b>Lys50</b>	<b>NZ</b>	<b><math>\gamma</math>S</b>	<b>S1G</b>	<b>2.64</b>
<b>Lys50</b>	<b>NZ</b>	<b><math>\beta</math>-P</b>	<b>O1B</b>	<b>2.75</b>
Lys50	N	$\beta$ -P	O1B	3.10
<b>Ser51</b>	<b>OG</b>	<b><math>\beta</math>-P</b>	<b>O2B</b>	<b>3.01</b>
<b>Ser51</b>	<b>N</b>	<b><math>\beta</math>-P</b>	<b>O2B</b>	<b>2.89</b>
Ser51	N	$\alpha$ -P	O2A	3.23
<b>Lys52</b>	<b>N</b>	<b><math>\alpha</math>-P</b>	<b>O2A</b>	<b>2.76</b>
<b>Ser254</b>	<b>N</b>	<b>Adenosin</b>	<b>N1</b>	<b>2.91</b>
Ser261	OG	Ribose	O2*	3.42
Lys252	O	Adenosin	N6	3.14
<b>Tyr279</b>	<b>OH</b>	<b>Adenosin</b>	<b>N6</b>	<b>3.08</b>

Die hoch konservierten Reste Gly49, Lys50 und Ser51 der P-Schleife sind direkt an der Bindung von ATP $\gamma$ S beteiligt. Die zentrale Rolle bei der Bindung von ATP $\gamma$ S spielt sicherlich Lys50, indem es zwei direkte und eine indirekte Wasserstoffbrücke (H-Brücke) zur

Phosphatgruppe bildet. Die erste direkte H-Brückenbindung wird durch das endständige Stickstoffatom (NZ) der Seitenkette zum ersten Sauerstoff des  $\beta$ -Phosphats (O1B) mit einem Abstand von 2.75 Å gebildet, während der indirekte Kontakt mit dem Wassermolekül (W263) mit einem Abstand von 2.95 Å zustande kommt. Das erste Sauerstoffatom des  $\beta$ -Phosphats (O1B) wird durch die zweite H-Brücke mit einem Abstand von 2.99 Å vom Stickstoffatom (N) des Rückgrats (C-N) von Lys50 stabilisiert. Das Sauerstoffatom O<sub>y</sub> (OG) der Seitenkette von Ser51 weist eine direkte Bindung mit einem Abstand von 3.01 Å zum zweiten Sauerstoff vom  $\beta$ -Phosphat (O2B) auf, wobei die primäre Aufgabe von Ser51 die Koordination des Mg-Ions zu sein scheint, indem es einen direkten Kontakt mit einem Abstand von 2.07 Å zum Mg<sup>2+</sup>-Ion bildet (Kap. 3.11.3 Abb. 45).

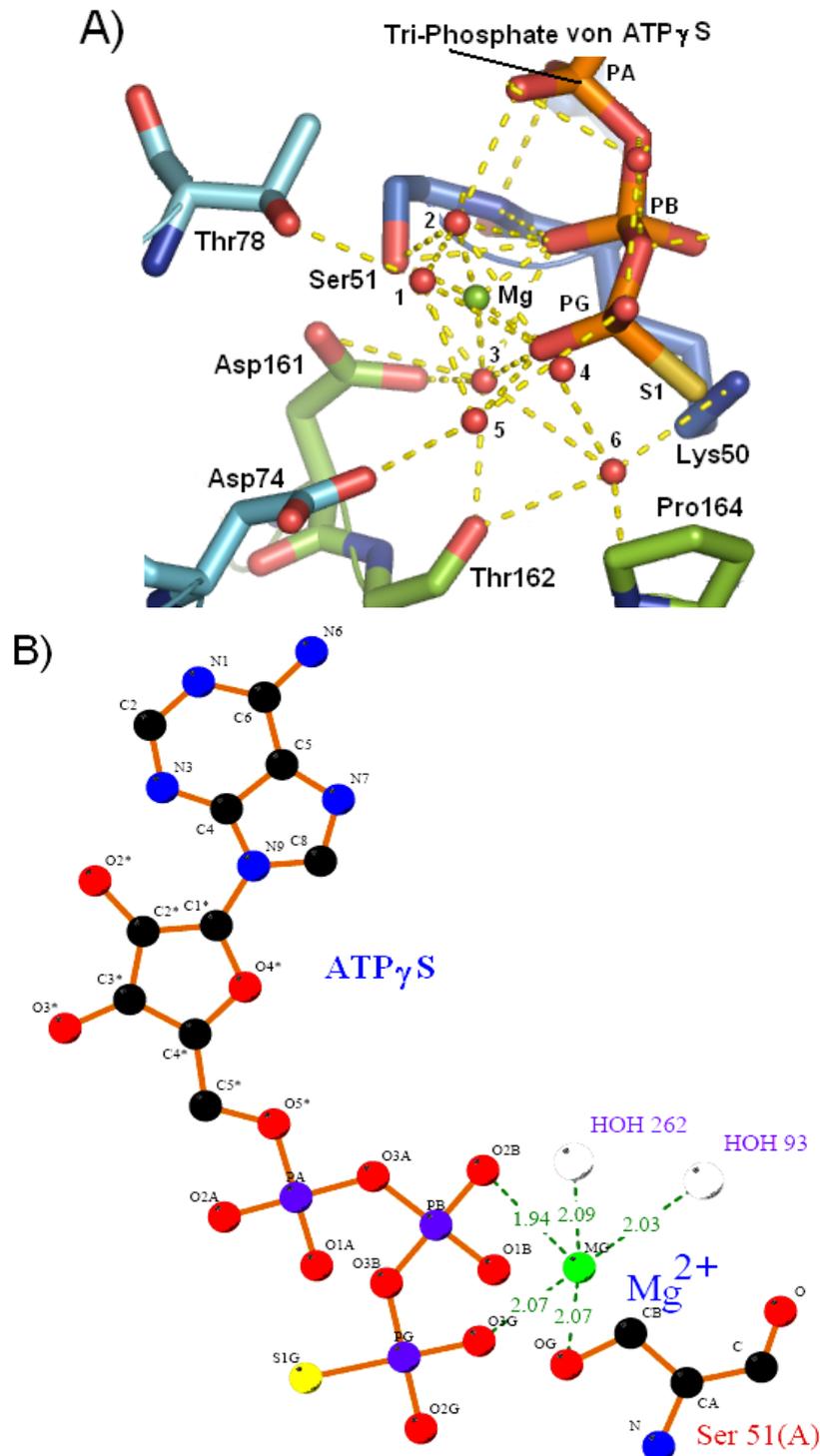
Auch die Rückgrat-NH-Gruppen der beiden Glyzine (G47 und G49) interagieren mit der Phosphat-Gruppe von ATP<sub>γ</sub>S, wobei das Stickstoffatom (N) von Gly47 der C-N-Peptidbindung eine starke H-Brücke mit O3B des  $\beta$ -Phosphats mit einem Abstand von 2.88 Å bildet, während das N von Gly49 zum O3A der  $\alpha$ -Phosphatgruppe einen weiteren Kontakt mit einem Abstand von 3.30 Å aufweist (Tab. 11).

### 3.11.3 Das gebundene Magnesiumion

In den meisten Kristallstrukturen von Proteinen mit Walker A-Motiv begegnet man sowohl den positiv geladenen Metallionen als auch den negativ geladenen Phosphat- und Sulfationen in der Nähe des P-Loops, die entweder in der Kristallisationslösung enthalten sind oder während der Aufreinigung an das Protein gebunden wurden. Auch in der Elektronendichte von  $\delta_2$ -Kristallen wurde ein solches Ion, nämlich das Magnesiumion, lokalisiert. Die Anwesenheit des Mg<sup>2+</sup>-Ions beruht auf der Co-Kristallisationsbedingung (Kap. 3.4.2), bei der MgCl<sub>2</sub> (5 mM) als Metallion eingesetzt wurde.

Wie in Abb. 45-A dargestellt, sind die Sauerstoffatome der Seitenketten von Asp74, Thr78, Ser51, Asp161 und Thr162 an der Koordinierung des Mg-Ions beteiligt, indem sie zusammen mit Sauerstoffatomen der Wassermoleküle für eine überwiegend negative Ladung um die Phosphatgruppe des ATP<sub>γ</sub>S sorgen. Dies führt zu einer Erhöhung der Affinität zu positiv geladenen Metallionen, wie hier Magnesium. Dabei bilden die Seitenketten der erwähnten Aminosäuren als Akzeptor-Moleküle mit dem Metallion Salzbrücken aus, die einen Abstand von max. 3.00 Å nicht übersteigen. Ser51 bildet, als eine einzige Aminosäure, eine direkte Salzbrücke mit dem Mg-Ion in einem Abstand von 2.07 Å (Abb. 45 B), während Asp161 eine H-Brückenbindung zum Wassermolekül W262 mit einem Abstand von 2.65 Å aufweist, das

seinerseits dem Mg-Ion durch eine koordinative Bindung mit einem Abstand von 2.09 Å stabilisiert (Abb. 45 B).



**Abb. 45** Übersicht der an der Mg $^{2+}$ -Koordinierung beteiligten AS-Reste. **A)** Die an der Bildung des Mg $^{2+}$ -Clusters beteiligten Aminosäuren und die jeweiligen über Wassermoleküle vermittelten Kontakte zu dem Mg $^{2+}$ -Ion. Die Wassermoleküle werden als rote CPK-Modelle dargestellt und sind von 1-6 nummeriert, wobei die Zahlen 1: W30, 2: W93, 3: W262, 4: W164, 5: W37 und 6: W263 kodieren. **B)** Die an der Koordinierung des Metallions (Mg $^{2+}$ , grüner Kugel) beteiligte Aminosäure Ser51. Die Abstände wurden durch grüne unterbrochene Linien dargestellt. Die Phosphatgruppe von ATP $\gamma$ S wurde von  $\alpha$ -(PA),  $\beta$ -(PB) bis  $\gamma$ -Phosphat (PG) mit ihrem endständigen Schwefelatom (S1G) beschriftet. Die beiden Wassermoleküle (HOH 262 und HOH 93) wurden als weiße Kugeln illustriert.

Die Konformation des Proteinrückgrats und der Seitenketten sowie die Präsenz der unmittelbaren Phosphatgruppe von ATP $\gamma$ S zeigen, dass das Mg<sup>2+</sup>-Ion durch insgesamt fünf Sauerstoffatome der in seiner Nähe lokalisierten Moleküle koordiniert ist (Abb. 45 B). Das Sauerstoffatom des  $\beta$ -Phosphats (O2B) bildet die erste koordinative Bindung mit einem Abstand von 1.94 Å aus, während die zweite Bindung durch das Sauerstoffatom des Wassermoleküls (W93) mit einem Abstand von 2.03 Å gebildet wird. Die weiteren Bindungen werden vom Sauerstoffatom (O $\gamma$ ) von Ser51 mit dem Abstand von 2.07 Å und vom  $\beta$ -Phosphat (O2B) mit 2.07 Å sowie vom zweiten Wassermolekül (W 262) mit 2.09 Å gebildet (Abb. 45 B und Tabelle 12).

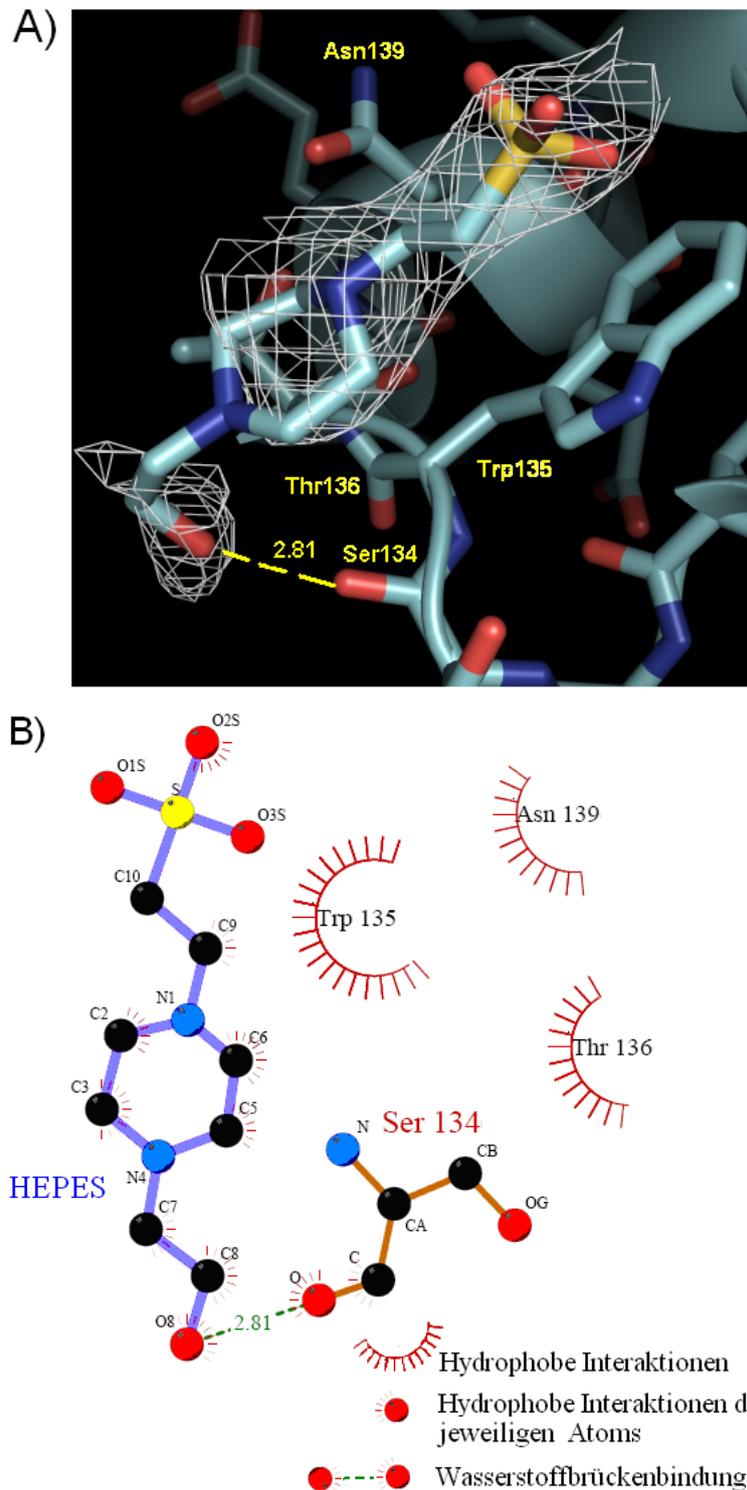
**Tabelle 12** Übersicht der Aminosäurereste (AS) und Wassermoleküle, ihre Wasserstoffbrückenbindungen zum Liganden ATP $\gamma$ S. Bindungslängen (D, für *distance*), W für Wasser.

