
Einleitung

1.1 Allgemeines

Die namensgebende Eigenschaft zur Zuordnung von biologischen Zellen ist das Vorliegen der chromosomalen DNA. Während in eukaryontischen (*ευκαρυον*: der gute Kern) Organismen die DNA im Zellkern zu finden ist, liegt sie bei prokaryontischen (*προκαρυον*: das vor dem Kern) Zellen im Nucleoid. In der Evolution entwickelten sich eukaryontische Organismen aus prokaryontischen.

Der Zellkern, umhüllt von einer Membran, enthält die DNA als Komplex mit Histon- und Nichthistonproteinen in Chromosomen (*χρομα*: Farbe und *σομα*: Körper). Dieser Komplex aus DNA und Protein nimmt bei der Zellteilung eine besonders kompakte Form an, so dass man ihn im Lichtmikroskop als Fäden aus Chromatin sichtbar machen kann. Neuere Abbildungsmöglichkeiten, wie in Abb.1.1.1 dargestellt, erlauben detaillierte Aufnahmen.



Abb.1.1.1. Rasterkraftmikroskop-Abbildung eines Chromosoms (Ushiki *et al.*, 1996)

Das Nucleoid von prokaryontischen Organismen hingegen liegt frei schwimmend im Cytosol vor und nimmt dort einen großen Teil des Volumens ein. Die DNA scheint an einem oder mehreren Punkten der Innenfläche der Plasmamembran befestigt zu sein. Histonartige Proteine sind im prokaryontischen Paradeorganismus *Escherichia coli* häufig. Diese Proteine organisieren das zirkuläre Chromosom zu einer Reihe in Schleifen gelegter Bereiche. Sie binden und lösen sich jedoch in Minutenschnelle, und man konnte hier keine regelmäßige stabile Struktur finden (Lehninger *et al.*, 1994).

Neben der DNA im Nucleoid enthält das Cytosol der meisten Bakterien noch zahlreiche kleine DNA-Ringe, die Plasmide. Diese nicht lebensnotwendigen DNA-Abschnitte lassen sich experimentell besonders gut handhaben und sind für die molekulargenetische Forschung äußerst nützlich. In der Natur verleihen manche Plasmide zum Beispiel Resistenzen gegen Giftstoffe oder Antibiotika aus der Umgebung.

Im Unterschied zur chromosomalen DNA können diese Plasmid-DNA-Ringe in unterschiedlicher Kopienzahl im Cytosol vorliegen. Ihre Replikation und Vererbung ist eigenständig und nicht mit der des Chromosoms gekoppelt. Wie das Chromosom besitzt die Plasmid-DNA Strukturelemente. Sie liegt im Cytosol als entspannte, offene Ringe (*relaxed DNA*) oder als superspiralisierte Elemente (*supercoiled DNA*) vor. Diese Ringe vereinigen sich häufig zu größeren Plasmidmultimeren.

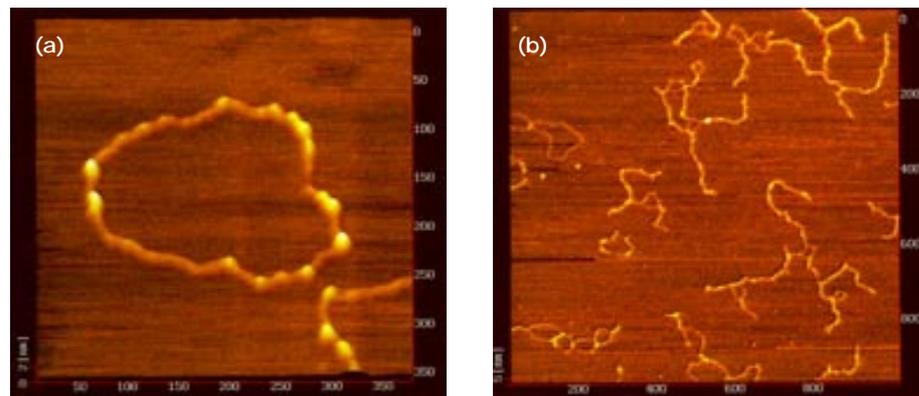


Abb.1.1.1. Rasterkraftmikroskop-Abbildung von Plasmidringen (a) *relaxed* (b) *supercoiled* (Ushiki *et al.*, 1996)

Da die Vererbung der Plasmid-DNA nicht an die Vererbung des Chromosoms gekoppelt ist, haben diese Systeme im Lauf der Evolution komplexe Mechanismen entwickelt, damit eine Vererbung von der Mutter- an die Tochterzelle sichergestellt wird.

