

## 4 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Ermittlung der Kristallstruktur des Plasmid kodierten  $\delta$ -Proteins im Zusammenhang eines möglichen Par-Systems in pSM19035. Das Plasmid pSM19035 wurde ursprünglich aus dem grampositiven und humanpathogenen Bakterium *Streptococcus pyogenes* isoliert und kommt dort in niedriger Kopienzahl vor. Zu Beginn der hier durchgeführten Versuche war bereits bekannt, dass dieses zur *Inc18*-Familie gehörende Plasmid mit breitem Wirtsspektrum für ein effektives Toxin-Antitoxin-System kodiert ( $\epsilon$ - $\zeta$ -TA-System), welches unter der Kontrolle des  $\omega$ -Repressor-Proteins steht. Die Existenz eines kompletten Par-Systems in pSM19035 mit allen dazu gehörenden Komponenten wie ein ParA-Protein als ATPase, ein DNA-bindendes ParB-Protein und eine Zentromer-ähnliche DNA-Region (*parS*-DNA) war nicht bekannt. Die Primärsequenzanalyse zu ORF *delta* ( $\delta$ ), das sich unmittelbar flussaufwärts vom  $\omega$ -Gen befindet, klassifizierte  $\delta$  als eine ParA-homologe Walker-Type-ATPase. Es wird vermutet, dass diese ParA-homologen ATPasen in die DNA-Segregation bzw. Plasmidverteilung bei Prokaryonten verwickelt sind.

Das Gen  $\delta$  wurde in *E. coli* kloniert und in ER2566 überexprimiert. Zur Reinigung des Proteins (34.5 kDa) wurde ein Reinigungsprotokoll erstellt und optimiert. Nachdem der Reinheitsgrad des Proteins durch mehrere Methoden nachgewiesen wurde, wurde das homogene Protein im Komplex mit ATP $\gamma$ S co-kristallisiert.

Die Röntgenbeugungsdaten wurden mit der Synchrotronstrahlung am Strahlrohr BL 1 vom BESSY (Berlin) gesammelt (max. Auflösung: 1.83 Å) und die dreidimensionale Struktur des Proteins mittels molekularen Ersatzes unter Verwendung der Atomkoordinaten des Soj-Proteins von *T. thermophilus* als Suchmodell bestimmt. Das hier vorgestellte Strukturmodell ist die erste Struktur eines Plasmid kodierten ParA-Typ-Proteins in seiner ATP $\gamma$ S und Mg<sup>2+</sup> bindenden Form ( $\delta$ •ATP $\gamma$ S/Mg<sup>2+</sup>)<sub>2</sub>. Die Struktur des  $\delta_2$ -Proteins ist ein Homodimer mit einer „V förmigen“ Kluft zwischen beiden Monomeren. Die in dieser Kluft befindlichen ATP-Bindetaschen werden jeweils von einem ATP $\gamma$ S-Molekül und einem Mg<sup>2+</sup>-Ion belegt. Das elektrostatische Oberflächenpotential vom Komplex ( $\delta$ •ATP $\gamma$ S)<sub>2</sub> zeigt, dass das Dimer  $\delta_2$  eine überwiegend negativ geladene untere und eine positiv geladene obere Seite aufweist. Diese Polarität des Proteins deutet darauf hin, dass es mit seiner positiv geladenen oberen Seite mit der DNA oder mit der negativ geladenen Seite des ParB-Proteins interagieren könnte.

Im Gegensatz zum chromosomal kodierten Soj von *B. subtilis*, welches nur in Gegenwart von ATP in die Dimer-Form übergeht, liegt  $\delta_2$  in Lösung ohne Nukleotid-Zusatz

als Dimer vor. Die Ergebnisse des ATPase-Assays zeigen, dass  $\delta_2$  in der Lage ist, ATP zu hydrolysieren. Wenn der Reaktion jedoch zusätzlich die *parS*-DNA und das zweite Protein, nämlich das ParB-Analoga  $\omega_2$  zugefügt werden, steigt die Enzymaktivität des  $\delta_2$ -Proteins um das Sechsfache, während die N-terminale Deletionsmutante  $\omega_2\Delta N19$  nicht stimuliert. Dies zeigt, dass die deletierten 19 Reste bei der Hydrolyse des ATP eine entscheidende Rolle spielen. Die auf drei Komponenten basierende Interaktion ( $\delta_2$ - $\omega_2$ -DNA) wurde auch durch DLS- und Sedimentations-Versuche sowie durch elektronenmikroskopische Beobachtungen bestätigt. Die letzteren drei Versuche deuten darauf hin, dass  $\delta_2$  auch in der Lage ist, in Gegenwart von  $\omega_2$  und *parS*-DNA zu polymerisieren bzw. Nukleoproteinfilamente zu bilden. Die Existenz dieser eventuell bipolaren Filamente könnte die Verschiebung des Nukleoids von der Mitte der Zelle zu den Zellpolen in *B. subtilis* erklären. Da die ATPase-Aktivität von  $\delta_2$  in Gegenwart von  $\omega_2$  und *parS*-DNA stimuliert wird und da diese erhöhte ATPase-Aktivität die Depolymerisation von  $\delta_2$  beginnt, ist anzunehmen, dass der Filamentabbau an der  $\omega_2$ •*parS*-DNA startet.

Das hier vorgestellte Strukturmodell und die erzielten Ergebnisse in der Funktionsanalyse haben einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung des gesamten Segregationsmechanismus vom Plasmid pSM19035 geleistet.