AS	D (Å)1	HOH (W)	D (Å)2	Ligandatome	B-Wert (Å <sup>2</sup> ) vom W
Ser51	3.00	93	2.84	$\beta$ -P-O2B	17.93
Asp74	2.65	37	3.49	$\gamma$ -P-O2G	24.75
Thr78	2.77	30	3.55	$\gamma$ -P-O3G	25.11
Asp161	2.63	262	3.04	$\gamma$ -P-O3G	13.62
Pro164	3.00	263	3.11	$\gamma$ -P-O3G	32.88
Tyr220	2.65	130	3.33	Ribose-O4*	35.20

Die Temperaturfaktorverteilung des Proteinrückgrates von  $\delta_2$  in dieser Region der P-Schleife liegt mit 18 Å<sup>2</sup> weit unter dem durchschnittlichen B-Wert von 26 Å<sup>2</sup> und weist damit eine stabile Region aus. Der B-Wert des gebundenen Mg-Ions (15.80 Å<sup>2</sup>) und der beiden Wassermoleküle W93 bzw. W262 (17.93 Å<sup>2</sup> und 13.62 Å<sup>2</sup>) deuten auf eine ziemlich stabile Lokalisation bzw. Koordination des Metallions hin.

Der Hydrolyse-Mechanismus der Walker-Typ-ATPasen benötigt ein Wassermolekül bzw. O<sub>cat</sub> (katalytisch wirkendes Sauerstoffatom), welches sich mit der P-O $\beta$ -Bindung (O<sub>cat</sub>•••P-O $\beta$ ) in einer Reihe befindet und für den nukleophilen Angriff durch einen als katalytische Base wirkenden AS-Rest aktiviert ist. Es befindet sich kein Wassermolekül in einer solchen Konfiguration, da diese Position von O<sub>cat</sub> durch Pro164 des Walker B-Motivs blockiert wird. Die vermutliche katalytische Base könnten die konservierten Reste Asp74, Thr78 in dem Walker A'-Motiv und Asp161 in dem Walker B-Motiv sein, die mit zwei Wassermolekülen im Kontakt treten, welche andererseits die  $\gamma$ -P-Gruppe attackieren können (Abb. 45-A und Tab. 12).

### 3.11.4 Das HEPES-Molekül

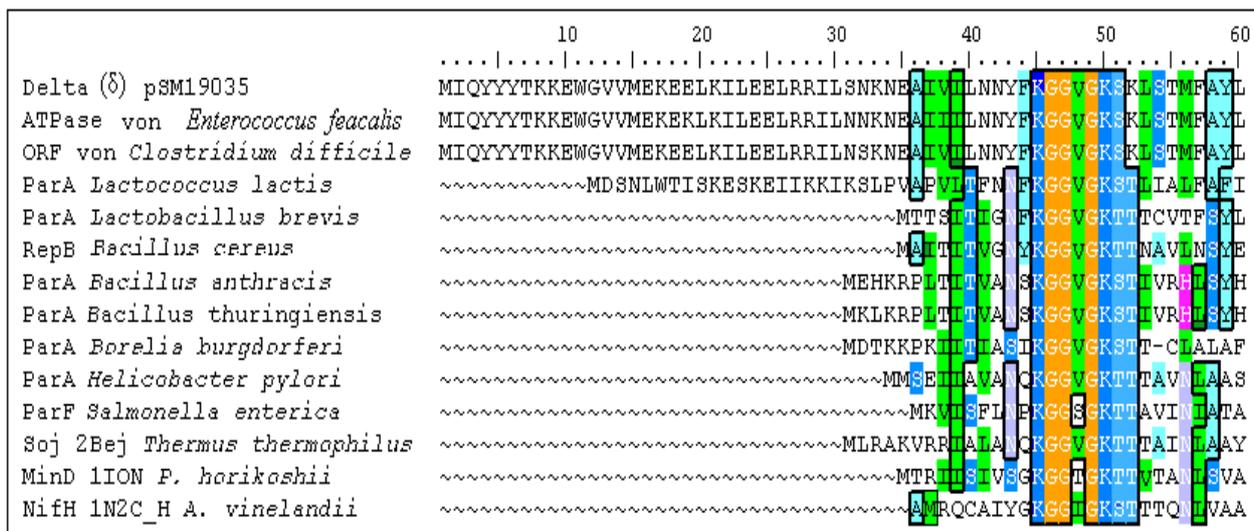


**Abb. 46** Bindung des HEPES-Moleküls an das  $\delta_2$ -Protein dargestellt als Stabmodell und als Skizze. **A)** Elektronendichte des HEPES-Moleküls wurde mit einem  $\sigma$ -Level von 1.5 konturiert. Die Sauerstoffatome sind in rot und die Stickstoffatome in blau kodiert. An der H-Brückenbildung sind nur Ser134 und HEPES mit einem Abstand von 2.81 Å beteiligt. **B)** Skizzendarstellung der Kontaktseite zum HEPES. Die Reste Trp135, Thr136 und Asn139 üben hydrophobe Interaktionen mit dem Molekül aus.

Aufgrund der höheren Konzentration an Na-HEPES (0.9 M) in der Kristallisationslösung scheint es zu einer Anlagerung des HEPES-Moleküls an das  $\delta_2$ -Protein gekommen zu sein. Die zusätzliche Dichte an dem Proteinrückgrat konnte durch den manuellen Einbau des HEPES-Moleküls als solche identifiziert werden. Dieser Einbau wurde durch den R-Wert kontrolliert. Wie in Abb. 46 B bereits dargestellt, weist das HEPES-Molekül eine H-Brücke mit dem Sauerstoffatom von Ser134 mit einem Abstand von 2.81 Å auf und ist unmittelbar an den aromatischen Aminosäurerest Trp135 angelagert, wobei es mit diesem keine direkte Bindung aufbaut (Abb. 46). Die Anlagerung des HEPES-Moleküls hat hier keine biologische Bedeutung für das  $\delta_2$ -Protein und ist als ein sich aus der Kristallisationsbedingung ergebender Artefakt zu betrachten.

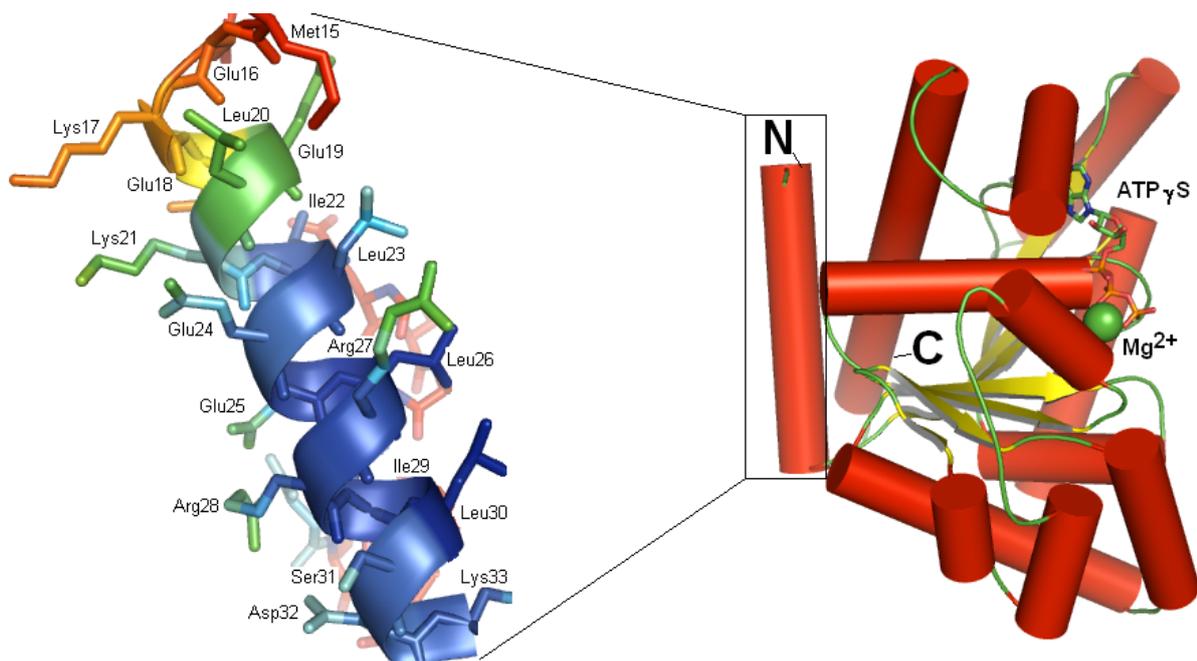
### 3.12 Die N-terminale Helix

Im Gegensatz zu anderen ParA-Proteinen wie Soj von *Bacillus subtilis*, MinD (de Boer *et al.*, 1991) von *E. coli*, ParF von *Salmonella enterica* Plasmid TP228 (Barilla *et al.*, 2005; Barilla, D. und Hayes, F., 2003; Hayes F., 2000) und allen strukturell homologen metallbindenden Hydrolasen wie NifH von *Azotobacter vinelandii*, Ligase (dethiobiotin synthetase) von *E. coli* (Sandalova *et al.*, 1999), die GTPase HypB von *Methanococcus jannaschii* (Gasper *et al.*, 2006) weist das  $\delta_2$  eine zusätzliche Helix im N-Terminus auf (Abb. 47). Die Polypeptidketten von jenen Proteinen fangen mit einem  $\beta$ -Strang an, der zusammen mit dem darauf folgenden P-Loop an der ATP-Bindung beteiligt ist. Dieses fast bei allen Nukleotid-bindenden Enzymen (ATP/GTPasen) gemeinsame Merkmal scheint als eine nützliche strukturelle Eigenschaft hoch konserviert zu sein.



**Abb. 47** Der hoch konservierte N-Terminus von  $\delta_2$  und anderen ParA-homologen Proteinen bzw. ORF's. Die gleichen Reste wurden umrahmt und die ähnlichen Reste koloriert dargestellt. ORF von *Clostridium difficile* (Spigaglia, P., 2000) und die vermeintliche ATPase von *Enterococcus faecalis* (Schwarz *et al.*, 2001) stellen fast identische Proteine dar. Der Aminosäuresequenz-Vergleich wurde mit dem Programm BLAST durchgeführt und mit BioEdit (Hall, T.A., 1999).

Sowohl der Primärsequenz als auch der Struktur-Vergleich von ParA-Proteinen zeigen, dass  $\delta_2$  zu einer Subgruppe der ParA-Familie angehört. Betrachtet man den Primärsequenz-Vergleich, so kann man feststellen, dass  $\delta_2$  mit den strukturell noch nicht bekannten ParA-Proteinen von pathogenen Mikroorganismen wie *Clostridium difficile*, *Bacillus anthracis*, *Borelia burgdorferi* und *Enterococcus faecalis* nahe verwandt ist. Sogar die vermeintliche ATPase des multiresistenten Plasmids pRE25 aus *Enterococcus faecalis* und das ORF von *Clostridium perfringens* kodieren für ein fast gleiches Protein (Abb. 47).



**Abb. 48** Übersicht der N-terminalen AS-Reste von Helix 1 (links) und das Zylindermodell des Proteinrückgrats von  $\delta$  im Komplex mit ATP $\gamma$ S (rechts). Die Kolorierung der N-terminalen Reste richtet sich nach der Temperaturfaktorverteilung. Die am Anfang der Polypeptidkette gelegenen Aminosäuren (Met15, Glu16 und Lys17) sind aufgrund ihrer höheren B-Werte in rot bis orangefarben koloriert, während die restlichen Reste der Helix mit relativ niedrigeren B-Werten in blau bis hellblau illustriert sind.