1.2 Vererbung von Plasmid-DNA

Prokaryontische Plasmid-DNA zeigt eine weitgefächerte Verbreitung innerhalb verschiedener Zellgattungen. Darüber hinaus sind evolutionär verwandte Typen in verschiedenen Arten zu finden. Ihre Verbreitung wird durch einen konjugativen Transfer von DNA zwischen zwei Zellen hervorgerufen und *via* Inkompatibilitäten geregelt. Wurde eine Zelle mit neuer, ihr unbekannter, aber kompatibler plasmidischer DNA infiziert, zeigt diese oft eine hohe Stabilität im Cytosol der hervorgehenden Tochtergenerationen. In den meisten Fällen wird diese stabile Plasmidvererbung durch Genkassetten hervorgerufen, die aktiv einem Plasmidverlust entgegenarbeiten (Gerdes, 2000). Reicht bei Plasmidtypen mit hoher Kopienzahl der Plasmide eine über das Zellcytosol homogene Verteilung der einzelnen DNA-Moleküle für eine stabile Vererbung aus (*random segregation*), so sinkt die Effizienz dieses Zufallsmechanismus, wenn nur eine geringe Anzahl an Plasmidmolekülen vorkommt. Nur ein gerichteter, aktiver, durch Proteine gesteuerter Mechanismus kann in diesen Fällen eine Stabilität sicherstellen (*better than random segregation*).

Bisher beschriebene Genkassetten, die aktiv an solchen Mechanismen beteiligt sind, können drei unterschiedlichen Gruppen zugeordnet werden: (i) Die vom Plasmid codierten Proteine sind an einer räumlichen Differenzierung im Cytosol beteiligt. Diese centromerartigen Systeme lokalisieren plasmidische DNA-Moleküle in Bereichen des zukünftigen Membranaufbaus bei der Teilung von Mutter- und Tochterzelle. Sie binden zumindest ein Plasmidmolekül pro Proteinmolekül und stellen somit sicher, dass zumindest ein Plasmidmolekül pro Zelle bei der Zellteilung weitervererbt wird (Harry, 1997; Wheeler und Shapiro, 1997). (ii) Rekombinationssysteme, die an spezifische Sequenzmotive eines Plasmids binden und Plasmidmultimere in Monomere auflösen (Kwong *et al.*, 2001). (iii) Tötungssysteme (*postsegregational killing systems, PSK*), die nach einer Zellteilung bei einem Plasmidverlust aktiv werden und somit Fehler der Systeme des Typs (i) und (ii) nachträglich korrigieren (Gerdes, 2000). Diese *PSK*-Systeme können ihrerseits wieder in zwei Untergruppen geteilt werden: (a) Die regulierenden Produkte sind instabile *Antisense* RNAs, die eine Translation von stabilen, toxin-codierenden mRNAs inhibieren (z.B. *hok* mRNAs, erläutert in Gerdes *et al.*, 1997). (b) Protein-Proteinwechselwirkungen eines instabilen Antitoxins, das der Toxizität eines stabilen Toxins entgegenwirkt (Toxin-Antitoxin- oder TA-Systeme). Als Toxin wird in diesen Fällen ein Protein bezeichnet, das aktiv in den Zellzyklus eingreift und dadurch zum Absterben der Zelle führt. Vertreter dieser Proteinsysteme sind:

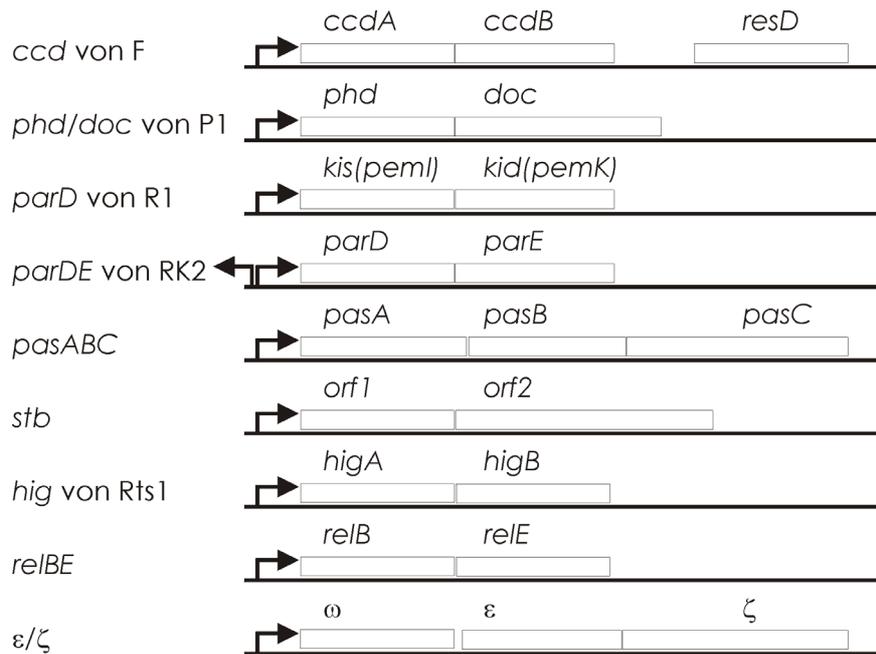


Abb.1.2.1. Genetische Organisation von TA-Loci, Pfeile nach rechts bedeuten, dass der Promotor Gen aufwärts liegt. Der Pfeil nach links symbolisiert einen divergenten Promoter, der die Transkription der Gene *parABC* unterstützt (nach Gerdes, 2000).

In Abb.1.2.1. ist die genetische Anordnung der bekannten plasmidischen TA-Systeme wiedergegeben. Im Allgemeinen sind deren Gene als Operon angeordnet, wobei das erste Cistron das Antitoxin, das zweite das Toxin kodiert. Einzige Ausnahme davon ist der *hig-Locus* von Rts1, in dem das Gen-aufwärts lokalisierte Cistron (*higA*) das Toxin kodiert (Tian *et al.*, 1996). Obwohl diese TA-Loci keine Sequenzhomologien aufweisen, ist deren genetische Struktur und Funktion der Komponenten sehr ähnlich.

Da diese Toxine sehr effizient sind, führt ihre Überproduktion zu einem schnellen Zelltod. Selbst wenn kein Induktionsreagenz (z.B. Isopropyl-thio- β -D-thiogalactopyranosid für LacI-regulierte Promotoren) gegenwärtig ist, kann aufgrund der schwachen Durchlässigkeit der Promotoren eine Klonierung von Toxin-kodierenden Genen mit Schwierigkeiten behaftet sein. Meist ist dieses Problem lösbar, indem das Toxin-kodierende Gen in ein Bakterium transformiert wird, das bereits das Gen des Antitoxins enthält, oder die Zelle gleichzeitig mit beiden Genen kotransfomiert wird.

In TA-Systemen wechselwirken beide Proteine, indem sie stabile Komplexe bilden. Dies konnte explizit für CcdA/CcdB von Plasmid F (Bahassi *et al.*, 1999; Tam und Kline, 1989; Van Melderer *et al.*, 1996), für Kis/Kid von R1 (Rulz-Echevarria *et al.*, 1995), für Phd/Doc von P1 (Gazit und Sauer, 1999; Magnuson und Yarmolinsky, 1998) und ParD/ParE von RK2 (Johnson *et al.*, 1996) gezeigt werden. Üblicherweise liegt das Antitoxin im Überschuss im

Cytosol vor und wird von den Proteasen Lon und Clp abgebaut. So wird zum Beispiel CcdA, PcmI, RelB und PasA von Lon verdaut, Phd von ClpXP (Gerdes, 2000). Das Toxin hingegen ist sehr stabil. Dies ist auch der Aktivierungsmechanismus in Plasmid-freien Tochterzellen. Der Verlust des Antitoxin-kodierenden Gens hat zur Konsequenz, dass die Zelle kein neues, dem Toxin entgegenwirkendes, Antitoxin produziert. Die im Cytosol vorliegenden TA-Proteinkomplexe und freie Antitoxinmoleküle wurden jedoch bei der Zellteilung teilweise mitvererbt. Ob die im Cytosol vorliegenden Proteasen das freie oder das komplexierte Antitoxin erkennen und abbauen, ist unklar. Eine weitere Möglichkeit ist eine rasche Dissoziation des TA-Komplexes (Gerdes, 2000). Beide Aktionen setzen das Toxin frei und aktivieren es damit.

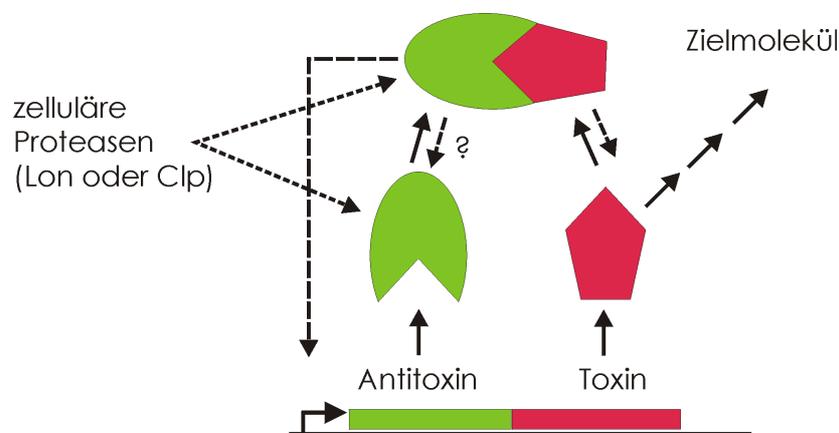


Abb.1.2.2. Schematische Darstellung des genetischen und funktionellen Aufbaus der TA-Loci. Das Fragezeichen symbolisiert die offene Frage nach der Komplexform des Antitoxins beim Abbau durch Proteasen (nach Gerdes, 2000).

Neben der neutralisierenden Eigenschaft des Antitoxins wirkt dieses auch als Autoregulatorprotein bei der Transkription. Meist bindet es Strang-aufwärts der Operator-Signalsequenz oder über diese hinweg. In vielen Fällen besitzt die TA-Komplexbildung einen positiven Effekt auf die DNA-Bindung des Antitoxins, und das Toxin wirkt als Co-Repressorprotein bei der Transkription. Solche spezifische DNA-Bindung der TA-Komplexe wurde in einigen Fällen gezeigt (Gerdes, 2000).

Die meisten dieser TA-Systeme weisen jedoch geringe Effizienz auf. So stabilisiert *RelBE*, *ccd* von F1 und *parD* von R1 nur fünf bis zehnfach und *Phd/Doc* nur siebenfach ein Plasmid. Einzige Ausnahme stellt *parDE* aus RK2 dar, dieses TA-System stabilisiert ein Plasmid mehr als 1000-fach (Gerdes, 2000).

Bis auf das TA-System ϵ, ζ von pSM19035 stammen alle bis jetzt bekannten Systeme aus Gram-negativen Organismen. ϵ, ζ kommt dagegen in Gram-positiven Bakterien vor. Für diesen Typ von Bakterien sind die Mechanismen der Plasmidstabilisierung kaum bekannt und verstanden. Das Plasmid pSM19035 wurde ursprünglich aus *Streptococcus pyogenes* isoliert und kommt dort in niedriger Kopienzahl vor. Dieses zirkuläre DNA-Stück besitzt jedoch eine weite Verbreitung (*Broad-Host-Range*) in Gram-positiven Bakterien mit niedrigem dG und dC Anteil der DNA. Das DNA-Segment SegB von pSM19035 ist für eine Plasmidstabilisierende Eigenschaft von > 1000-fach (Ceglowski *et al.*, 1993a) verantwortlich, und kodiert neben dem Gen δ das Operon ω, ϵ und ζ .

Locus	Organismus	Toxin (AS ^a)	Ziel	Antitoxin (AS)	Protease	PSK
<i>ccd</i> von F	<i>E. coli</i>	CcdB (101)	DNA gyrase	CcdA (72)	Lon	Ja
<i>pem/parD</i> von R100/R1	<i>E. coli</i>	PemK/Kid (110)	DnaB?	PemI/Kis (84)	Lon	Ja
<i>phd/doc</i> von P1	<i>E. coli</i>	Doc (126)	unbekannt	Phd (73)	ClpXP	Ja
<i>parDE</i> von RK2	BHR ^b	ParE (103)	unbekannt	ParD (83)	unbekannt	Ja
<i>relBE/pasABC</i>	<i>T. ferrooxidans</i>	PasB (90)	unbekannt	PasA (74)	Lon	Ja
<i>stb</i> von pMYSH6000	<i>S. felxneri</i>	Orf2 (133)	unbekannt	Orf1 (75)	unbekannt	n.b. ^c
<i>hig</i> von Rts1	BHR	HigB (92)	unbekannt	HigA (104)	unbekannt	Ja
<i>relBE</i> von P307	<i>E. coli</i>	RelE (95)	Translation	RelB (83)	Lon	Ja
<i>relBE/stbDE</i> von R485	<i>M. morgani</i>	RelE/StbE (93)	unbekannt	RelB/StbD (83)	unbekannt	Ja
<i>relBE</i> von pJK21	<i>A. europaeus</i>	RelE (93)	unbekannt	RelB (87)	unbekannt	n.b.
<i>relBE</i> von pRJF2	<i>B. fibrisolvens</i>	RelE (93)	unbekannt	RelB (83)	unbekannt	n.b.
<i>relBE</i> von pB171	<i>E. coli</i>	RelE (95)	unbekannt	RelB (83)	unbekannt	n.b.
<i>relBE</i> von p11184	<i>P. shigelloides</i>	RelE (94)	unbekannt	RelB (80)	unbekannt	n.b.
ϵ/ζ von pSM19035	BHR	ζ (287)	unbekannt	ϵ (90)	unbekannt	ja