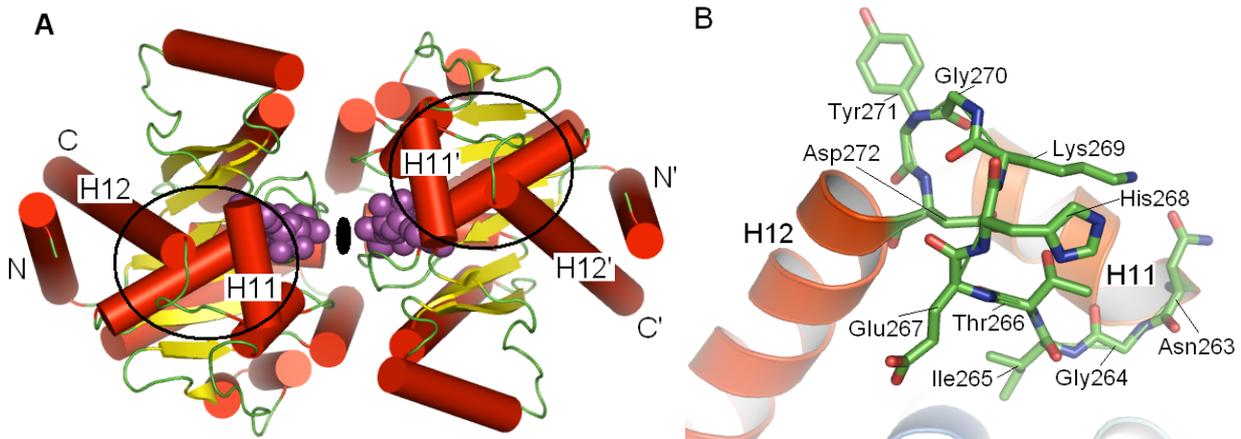
Auch für die strukturell noch nicht bekannten ParA-homologen Proteine konnte kein möglicher Hinweis auf eine bestimmte Funktion gefunden werden. Da für  $\delta_2$  durch zell-biologische Studien nachgewiesen wurde, dass es zusammen mit dem DNA-bindenden ParB-analogen  $\omega$ -Repressor an der Plasmidverteilung beteiligt ist, könnten Deletionstudien an den Resten dieser Helix eine mögliche biologische Funktion aufklären. In Abb. 48 werden die Aminosäurereste dieser Helix in ihrer genauen Lage dargestellt. Die Lage der Reste zeigt, dass Aminosäuren Lys17, Lys21, Glu24, Glu25, Arg28, Ser31 Lösungsmittel zugewandt sind, was auf ihre hydrophilen Eigenschaften zurückzuführen ist, während Met15, Ile22, Leu23, Leu26, Ile29 und Leu30 dem Lösungsmittel abgewandt sind.

### 3.13 C-terminales Helix-Turn-Helix Motiv

Im C-terminalen Bereich der Polypeptidkette von  $\delta_2$  lassen sich zwei unmittelbar aufeinander folgende Helices (H11 und H12) mit einer dazwischen geschalteten Windung (*turn*), ähnlich einer Schleife, erkennen. Die Existenz dieser beiden C-terminalen Helices und des Schleifen-Bereiches (Turn / Loop) sind als Hinweise auf ein Helix-Turn-Helix Motiv (HTH) oder Helix-Loop-Helix Motiv (HLH) ähnliches Motiv in der  $\delta_2$ -Kristallstruktur zu betrachten, welche durch die Temperaturfaktorverteilung und die Eigenschaft und Verteilung der für die HTH-Motive üblichen AS-Reste unterstützt wird. Obwohl die in der Proteinstruktur-Datenbank durchgeführte Suche nach einer möglichen konservierten DNA-Binde-Domäne der  $\delta_2$ -Sekundärstruktur zu keinem Ergebnis geführt hat, konnte die Existenz von einem HTH-Motiv oder HLH-Motiv nicht völlig ausgeschlossen werden. Beide Motive sind typisch für DNA-bindende Proteine. Während im HTH-Motiv die dreidimensionale Struktur unter den Prokaryonten als auch Eukaryonten streng konserviert ist, zeigen HLH-Motive keine signifikanten Sequenzmerkmale, sind jedoch auch aufgrund ihres strukturellen Aufbaus als solche zu klassifizieren. Oft ist der Schleifenbereich in HLH-Motiven an einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung beteiligt (Yap *et al.*, 1999), was für den Schleifenbereich des vermeintlichen HLH-Motivs von  $\delta_2$  nicht zutrifft. Zwar sind einige AS-Reste dieses Bereiches (Lys252 und Ser261 von H11 und Tyr279 von H12) an der ATP-Bindung beteiligt, es wird jedoch eine direkte Bindung durch Ser51 zum Metallion gewährleistet, die sich im P-Loop zwischen Helix 1 und Helix 2 befindet.

In der Regel werden die erste Helix eines HTH-Motivs von 7 Resten, die Schleife von 4 und die zweite Helix von 9 AS-Resten gebildet. Letztere ist das DNA-erkennende Sekundärstrukturmerkmal. Der bei HTH-Motiven konservierte Rest 9 muss immer ein Glycin oder ein Lysin sein, in den Helices sind Prolinreste unwahrscheinlich (Branden und Tooze, 1991).

In der Sekundärstruktur von  $\delta_2$  könnten Helix 11 (Ser254-N263) und Helix 12 (D272-Lys297) zusammen mit der dazwischen befindlichen Schleife (Gly264-Tyr271) dieses Motiv darstellen. Die für die Flexibilität eines Molekülbereiches herangezogene Temperaturfaktor-Verteilung zeigt (Kap. 3.10 Abb. 41), dass diese Werte im Schlaufenbereich höher sind als in der letzten Helix (H12). Eine Interpretation dieses Bereiches als HTH-Motiv ist mit Vorsicht zu genießen, da die Länge des Loop-Bereichs von  $\delta_2$  (7 Reste) sich von der Länge der HTH-Motive (4 Reste) unterscheidet (Abb. 49). Im Schlaufenbereich sind zwei Glyzine und ein Lysin (Gly264, Lys269 und Gly270) vorhanden, was für ein HTH-Motiv typisch ist. Dennoch wird die mögliche Flexibilität in diesem Bereich durch die voluminösen Seitenketten von Lys268 und His267 der Schleife stark gebremst.

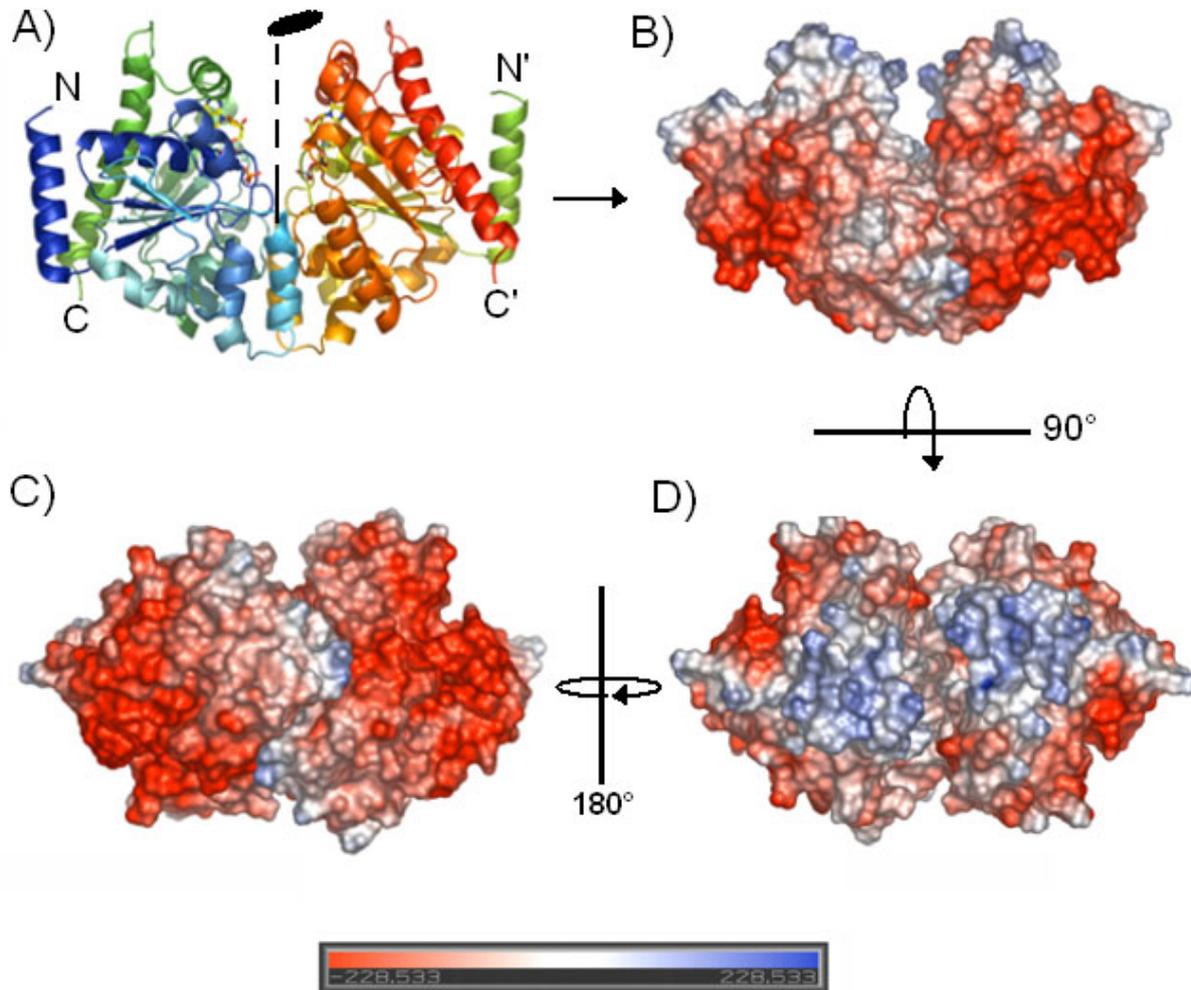


**Abb. 49** Das mögliche Helix-Turn-Helix-Motiv im C-terminalen Ende von  $\delta_2$ . **A)** Übersicht der Dimer  $\delta$ -Struktur, dargestellt als Zylindermodell. ATP $\gamma$ S wurde als violettes CPK-Modell illustriert und die Lage des HTH-Motivs (H11 und H12) wurde durch schwarze Kreise eingezeichnet. **B)** Darstellung der im Loop-Bereich lokalisierten Aminosäurereste und ihrer Seitenketten.

### 3.14 Das Oberflächenpotential

Die elektrische Ladungsverteilung der Moleküloberfläche von Dimer- $\delta_2$  wurde mit dem Programm *Swiss-Deepviewer* (Guex, N. und Peitsch, M.C. 1997) errechnet und ist in Abb. 50 dargestellt. Die Ladungsverteilung an der Oberfläche des Moleküls lässt kein auffälliges Merkmal erkennen, wenn es wie in Abb. 50-B von der Vorderansicht betrachtet wird. Die 90°-Drehung des Moleküls um die horizontale Achse zeigt jedoch, dass  $\delta_2$  eine überwiegend positiv geladene Oberkante aufweist, die sich unmittelbar um die „V“ ähnliche Öffnung bildet (Abb. 50-D). Wird das in Abb. 50-D dargestellte  $\delta_2$  um die vertikale Achse 180° gedreht, so wird die überwiegend negativ geladene Unterkante des Moleküls sichtbar (Abb. 50-C).

Diese deutlich erkennbare Bipolarität ist ein weiterer Hinweis für die Interaktion des  $\delta_2$ -Proteins mit dem ParB-analogen  $\omega_2$ -Protein, welches auch durch biochemische Analysen mittels ATPase-Assay (Kap. 3.1.5), DLS (3.1.6) und Sedimentation (3.1.7) sowie Elektronenmikroskopie (3.2) unterstützt wird. Das  $\omega_2$ -Protein bindet mit seinen überwiegend positiv geladenen Seiten an die *parS*-DNA, während die überwiegend negativ geladene N-terminale Seite (Abb. 50) für eine mögliche Interaktion mit dem  $\delta_2$ -Protein frei steht. Andererseits ist eine mögliche Interaktion des  $\delta_2$ -Proteins direkt mit der DNA nicht völlig auszuschließen. Die überwiegend positiv geladene Seite des  $\delta_2$ -Moleküls an der Oberkante der Kluft zwischen beiden Monomeren könnte die Affinität des Proteins auch zur DNA verstärken. Sowohl das in Kap. 3.10 beschriebene C-terminale HTH/HLH-Motiv des  $\delta_2$ -Proteins als auch die von dem Kooperationspartner (F. Pratto in Madrid) durchgeführten Gel-Shift-Assays (s. Anhang Kap. 7 Abb. III) weisen auf eine mögliche direkte Interaktion des  $\delta_2$ -Proteins mit der DNA hin.



**Abb. 50** Darstellung des elektrostatischen Oberflächenpotentials des Komplexes  $(\delta\text{-ATP}\gamma\text{S})_2$  (B, C und D). **A)** Vorderansicht des Bändermodells der Raumstruktur, die C<sub>2</sub>-Symmetrieachse ist als unterbrochene Linie dargestellt. **B)** Elektrostatisches Potential der Vorderansicht wie in A. Die „V“-ähnliche Kluft zwischen beiden Monomeren ist leicht zu erkennen. **C)** Ansicht von der Unterseite. **D)** Perspektive von oben. Die Oberfläche wurde mit dem Programm *Swiss-Deepviewer* berechnet (Guex, N. und Peitsch, M.C. 1997). Positive Oberflächenladung in blau (Maximalwert: 228 kT/e), negatives Potential in rot (-228 kT/e). Die gebogenen Pfeile stellen die jeweilige Drehung um die horizontale Achse dar.

### 3.15 Vergleich der homologen Strukturen

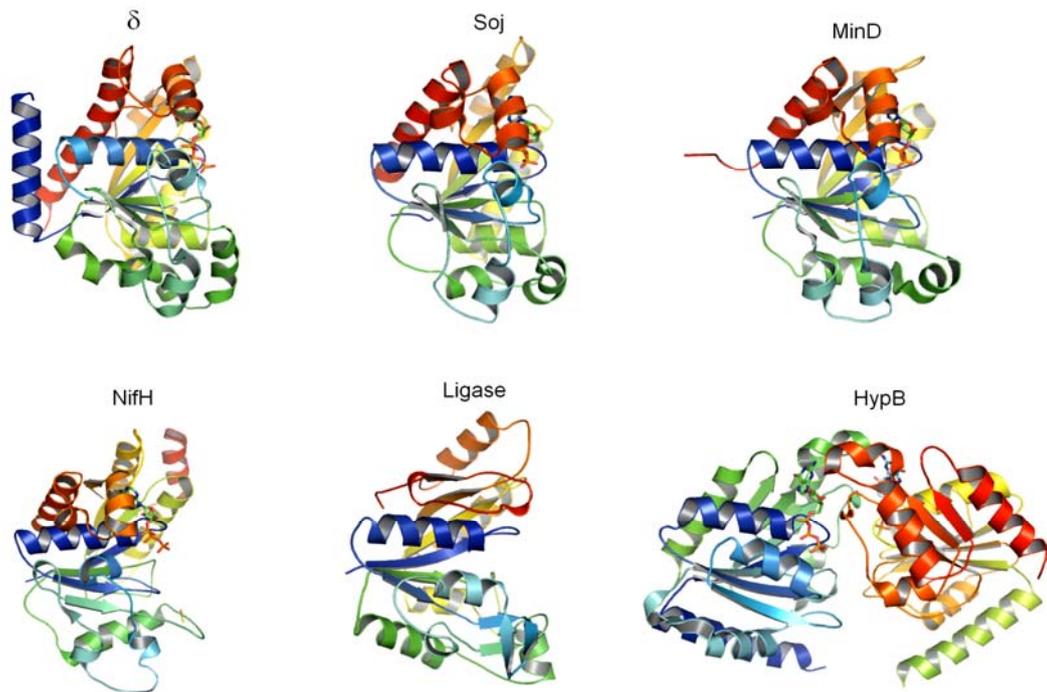
Der Vergleich der Kristallstruktur von  $\delta_2$  zu bereits bekannten homologen Strukturen in der Protein-Datenbank wurde mit dem DALI-Server (Holm und Sander, 1993; Holm L. und Park J., 2000) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Suche nach strukturell ähnlichen Proteinen in der PDB-Datenbank (RCSB) sind in der Tabelle 13 ausgeführt. Der Z-Faktor stellt einen Gütefaktor der strukturellen Ähnlichkeit zweier Proteinstrukturen und der r.m.s.d-Faktor deren mittlere Abweichung der kleinsten Fehlerquadrate (englisch: *root mean square deviation*) dar.

**Tabelle 13.** Übersicht des Struktur-Vergleichs von  $\delta_2$  mit bereits strukturell bekannten Proteinen, durchgeführt mit dem Programm DALI Vers. 2.0., [N]: Anzahl überlagerter Reste.

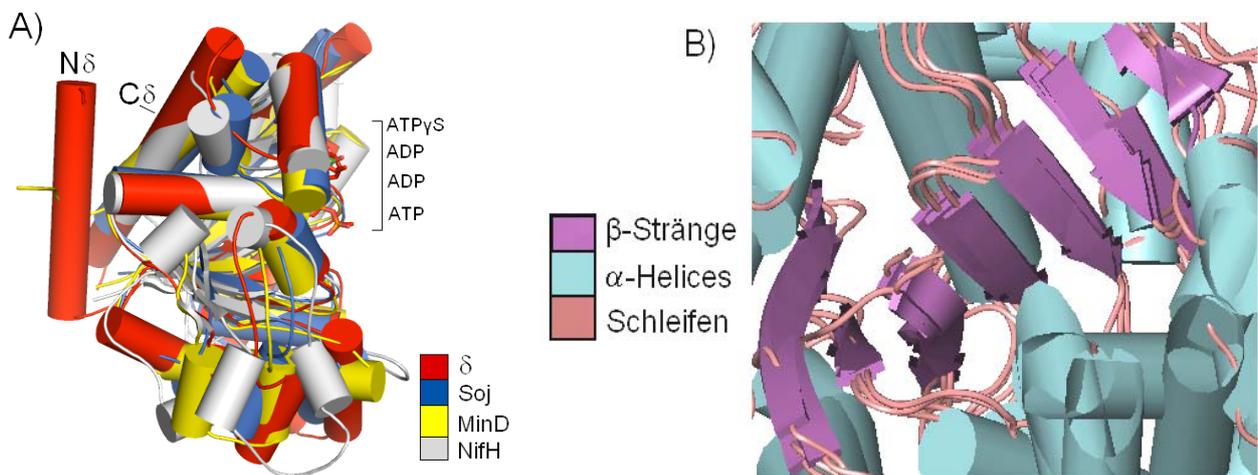
Protein	PDB-Eintrag	Z-Faktor	r.m.s.d [Å]	Ident. [%]	[N]
Soj (ParA)	2Bej	28.4	2.1	24	245
NifH (Nitrogenase Eisenprotein)	1N2C_H	19.7	3.0	13	224
MinD (ParA Zellteilungsregulator)	1hyq	19.5	3.1	17	218
Ligase ( <i>dethiobiotin synthase</i> )	1byi	11.5	3.8	10	191
HypB Hydrolase (GTP-bindendes Protein)	2hf9	11.2	3.4	12	171
Srp-Signal recognition protein	1ng1	9.8	3.2	13	165
RNA-binding protein	1efc	9.3	3.7	9	155
Human RND1-GTP-bindendes Protein	2cls	8.6	3.2	11	137
Human ADP-Ribosylierungs-Faktor	1hur	8.6	3.6	6	154
Adenylatkinase (ATP/AMP phosphotransferase)	1nks	7.8	3.3	12	147

Das Suchergebnis zeigte, dass das  $\delta_2$ -Protein eine enge strukturelle Verwandtschaft zum DNA-Segregationsprotein Soj von *T. thermophilus* (Leonard *et al.*, 2005) mit einem höchsten Z-Score von 28.4, zum Zellteilungsregulator MinD von *A. fulgidus* (Cordell *et al.*, 2001) mit einem Z-Score von 19.7 und zum Nitrogenase Eisenprotein NifH (Georgiadis *et al.*, 1992; Schindelin *et al.*, 1997) mit einem Z-Score von 19.5 aufweist.

Die nahe verwandten Strukturen sind in Abb. 51 dargestellt. Die Sekundärstrukturelemente der jeweiligen Proteine wurden in gleicher Farbe abgebildet, um den Vergleich besser darzustellen. Betrachtet man die ersten drei verwandten Strukturen Soj, MinD und NifH, so stellt man fest, dass Soj und MinD dem  $\delta_2$ -Protein in ihrer Faltung sehr ähnlich sind und sich von den übrigen drei, NifH, Ligase und HypB deutlich unterscheiden. Die letzten zwei Proteine, Ligase und HypB weisen enorme Unterschiede auf, werden jedoch vom Strukturvergleichsprogramm DALI als relevant ähnliche Strukturen erfasst, bzw. identifiziert. Die relativ niedrigeren Z-Faktoren von 11.5 bzw. 11.2 heben diese Unterschiede hervor. In den nächsten Kapiteln werden daher die strukturell sehr ähnlichen Proteine ausführlicher beschrieben.



**Abb. 51** Vergleich von  $\delta$ -ATP $\gamma$ S zu strukturell homologen Proteinen, Soj-ADP von *T. thermophilus* (2bej), MinD-ADP von *Pyrococcus horikoshii* (1ION) (Sakai *et al.*, 2001), NifH-ATP (Del-L127) (2c8v) von *Azobacter vinelandii*, (Sen *et al.*, 2006) Ligase-dethiobiotin-synthase von *E. coli* (1byi) (Sadalova *et al.*, 1999) und HypB in Homodimer-Form (2hf9) von *Methanocaldococcus jannaschii* (Gasper *et al.*, 2006).



**Abb. 52** Superposition von  $\delta$ -ATP $\gamma$ S (rot) mit anderen ParA-homologen Proteinen. **A)** Das DNA-Segregations Protein Soj-ADP (blau) von *T. thermophilus*, der Zellteilungsregulator MinD-ADP (gelb) von *Pyrococcus horikoshii* und das Nitrogenase Eisenprotein NifH-ATP (grau) von *Azobacter vinelandii*. Die  $\alpha$ -Helices werden als Zylindermodelle und die  $\beta$ -Stränge als Bändermodelle dargestellt. **B)** Um die Überlagerung aller vier Proteine darzustellen, wurden die jeweiligen Sekundärstrukturelemente gleich gefärbt. Besonders die exakte Überlagerung im zentralen Kernbereich aller vier Polypeptidketten, wo sich die  $\beta$ -Stränge befinden, ist zu beachten.

Um einen besseren Vergleich der vier Strukturen ( $\delta$ , Soj, MinD und NifH) zu ermöglichen, wurden diese mittels des Programms PYMOL (DeLano Scientific) überlagert. Die Superposition aller vier Strukturen ist in Abb. 52 dargestellt. An der Superposition lässt sich erkennen, dass diese sich in ihren  $\beta$ -Strängen genau überlagern (Abb. 52 B), während sie sich in ihrer  $\alpha$ -Helix-Verteilung unterscheiden (Abb. 52 A).

**Tabelle 14** Konservierte AS-Reste der vier ParA-homologen Proteine  $\delta_2$ , Soj, MinD und dem Nitrogenase Eisenprotein NifH, die zum Nukleotid unmittelbare Wasserstoffbrücken bilden (**Fettdruck**). Über Wassermoleküle hergestellte Kontakte wurden in Normaldruck belassen. In die Tabelle wurden auch an der Koordination von  $Mg^{2+}$  beteiligte AS aufgenommen (durch Unterstriche markiert). Die PDB-Einträge werden in Klammern erwähnt.

$\delta$ -ATP $\gamma$ S	Soj-ADP (2Bej)	MinD-ADP (1ion)	NifH-ATP (2c8v)	Ligand
<b>Ser51</b>	—	—	<b>Ser16</b>	$\alpha$ -P
<b>Gly49</b>	<b>Thr22</b>	<b>Thr18</b>	<b>Thr17</b>	$\alpha$ -P
<b>Lys52</b>	Leu212	<b>Gly15</b>	<b>Gly14</b>	$\alpha$ -P
Asp74	<b>Gly17</b>	<b>Gly13</b>	<b>Gly14</b>	$\beta$ -P
<b>Lys50</b>	<b>Val18</b>	<b>Thr14</b>	<b>Lys15</b>	$\beta$ -P
<b>Gly47</b>	<b>Gly19</b>	<b>Gly15</b>	—	$\beta$ -P
<b>Val48</b>	<b>Lys20</b>	<b>Lly16</b>	—	$\beta$ -P
<b>Ser51</b>	Thr21	<b>Thr17</b>	<b>Ser16</b>	$\beta$ -P
<b>Lys50</b>	—	—	<b>Lys15</b>	$\gamma$ -P
Asp74	—	—	<b>Gly12</b>	$\gamma$ -P
Thr78	—	—	<b>Lys41</b>	$\gamma$ -P
<b>Ser51</b>	—	—	—	$\gamma$ -P
<b><u>Ser51</u></b>	<b><u>Thr21</u></b>	<b><u>Thr17</u></b>	<b><u>Ser16</u></b>	<b><u>Mg<sup>2+</sup></u></b>
—	<u>Asn48</u>	<u>Asn45</u>	<u>Asp39</u>	<u>Mg<sup>2+</sup></u>
<u>Asp161</u>	<u>Asp118</u>	<u>Asp118</u>	<u>Asp125</u>	<u>Mg<sup>2+</sup></u>
<u>Thr162</u>	<u>Pro120</u>	<u>Cys119</u>	—	<u>Mg<sup>2+</sup></u>
<b>Ser261</b>	Leu212	<b>Thr207</b>	<b>Glu221</b>	<b>Ribose</b>
Tyr220	—	<b>Arg172</b>	—	<b>Ribose</b>
<b>Lys252</b>	<b>Pro207</b>	<b>Pro198</b>	<b>Gln236</b>	<b>Adenosin</b>
<b>Tyr279</b>	Arg208	<b>Asp200</b>	<b>Asn185</b>	<b>Adenosin</b>
<b>Ser254</b>	—	<b>Asn171</b>	<b>Tyr240</b>	<b>Adenosin</b>
—	—	—	<b>Pro212</b>	<b>Adenosin</b>
—	—	—	<b>Gln218</b>	<b>Adenosin</b>

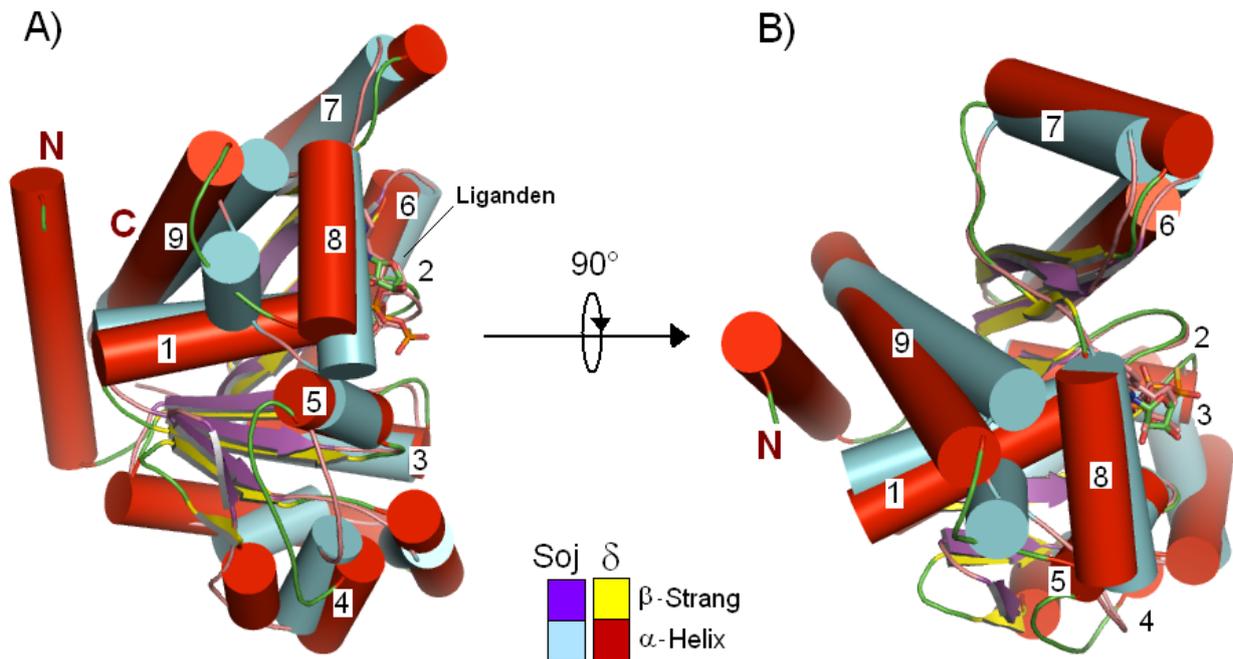
Die gemeinsamen Reste der an der ADP/ATP-Bindung beteiligten vier Strukturen sind in der Tabelle 14 in einer Übersicht zusammengefasst. Betrachtet man die Verteilung dieser Reste, so stellt man fest, dass die einzelnen Phosphat-Gruppen, Zucker und Basen der Liganden mit den jeweils gleichen oder ähnlichen AS interagieren. Die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphate des ATP $\gamma$ S, das jeweilige Mg<sup>2+</sup>-Ion von  $\delta_2$  und das ATP von NifH werden stets von den gleichen AS attackiert; so greifen z. B. Ser51 von  $\delta_2$  und das entsprechende Ser16 von NifH dieselben Stellen des Liganden an. Die weiteren Reste Gly49, Lys50 und Tyr279 von  $\delta_2$  stellen die äquivalenten Reste für Gly14, Lys15 und Tyr240 von NifH dar. Allen ATP-Bindetaschen der vier Strukturen sind die hoch konservierten Aspartate Asp161 von  $\delta_2$ , Asp118 von Soj, Asp118 von MinD und Asp125 von NifH gemeinsam, die an der Koordinierung des Mg<sup>2+</sup>-Ions beteiligt sind.

Neben den erwähnten Resten üben auch weitere konservierte Aminosäuren, die nicht gleich sondern ähnlich sind, die gleiche Funktion aus. So übernehmen Thr21 und Thr22 von Soj sowie Thr17 und Thr18 von MinD, die gleiche Funktion wie Ser51 von  $\delta_2$  und Ser16 von NifH.

### 3.15.1 Vergleich mit dem Soj-Protein

Als strukturell sehr ähnliches Protein wurde das Soj mit einem ziemlich hohen Z-Score von 28.4 und einem r.m.s.d-Wert von 2.1 Å in der PDB-Datenbank festgestellt. Der niedrige r.m.s.d-Wert und die höhere Sequenzidentität (24 %) hatten anscheinend bei der Bestimmung der Kristallstruktur von  $\delta$  mit molekularer Ersatzmethode eine entscheidende Rolle gespielt. Wenn man diese Werte mit denen von MinD vergleicht, stellt man fest, dass Soj um etwa 30-40 % mehr Ähnlichkeit mit  $\delta$  aufweist als MinD. Die Versuche zur Bestimmung der Struktur mit bekannten Strukturen wie MinD-1hyq (Cordell *et al.*, 2001) und NifH-1N2C (Schindelin *et al.*, 1997) blieben erfolglos. Erst die Struktur von Soj (2Bej) führte zu einem Ergebnis.

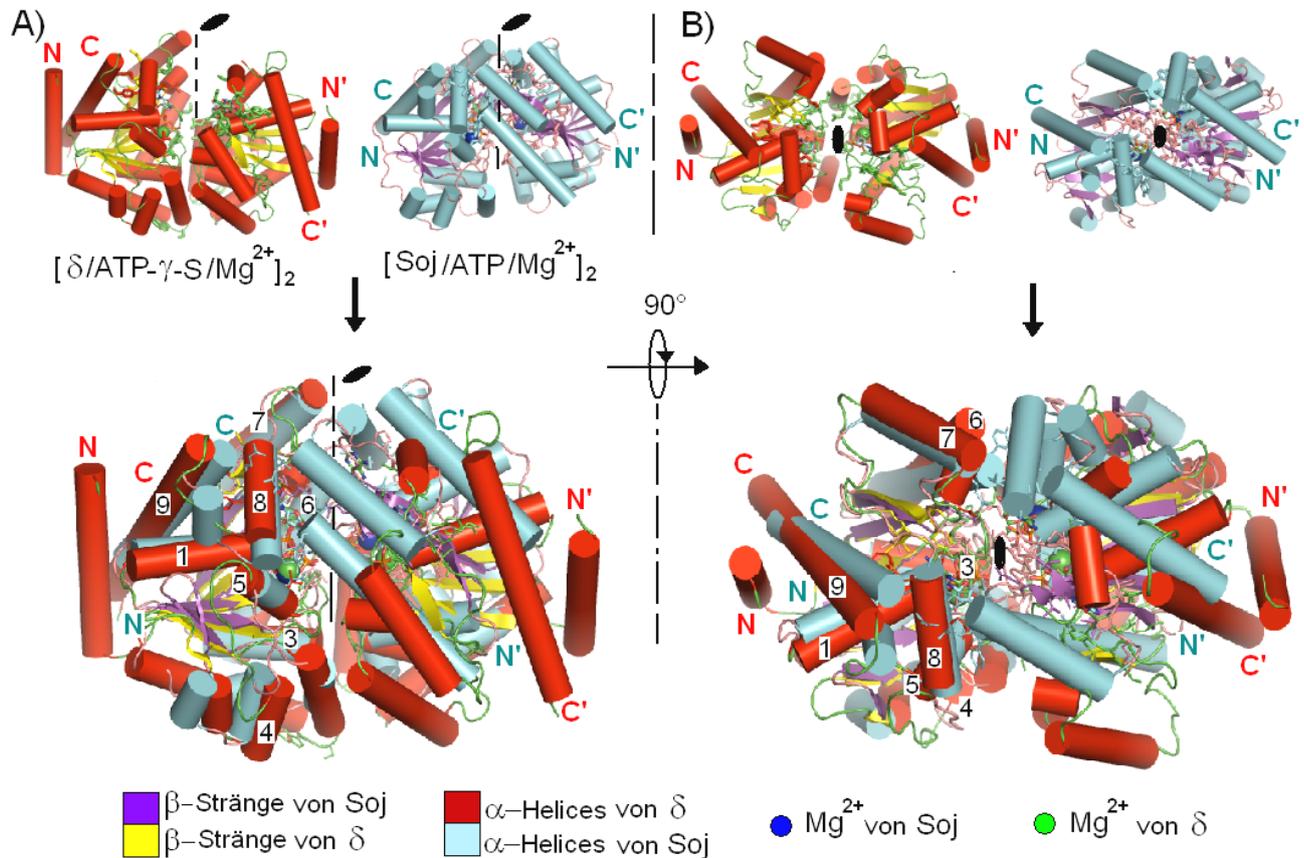
Überlagert man  $\delta$ -Monomer mit Soj-Monomer, stellt man fest, dass die beiden Proteine in vielen Bereichen, nämlich sowohl in dem zentralen sehr stabilen und hoch konservierten  $\beta$ -Strang-Kernen als auch an den überwiegend äußeren Helix-Bereichen (Abb. 53-A-Nr. 1, 4, 5, 6, 7, 8 und 9), zur genauen Superposition kommen.



**Abb. 53** Superposition von  $\delta$ -ATP $\gamma$ S-Komplex mit Soj-ADP(2Bej)-Komplex. Das  $\delta$ -Protein wurde in rot und Soj in hellblau dargestellt, während die Liganden als Stabmodelle dargestellt wurden. **A)** Seitenansicht, **B)** Ansicht von oben. Besonders die exakte Überlagerung der  $\beta$ -Stränge sowie der als Zylindermodell illustrierten Helices ist zu beachten. Die durchnummerierten Bereiche wie 1 ( $\delta$ -H2), 2 (P-Loop), 3 ( $\delta$ -H7), 4 ( $\delta$ -H4), 5 ( $\delta$ -H3), 6 ( $\delta$ -H9), 7 ( $\delta$ -H10), 8 ( $\delta$ -H11) und 9 ( $\delta$ -H12) deuten auf die gut überlagerten Bereichen hin. Da dem Soj die N-terminale Helix total fehlt, steht  $\delta$ -H1 alleine da. Der Z-Score für diese Überlagerung beträgt ca. 28.4 und der r.m.s.d-Wert liegt bei 2.1 Å.

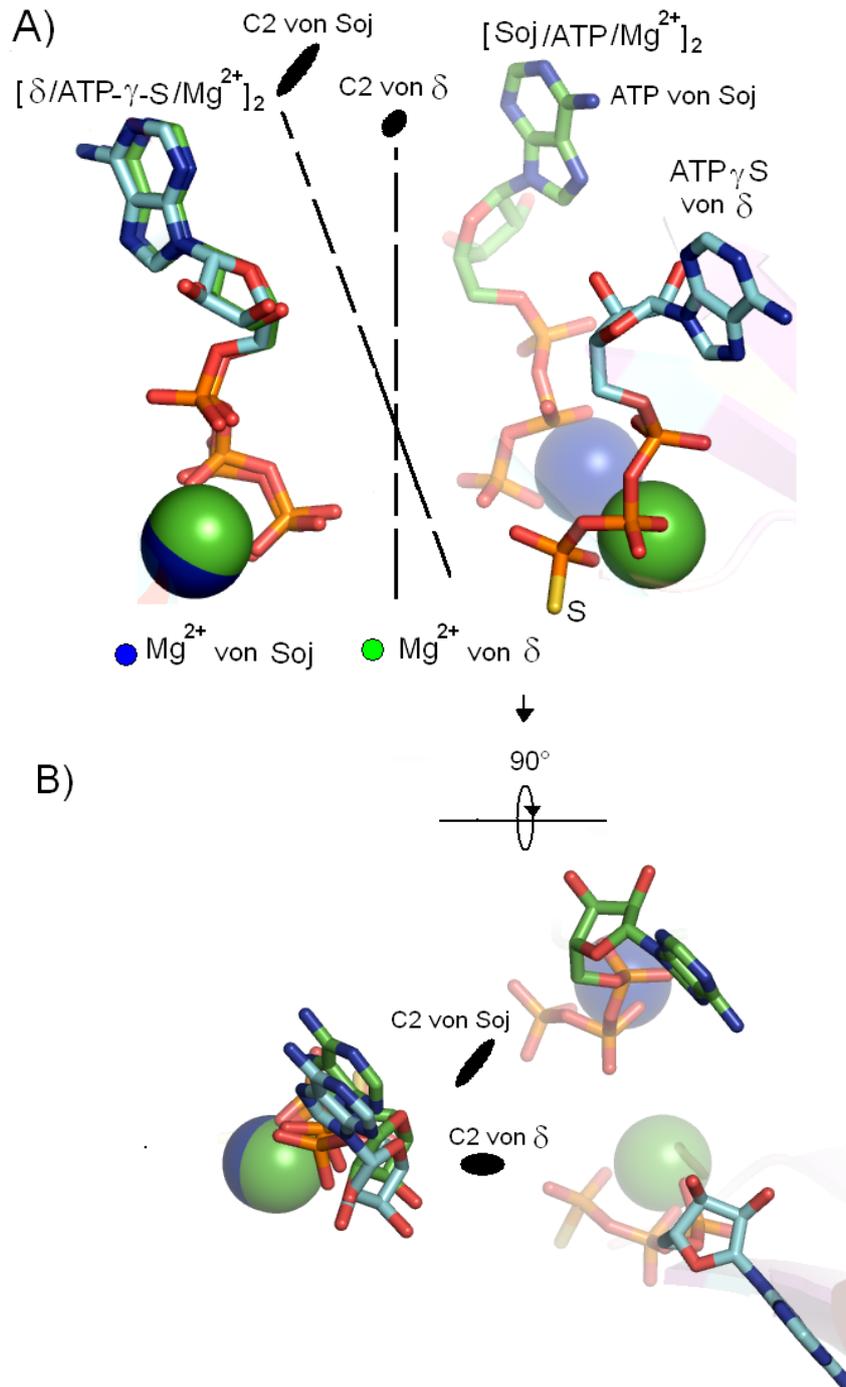
Wie in Abb. 53 gezeigt, kommt es im Bereich von folgenden Helices zu Überlagerungen:  $\delta$ -H2 mit Soj-H1 (1),  $\delta$ -H4 mit Soj-H3 (4),  $\delta$ -H9 mit Soj-H8 (6)  $\delta$ -H10 mit Soj-H9 (7)  $\delta$ -H11 mit Soj-H10 (8) und  $\delta$ -H12 mit Soj-H11 (9). Fast bei allen zentral gelegenen  $\beta$ -Strängen kommt es zur exakten Superposition.

Im Bereich der ATP-Bindetasche (Abb. 55) sowie in der P-Schleife (Abb. 53 A, Markierung 2) kommt es auch zu Überlagerungen, was für eine höhere Konservierung dieses Bereiches spricht. Auch die hoch konservierten Lysine (Lys45 und Lys50 von  $\delta$ ; Lys15 und Lys20 von Soj) des Walker A-Motivs der beiden Proteine sind an der ATP-Bindetasche der fast gleichen Stelle lokalisiert, und tragen zur ATP-Bindung ( $\delta$ -Lys50/Soj-Lys20) und sowie zur Dimerisierung ( $\delta$ -Lys45/Soj-Lys15) enorm bei (s. Kap. 3.15.3).



**Abb. 54** Superposition von  $[\delta/ATP\gamma S/Mg^{2+}]_2$  mit  $[Soj/ATP/Mg^{2+}]_2$  (Pdb-Eintrag: 2Bek). Das  $\delta_2$ - und Soj-Dimer wurden wie in Abb.53 koloriert und dargestellt. Die  $Mg^{2+}$ -Ionen wurden als CPK-Modelle dargestellt. Die zweizählige Symmetrieachse (C2 von  $[\delta/ATP\gamma S/Mg^{2+}]_2$  wurde als schwarze Ellipse eingezeichnet. **A)** Seitenansicht der beiden Dimere, **B)** Ansicht von oben. Besonders die gute Überlagerung der beiden linksstehenden Monomere ist zu beachten. Dagegen sind die rechtsstehenden Monomere unterschiedlich positioniert, was auf eine offene-geschlossene Konformation der beiden Moleküle hindeutet. Die durchnummerierten Bereiche wie 1 ( $\delta$ -H2), 3 ( $\delta$ -H7), 4 ( $\delta$ -H4), 5 ( $\delta$ -H3), 6 ( $\delta$ -H9), 7 ( $\delta$ -H10), 8 ( $\delta$ -H11) und 9 ( $\delta$ -H12) deuten auf die gut überlagerten Bereichen hin. Da dem Soj die N-terminale Helix fehlt, steht  $\delta$ -H1 alleine da.

In den Abbildungen 54 und 55 werden die  $\delta_2$ - und Soj-Dimere (Pdb-Eintrag: 2Bek) in ihrer Superposition dargestellt. Im Vergleich zur Monomer-Monomer-Superposition der beiden Proteine können hier einige Unterschiede besonders erkannt werden. Wie in Abb. 54 A deutlich zu erkennen, dass sich die zwei links-stehenden Monomere der beiden Proteine gut überlagern. Eine räumliche Verschiebung ist jedoch bei den zweiten Monomeren (rechts-stehenden) deutlich zu erkennen. Eine „V“-förmige Kluft, die auf eine offene Konformation des  $\delta_2$ -Proteins hindeutet, lässt sich bei dem Soj-Dimer nicht erkennen, da es sich hierbei um eine geschlossene Konformation des Soj-Proteins handeln könnte. Beide Proteine weisen gleiche Dimerisierungsebene auf, unterscheiden sich jedoch in ihren zweizähligen Symmetrieachsen um ca.  $30^\circ$ . Dieser Unterschied ist deutlich erkennbar, wenn die Positionen der beiden Liganden miteinander verglichen werden (Abb. 55 A und B).



**Abb. 55** Superposition von Liganden der beiden Dimere  $[\delta/\text{ATP}\gamma\text{S}/\text{Mg}^{2+}]_2$  und  $[\text{Soj}/\text{ATP}/\text{Mg}^{2+}]_2$  (2Bek). Die  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen wurden als CPK-Modelle und die Nucleosid-Tri-Phosphate als Stabmodelle dargestellt. Die zweizähligen Symmetrieachsen der beiden Dimere (C2 von  $[\delta/\text{ATP}\gamma\text{S}/\text{Mg}^{2+}]_2$ ) wurden als schwarze Ellipse eingezeichnet. **A)** Seitenansicht, **B)** Ansicht von oben.

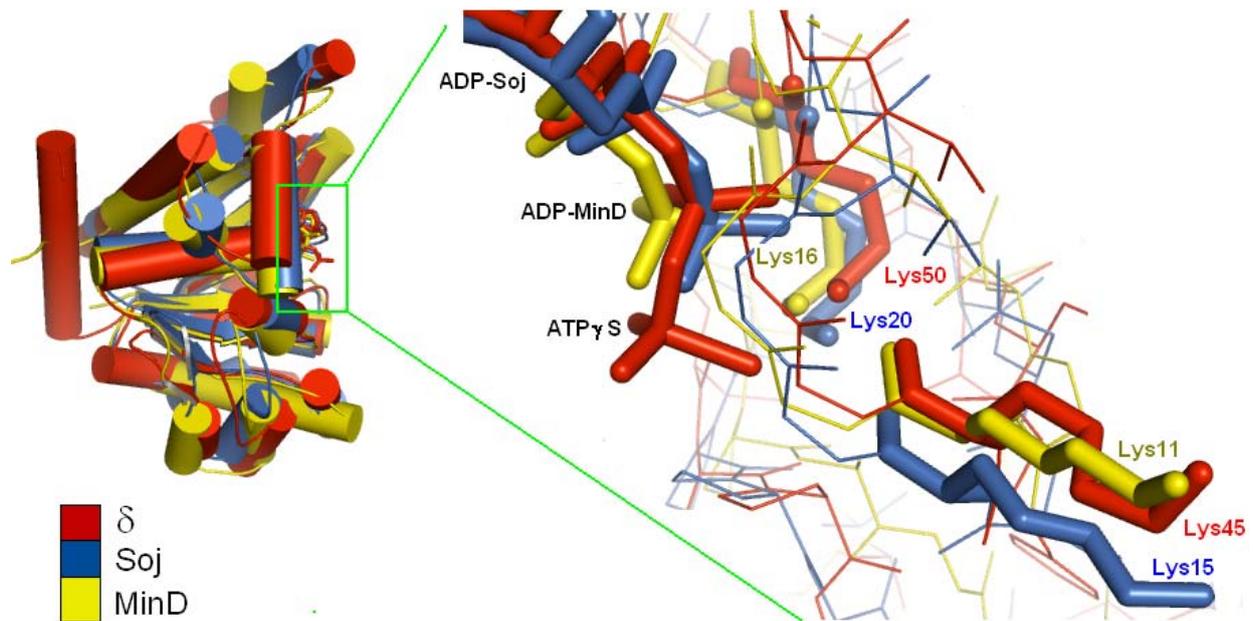
Durch neue Studien wurde nachgewiesen, dass Soj von *Thermus thermophilus* ein ATP-abhängiges „Sandwich“ Dimer bildet, es eine Dimerisierungs-abhängige DNA-Bindungsaktivität aufweist und die ATP-Hydrolyse durch die N-terminalen Reste von Spo0J stimuliert wird (Leonard *et al.*, 2005). Die *in vitro* Versuche zeigen, dass für die Stimulierung der ATP-Hydrolyse nur die

ersten 20 Reste des N-Terminus von Spo0J ausreichen und dabei Arg10 eine entscheidende Rolle spielt (Leonard *et al.*, 2005). Diese mögliche Interaktion zwischen ParA und ParB wurde bereits für die ParA-Familien-Proteine von *Caulobacter crescentus* nachgewiesen. Für ParB von *C. crescentus* wurde gezeigt, dass es für das ParA-Protein als ein Nukleotid-Austauschfaktor fungiert, indem es den rapiden Austausch von ADP für ATP stimuliert (Quisel *et al.*, 1999; Easter und Gober, 2002; Figge *et al.*, 2003). Auch für die weiteren ParA-Familien-Proteine wie ParB vom Plasmid P1 und SopB vom Plasmid F konnte nachgewiesen werden, dass ihre N-terminalen Regionen für die Interaktion mit ParA/SopA als Determinanten fungieren (Radnedge *et al.*, 1998; Figge *et al.*, 2003; Ravin *et al.*, 2003).

### 3.15.2 Vergleich mit dem Zellteilungsregulator MinD

Der Zellteilungsregulator MinD wurde sowohl durch den Primärsequenz-Vergleich als auch durch den Sekundärstruktur-Vergleich als nächst bestes strukturell und funktionell mit  $\delta$  verwandtes Protein identifiziert. Wie in Tabelle 13 erwähnt, ergab die PDB-Datenbank-Suche mit dem DALI-Server (Holm und Sander, 1993; Holm L. und Park J., 2000), dass das MinD (1hyq) (Cordell *et al.*, 2001) trotz geringer Sequenzidentität von 17 % einen relativ höheren Z-Faktor von 19.5 und einen relativ niedrigeren r.m.s.d.-Wert von 3.1Å aufweist. Diese Struktur-Vergleich-Werte deuten auf eine höhere strukturelle Verwandtschaft von MinD und  $\delta$  hin. Wie bei Soj kommt es auch hier überwiegend im Bereich der zentral gelegenen  $\beta$ -Stränge von MinD (S1, S2, S4, S5, S6 und S7) mit den 6 der insgesamt 8  $\beta$ -Stränge des  $\delta$ -Proteins zu Überlagerungen. Wie in Abb. 56 dargestellt, sind auch weitere Sekundärstrukturelemente wie MinD-H1 ( $\alpha$ -Helix 1) mit  $\delta$ -H2,  $\delta$ -H8 mit MinD-H6,  $\delta$ -H9 mit MinD-H7 sowie MinD-H12 und H10 mit  $\delta$ -H11 und H12 zu finden, welche eine genaue Überlappung aufweisen. Trotz dieser höheren Übereinstimmung der Sekundärstrukturteile konnte die Struktur vom  $\delta$ -Protein mit Hilfe der Struktur von MinD nicht bestimmt werden.

Trotz dieser Ähnlichkeit unterscheidet sich MinD von den übrigen Proteinen der ParA-Familie dadurch, dass es aufgrund seiner C-terminalen amphipathischen Helix, welche an die Lipid-Doppelschicht bindet, einer ATP- und membranabhängigen Selbstassoziation ausgesetzt ist (Lutkenhaus und Sundaramoorthy, 2003). Dennoch taucht es in allen bis jetzt veröffentlichten Daten ausschließlich als Monomer auf (Cordell und Löwe, 2001; Hayashi *et al.*, 2001; Sakai *et al.*, 2001), auch wenn es mit nicht-hydrolysierbaren ATP-analogen AMPPCP oder mit ADP co-kristallisiert wurde (Hayashi *et al.*, 2001; Sakai *et al.*, 2001).

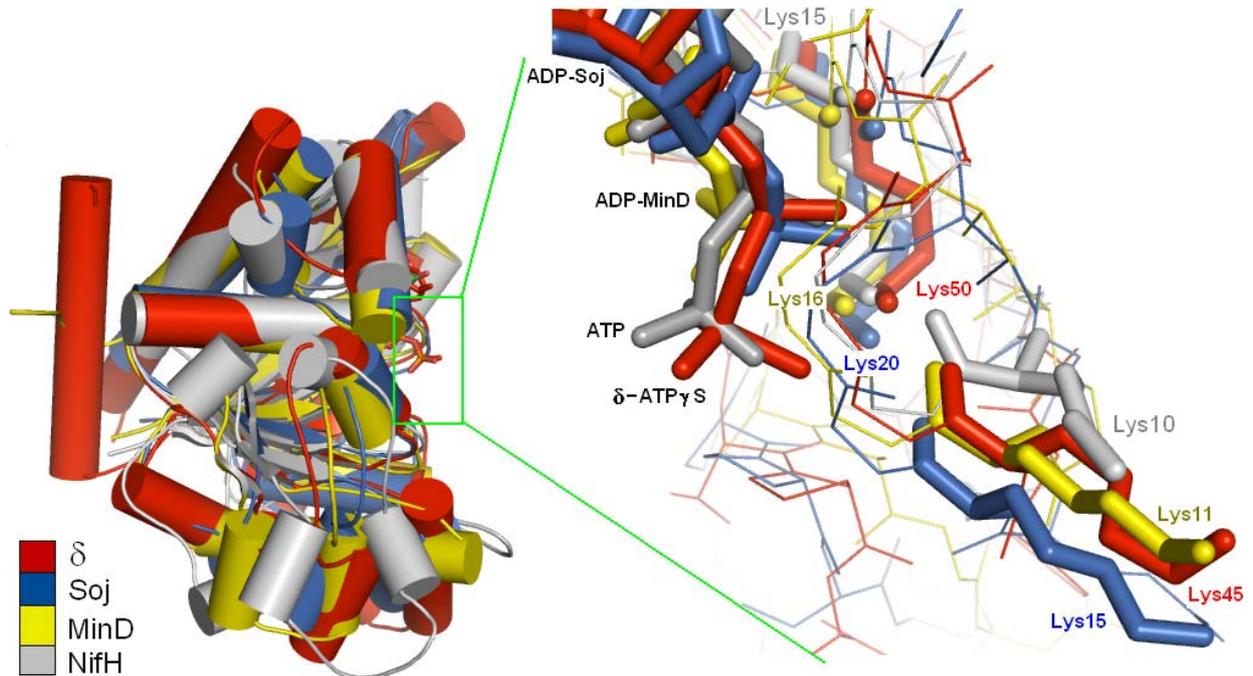


**Abb. 56** Superposition der in der ATP-Bindetasche lokalisierten zwei hoch konservierten Lysine von  $\delta$ -ATP $\gamma$ S (rot), Soj•ADP (blau) und MinD•ADP (gelb).

MinD von *E.coli* reguliert die Selektion der Zellteilungsstelle in Assoziation mit dem Zellteilungsinhibitor MinC und mit dem topologischen Spezifitätsfaktor MinE und weist in der Zelle ein oszillatorisches Merkmal auf (Raskin und de Boer, 1999), ähnlich wie beim Soj-Spo0J-System. Die MinCD-Oszillation scheint abhängig vom MinE zu sein, welches die ATPase-Aktivität von MinD *in vitro* stimuliert (Hu und Lutkenhaus, 2001) - in einer scheinbar analogen Weise zur Spo0J-abhängigen Oszillation von Soj (Quisel *et al.*, 1999). Die Proteine der ParA-Familie inklusive Soj haben keine solchen Helices und assoziieren nicht mit der Membran, sondern es wurde gezeigt, dass sie *in vivo* mit dem Nukleoid dynamisch assoziieren (Marston und Errington, 1999; Quisel *et al.*, 1999; Ebersbach und Gerdes, 2001).

### 3.15.3 Vergleich mit dem Nitrogenase Eisenprotein

Während Soj und MinD als Walker A-Typ ATPasen an der Plasmidverteilung beteiligt sind, ist das Nitrogenase Eisenprotein NifH an dem Elektronentransfer des NifH/FrxC-Systems beteiligt (Schindelin *et al.*, 1997). Dies deutet darauf hin, dass diese Proteine mit dem abweichenden Walker A-Motiv diverse Funktionen ausüben können (Motallebi-Veshareh *et al.*, 1990; de Boer *et al.*, 1991; Koonin *et al.*, 1993). Die Nukleotid-Hydrolyse wird durch die Bildung eines Nukleotid-„Sandwich“-Dimers ausgelöst (Leonard *et al.*, 2005). Obwohl das Proteinerückgrat der Polypeptidketten voneinander abweicht, sind Seitenketten zu finden, die in allen vier Enzymen an vergleichbaren Stellen liegen. In der folgenden Abbildung 57 sind zwei gemeinsame Reste besonders hervorgehoben.



**Abb. 57** Superposition der in der ATP-Bindetasche lokalisierten zwei hoch konservierten Lysine von  $\delta$ -ATP $\gamma$ S (rot) Soj•ADP (blau), MinD•ADP (gelb) und NifH•ATP (grau). Die hoch konservierten Lysine (Lys45 und Lys50) von  $\delta$ -ATP $\gamma$ S, die Lysine (Lys15 und Lys20) von Soj•ADP (PDB-Eintrag: 2BEJ), die Lysine (Lys11 und Lys16) vom Zellteilungsregulator MinD•ADP (PDB-Eintrag: 1ion), die Lysine (Lys10 und Lys15) vom Nitrogenase Eisenprotein NifH•ATP (Del-L127) (PDB-Eintrag: 2c8v) werden in ihrer Lokalisation miteinander verglichen.

Wie in Abb. 57 dargestellt, zeigt der Vergleich der Sekundärstrukturelemente von allen vier Proteinen ( $\delta$ , Soj, MinD und NifH), dass sie sich, während sie sich im Bereich der  $\beta$ -Stränge (S1-S8) exakt überlappen, in äußeren Regionen, wo sich meistens Helices befinden, jedoch voneinander unterscheiden.

Die folgenden Überlagerungen bei Helices konnten beobachtet werden:  $\delta$ -H2 mit NifH-H1 und  $\delta$ -H8 mit NifH-H7 und  $\delta$ -H4-5 mit NifH3-4 und  $\delta$ -H10-11 mit NifH-H8-9. Helix 7 von  $\delta$  überlagert sich zwar mit NifH-H6 an derselben Stelle, jedoch weist  $\delta$ -H7 im Gegensatz zu NifH-H6 durch das „Helix brechende“ Prolin150 einen Knick auf. In Abb. 55 wurden alle acht Lysine mit den Lysinen von  $\delta$  (Lys45 und Lys50) verglichen. Alle acht Lysin-Reste unterscheiden sich kaum in ihrer Lokalisation.

NifH als stabilisierter Komplex mit ADP und als Metallion AIF4(-) (PDB-Eintrag: 1n2c) von *Azotobacter vinelandii* (Schindelin *et al.*, 1997) wurde mit einem Z-Score von 19.5 und einem r.m.s.d.-Wert von 3.0 Å als zweites nahe verwandtes Protein identifiziert (Siehe Tab.13). In der

PDB-Datenbank sind mehrere monomere NifH-Strukturen bekannt, wie z. B. das NifH-Monomer im Komplex mit ATP (PDB-Eintrag: 2c8v) von *Azotobacter vinelandii* (Sen *et al.*, 2006). Diese Struktur wurde zum Vergleich der Sekundärstrukturelemente herangezogen.

Als eine Walker-Typ-ATPase spielt NifH eine entscheidende Rolle bei der biologischen Stickstoff-Fixierung, indem es die Hydrolyse von ATP mit Elektronentransfer koppelt, und damit einen wichtigen Beitrag zum Nukleotid-abhängigen Signal-Transduktions-Mechanismus leistet (Schindelin *et al.*, 1997). Die erste Struktur (1n2c) wurde für einen Komplex zwischen der Fe- und Mo-Fe-Protein-Komponente der Nitrogenase bestimmt, die durch das ADP-AIF<sub>4</sub><sup>-</sup> stabilisiert wurde, das ein Nukleosid-Triphosphat simuliert. Die Struktur ist ein Dimer, das durch den als Redox-Center positionierten ADP-AIF<sub>4</sub><sup>-</sup>-Cluster stabilisiert wird.

### 3.15.4 Die Ligase

Ligase (Dethiobiotin Synthetase) (PDB-Eintrag: 1byi) von *Escherichia coli* (Sandalova *et al.*, 1999) wurde als viertes dem  $\delta_2$ -Protein strukturell verwandtes Protein identifiziert. Das 224 Reste umfassende und als eine Dethiobiotin Synthetase in der zellulären Stoffwechsellenzym-Kaskade beteiligte Protein von *E. coli* weist einen Z-Faktor von 11.5 und einen relativ höheren r.m.s.d-Wert von 3.8 Å auf, während die Sequenzidentität 10 % beträgt. Trotz dieser nicht sehr günstigen Parameter wurde auch dieses Protein als ein strukturell homologes Protein eingestuft. Betrachtet man die Abbildung 51 (Kap. 3.15), dann stellt man fest, dass  $\delta$  und Ligase wie die anderen drei homologen Proteine (Soj, MinD und NifH), in ihren zentralen  $\beta$ -Strang-Positionen, bei einigen Helices wie H2 von  $\delta$  und H1 der Ligase sowie den P-Loops zu Überlagerungen kommen. Trotz der zellbiologisch unterschiedlichen Funktionen der beiden Proteine scheinen im Laufe der Evolution die strukturell robusten Teile konserviert zu sein.

### 3.15.5 HypB

Das Metall- und GTP-bindende Protein HypB (2hf9) von *Methanocaldococcus jannaschii* (Gasper *et al.*, 2006) bildet zusammen mit anderen ParA homologen GTPasen wie der bakteriellen GTPase Ffh des Signalsequenz-Erkennungsproteins Srp (*Signal Recognition Particle*, 1ng1) von *Thermus aquaticus* (Freyman *et al.*, 1999), dem RNA-bindenden Protein (1efc) Elongationsfaktor Tu (EF-Tu) von *E. coli* (Song, H., *et al.*, 1999) und dem Rho ähnlichen GTP-bindenden Protein der humanen RND1 (2cls) (Pike *et al.*, 2006) die zweite Klasse von Proteinen aus, die nicht in die Plasmidverteilung involviert sind.

Auch HypB unterliegt wie Soj und NifH einer Nukleotid-abhängigen Dimerisation, was ein gemeinsames Merkmal der so genannten G-Proteine (GTP-bindende Proteine) ausmacht (Gasper

*et al.*, 2006), während  $\delta$  auch ohne ATP in Lösung als Dimer vorliegt, was auf seine biologische Funktion in der Zelle hindeutet. Die Nukleotide sind meistens in der Dimer-Interaktionsfläche lokalisiert und werden von beiden Untereinheiten gebunden. Ein hoch konserviertes Motiv (ENV / IGNLV / ICP) in der *Switch* II-Region (Walker B) leitet die Nukleotid-Bindung mit der Metallionenbindung weiter. Die Homologie mit dem Nitrogenase Eisenprotein NifH deutet auf ein mechanistisches Modell für die *Switch*-abhängige Inkorporation von einem Metallion in Hydrogenasen (Gasper *et al.*, 2006) hin. Auch bei dem  $\delta_2$ -Protein ist die Koordinierung des Metallions durch die konservierten AS-Reste der Walker B-Region (YDLIIIIDTVPT) gewährleistet, wo Asp161 und Thr162 durch ihre Koordination das  $Mg^{2+}$ -Ion in der ATP-Bindetasche stabilisieren. An der  $Mg^{2+}$ - und Nukleotid-Bindetasche des Proteins EF-Tu von *E. coli* wurde festgestellt, dass die zwei konservierten Wassermoleküle an der Koordinierung des  $Mg^{2+}$ -Ions und der GDP/GTP-Bindung beteiligt sind (Song *et al.*, 1999). In Kap. 3.11.3 werden die an der Koordinierung des  $Mg^{2+}$ -Ions beteiligten zwei Wassermoleküle W93 bzw. W262 von  $\delta$  detailliert beschrieben. Der B-Wert des gebundenen  $Mg^{2+}$ -Ions ( $15.80 \text{ \AA}^2$ ) und der beiden Wassermoleküle ( $17.93 \text{ \AA}^2$  und  $13.62 \text{ \AA}^2$ ) deuten auf eine ziemlich stabile Lokalisation bzw. Koordination des Metallions hin.

### 3.16 Plasmidpartitionierungs-Modell

Basierend auf den strukturellen Erkenntnissen ( $\omega_2$ ,  $\omega_2\Delta N19\cdot parS$  und  $\delta_2$ ), den biochemischen *in vitro* Analysen (Enzymaktivität-Assays, EMSA, DLS, Sedimentation) und zellbiologischen *in vivo* Experimenten (Lokalisation von GFP-Fusion in *B. subtilis* und in *E. coli*) sowie auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen lässt sich folgendes Plasmidpartitionierungs-Modell für das ursprünglich aus dem grampositiven human-pathogenen *Streptococcus pyogenes* isolierte Plasmid pSM19035 mit niedriger Kopienzahl und breitem Wirtsspektrum vorstellen. Da dieses zur *Inc18*-Familie (*incompatibility*) gehörende Plasmid außer dem in dieser Arbeit beschriebenen *par*-System noch über zwei weitere Plasmid-Verteilungssysteme wie Kopien-Kontroll-Mechanismen (CopS) und Toxin-Antitoxin-Systeme ( $\epsilon$ - $\zeta$ ) verfügt, und da das Protein  $\omega_2$  auch bei diesen Systemen als Regulator der Transkription fungiert, indem es durch die Bindung an Promotor-Regionen der jeweiligen Gene ( $P_{copS}$ ,  $P_\delta$  und  $P_\omega$ ) eventuell die Bindung der RNA-Polymerase blockiert, somit auch die Transkription reguliert bzw. hemmt (Weihofen *et al.*, 2006; Dmowski *et al.*, 2006; Meinhart *et al.*, 2003; del Solar *et al.*, 2002; Camacho *et al.*, 2002; de la Hoz *et al.*, 2000; Murayama *et al.*, 2001; Ceglowski und Alonso, 1994; Ceglowski *et al.*, 1993a-b; Brantl *et al.*, 1990) und auf der anderen Seite als ParB-homologe Protein in das *par*-System verwickelt ist (Dmowski *et al.*, 2006; Weihofen *et al.*, 2006; vorliegende Arbeit), ist es notwendig, auch die möglichen Einflüsse der anderen Systeme (TA- und CopS-System) zu berücksichtigen. Ein gesamtes Modell, das auch andere Plasmidverteilungssysteme

von pSM19035 in Betracht zieht, würde jedoch den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Deshalb werden hier nur Vermutungen aufgestellt, die sich aus den experimentellen Daten ableiten lassen. Demnach lässt sich die Verteilung vom pSM19035 in einem breiten Wirtsspektrum dadurch erklären, dass das Plasmid im Laufe der Evolution unterschiedliche genetische Strategien entwickelt hat, um auf Kopienzahl-Fluktuationen zu reagieren bzw. seine Stabilität innerhalb der Wirtszelle zu sichern (Ceglowski und Alonso, 1994; Ceglowski *et al.*, 1993a-b).

Im Gegensatz zum Plasmid-kodierten Kopie-Kontrollmechanismus (CopS-Region) und zum *par*-System ( $\delta_2$ - $\omega_2$ -*parS*) stellt die Anwesenheit des TA-Systems ( $\epsilon_2\zeta_2$ ) eine besondere lebensbedrohliche Situation für den Wirtsorganismus dar. Da die zufällige Erhaltung solcher extrachromosomalen mobilen Elemente für einen Wirtsorganismus eine besondere Stellung einnehmen, d. h. wenn sie einmal in den Wirt aufgenommen werden, scheint ihr Verlust nicht mehr möglich zu sein, ist anzunehmen, dass die *low copy number* und *broad host range* Plasmide solche aggressiven Plasmid-Erhaltungs-Systeme (bzw. Gene) evolutiv nach den anderen Plasmid-Systemen erworben haben sollten. Daher: wenn bei solchen Plasmiden eines der beiden Systeme oder beide versagen (Kopiekontroll-System und *par*-System), sichert das Toxin-Antitoxin-System immer noch die Erhaltung der Plasmide innerhalb der Wirtspopulation. Da das funktionell ParB-homologes Protein  $\omega_2$  die Expression aller drei Mechanismen unter seiner Kontrolle hat, sollte auch in einem möglichen Modellentwurf zum *par*-System die zentrale Rolle dieses Schlüsselproteins in Betracht gezogen werden.

### 3.16.1 Modellierung des *par*-Systems ( $\delta_2$ - $\omega_2$ -*parS*)

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- 1-  $\delta_2$ -Protein scheint ohne einen Nukleotid-Co-Faktor in Lösung Dimere zu formen (GPC und Crosslinking mit Glutardialdehyd),
- 2-  $\delta_2$  ist eine relativ schwache ATPase, welche ihre Aktivität jedoch in Gegenwart von *parS*-DNA verdoppelt und in Gegenwart vom  $\omega$ -Protein sogar bis zum Sechsfachen steigert (ATPase-Assays),
- 3- In Gegenwart von  $\omega_2$ , *parS*-DNA und ATP oder ATP $\gamma$ S formt  $\delta_2$  s. g. Nukleoproteinfilamente (DLS, Sedimentation und EM). Die Polymerisierung scheint ein dynamischer Prozess zu sein, denn diese Filamente werden nach ca. 2 h wieder abgebaut, wenn sie in Gegenwart von ATP gebildet wurden. Wird dem Reaktionsgemisch jedoch statt ATP ATP $\gamma$ S zugefügt, bilden sich die

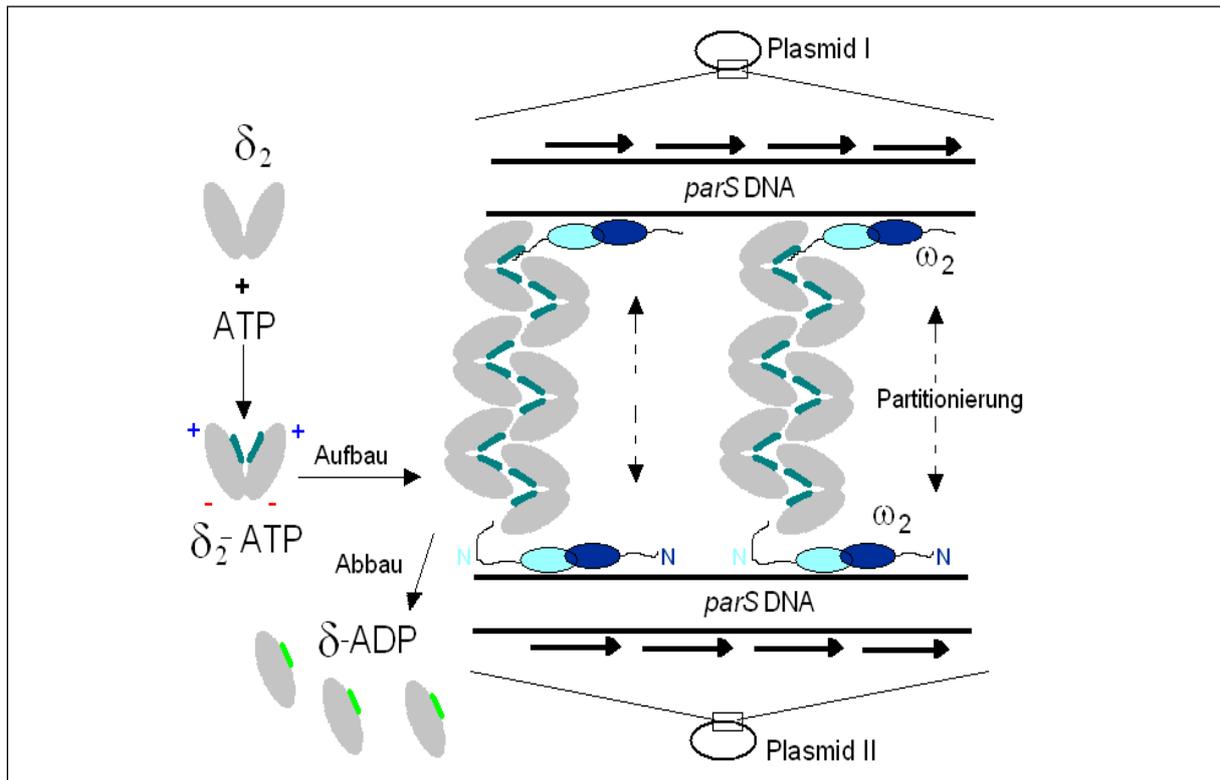
Filamente genau so gut wie mit ATP, bleiben jedoch stabil und lassen sich nach vielen Stunden und sogar Tagen immer noch als solche nachweisen,

4- In Gegenwart von  $\omega_2$  oszilliert  $\delta_2$  von der Mitte der Zelle zu den Zellpolen ( $\delta_2$ -GFP-Fusion),

5- Die Kristallstruktur des  $\delta_2$ •ATP $\gamma$ S-Komplexes zeigt, dass es ein „V“ förmiges Dimer ist, das zwischen den Monomeren eine Kluft aufweist. Die Ladungsverteilung der einzelnen Atome in der Oberfläche des Homodimers zeigt, dass es eine überwiegend positiv geladene Oberseite und eine negativ geladene Unterseite aufweist.

Bei den anderen homologen *par*-Systemen, wie dem chromosomalen Soj-Spo0J von *B. subtilis* und MinDE von *E. coli* (Quisel *et al.*, 1999; Leonard *et al.*, 2005; Hu und Lutkenhaus, 1999), oszilliert das ParA-Protein Soj in Gegenwart von Spo0J (ParB) von der Mitte der Zelle zu den Zellpolen, während MinD (ParA) in Gegenwart von MinE (ParB) von einem Pol zum anderen schwingt (Marston, A.L., und Errington, J., 1999; Raskin, D.M., und de Boer, P.A., 1999). Als ATPasen sind die ParA-Proteine ( $\delta_2$ , Soj und MinD) in diesem Plasmid-Verteilungs-System die treibende Kraft, und alle drei Proteine weisen höhere strukturelle Gemeinsamkeiten auf (Kap. 3.15).

Im Gegensatz zu Soj und MinD formt  $\delta$  in Lösung Dimere, sogar ohne einen Nukleotid-Co-Faktor. Jedoch kommen Soj und MinD in Abwesenheit von ATP als Monomere vor und dimerisieren nur in Gegenwart von ATP (vorliegende Arbeit; Leonard *et al.*, 2005a; Cordell und Löwe, 2001; Sakai *et al.*, 2001; Hayashi *et al.*, 2001). Bei allen drei Strukturen befindet sich ATP in der Dimer-Kontaktfläche, und die Dimere müssten sich trennen, um das hydrolysierte Nukleotid (ADP) freizulassen. Sowohl im *par*-System ( $\delta_2$ - $\omega_2$ -*parS*) vom Plasmid pSM19035 als auch im Soj-Spo0J-*parS*-System von *B. subtilis* polymerisieren die ParA-Ib-Typ Proteine (nach Gerdes *et al.*, 2000)  $\delta_2$  und Soj auf der DNA und bilden Nukleoproteinfilamente. Spo0J hat eine hohe Affinität für die verschiedenen *parS*-Regionen des Nukleoids, an denen es bindet und gleichzeitig die Depolymerisierung der Soj Nukleoproteinfilamente einleitet, was darauf hin deutet, dass die Depolymerisation aus der *parS*-Region, wo Spo0J gebunden ist, in beiden Richtungen stattfindet (Leonard *et al.*, 2005b).



**Abb. 58** Modellierung des gesamten *par*-Systems von pSM19035 aus *S. pyogenes*. Die Pfeile auf der *parS*-DNA stellen die 7 bp Heptaden (5'-WATCACW-3') dar, wobei „W“ hier A oder T ist. Das  $\omega_2$ -Protein bindet an diese Heptaden und ermöglicht die Anlagerung der  $\delta_2$ -Filamente an die *parS*-DNA einerseits und andererseits stimuliert die ATPase-Aktivität von  $\delta_2$ , was zum Abbau der Nukleoproteinfilamente führt.

Im Gegensatz zu anderen *par*-Systemen bindet  $\omega_2$  (ParB-Analog) an die *parS*-DNA spezifisch (de la Hoz *et al.*, 2000). Der  $\omega_2$ •*parS*-Komplex stimuliert die ATP-Bindung und die ATPase-Aktivität des  $\delta_2$ -Proteins.  $\delta_2$  liegt in Lösung auch ohne Nukleotid-Zusatz als Dimer vor. Das  $\delta_2$ -Dimer polymerisiert in Gegenwart des  $\omega_2$ •*parS*-Komplexes und ATP bzw. nicht-hydrolysierbarem ATP $\gamma$ S und formt Nukleoproteinfilamente (Abb. 58). Die Bindung von weiteren  $\omega_2$ -Protein an die *parS*-DNA im  $\omega_2$ • $\delta_2$ •*parS*-Komplex führt zur Verschiebung der Plasmid-Position in der Zelle (siehe Kap. 3.3) und ermöglicht die co-operative Polymerisation des  $\delta_2$ -Proteins auf der DNA, was zur Formation von Nukleoproteinfilamenten führt, die größer als die Zelllänge sind (siehe Kap. 3.2). Die Bildung dieser Filamente ist unter den zellulären Bedingungen ein dynamischer Prozess (Kap. 3.1.6), d. h. ihre Entstehung bzw. ihr Abbau findet gleichzeitig statt. Das Oberflächenpotential des  $\delta_2$ -Dimers (Kap. 3.14) bestätigt die Polarität der durch EM nachgewiesenen Filamente. Da die Polymerisierung des Proteins mit seiner Depolymerisierung einhergeht (Kap. 3.1.6), ist aufgrund der ATPase-Daten (Kap. 3.1.5) anzunehmen, dass der Abbau der Filamente auf der  $\omega_2$ •*parS*-Region stattfindet, indem die N-terminalen Reste des  $\omega_2$ -Proteins mit der offenen Seite der Kluft des  $\delta_2$ -Dimers interagieren und so die ATPase-Aktivität

---

stimulieren (Abb. 58). Dass der zelluläre Level von  $\omega_2$  bzw. das molare Verhältnis zwischen  $\omega_2$  und  $\delta_2$  ( $\omega_2:\delta_2$ ) der Stimulierung der ATPase-Aktivität des  $\delta_2$ -Proteins, der Depolymerisierung von Filamenten und damit der Plasmid-Paarung entgegenwirkt und auf der anderen Seite die höhere Konzentration des  $\omega_2$ -Proteins dem flussabwärts vom  $\omega$ -Gen befindlichen TA-System ( $\epsilon$ - $\zeta$ ) zugute kommt (de la Hoz *et al.*, 2004), ist ein wichtiges Indiz für den Zusammenhang zwischen beiden Plasmid-sichernden Systemen (Par- und TA-System).