Tab.1.2.3 Auflistung aller in der Literatur beschriebenen prokaryontischen TA-Systeme (nach Gerdes, 2000);^a AS: Zahl der Aminosäuren in der Polypeptidkette, ^b BHR: broad-host-range, ^c n.b. nicht bestimmt;

Das Protein δ zeigt starke Homologie zur ParA-Proteinfamilie. Diese Proteine mit ATPase-Aktivität werden dem Typ (i) zugeordnet (de la Hoz *et al.*, 2000). Die Proteine ω, ϵ und ζ repräsentieren das TA-System. Dieses unterscheidet sich in seinen Eigenschaften von TA-Systemen aus Gram-negativen Bakterien, da es aus drei anstatt zwei Proteinen besteht und die Polypeptidkette des Toxins auf 287 anstatt 90 - 130 Aminosäuren verlängert ist. Das Operon besitzt zwei Promotorregionen, P_ω und P_ϵ . Von P_ω werden die Gene ω, ϵ und ζ abgelesen, von P_ϵ die Gene ϵ und ζ . (Ceglowski *et al.*, 1993b; Sitkiewicz *et al.*, 1999, de la Hoz *et al.*, 2000). Die regulatorische Funktion übernimmt das Protein ω und bindet an beide Promotorregionen. Der ω -Repressor steuert über den starken Promotor P_ω die Expression des ganzen Operons, während über den schwachen P_ϵ -Promotor die Expression der Gene ϵ und ζ gesteuert wird. Zusätzlich bindet der Repressor ω an andere Promotorregionen und übernimmt zusätzlich verschiedene regulatorische Funktionen (de la Hoz *et al.*, 2000).

Werden die Gene ζ und ε in unterschiedliche aber kompatible Vektoren eingefügt, so enthalten transformierte *E. coli* Zellen immer beide Vektorkonstrukte. Eine Expression des Gens ζ alleine führt zur Zellfilamentierung und zu einem Stillstand des Zellwachstums. Dem wirkt die gleichzeitige Expression des Gens ε entgegen (Sitkiewicz *et al.*, 2000). Ein genauer Funktionsmechanismus konnte auf molekularbiologischem oder biochemischem Wege bis jetzt nicht nachgewiesen werden.

In vitro bilden beide Proteine einen stabilen Komplex und können weder durch hohe Salzkonzentrationen (2 M NaCl) noch durch chaotrope Reagenzien getrennt werden. In Lösungen, bestehend aus ≤ 150 mM NaCl und 50mM Tris-HCl pH 7.5, liegen die Proteine als $\varepsilon_2\zeta_2$ -Heterotetramer vor. Nach langer Dialyse gegen 50mM Tris-HCl pH 7.5 und 1.3 M Ammoniumsulfat können diese teilweise zu einem $\varepsilon_1\zeta_2$ -Heterotetramer dissoziieren (Meinhart *et al.*, 2001). Erst in Gegenwart von 3 M Harnstoff trennen sich beide Proteine während einer Gelfiltration (Alonso, pers. Mitt.). Bei einer Rekonstitution des Komplexes aus Harnstoff-ent- und rückgefaltetem Protein bildet sich ein $\varepsilon_1\zeta_2$ -Heterotrimer (Alonso, pers. Mitt.). Eine Aussage über die exakte Stöchiometrie des Komplexes in Lösung konnte allerdings vielfach nicht getroffen werden. Bedingt durch die Masse der Polypeptidkette ε (10.6 kDa) können die $\varepsilon_1\zeta_2$ (75.2 kDa) und die $\varepsilon_2\zeta_2$ (85.8 kDa) Komplexformen analytisch kaum getrennt werden. Es wird angenommen, dass beide Proteine *in vivo* in ihrer inaktiven Form als $\varepsilon_2\zeta_2$ -Heterotetramer vorliegen (Alonso, pers. Mitt.). Eine *in vivo* Bindung von ε und ζ konnte in einem Hefe-zwei-Hybridsystem jedoch gezeigt werden (Sitkiewicz *et al.*, 1999).

Die starke Protein-Protein-Wechselwirkung unterscheidet das TA-System ε,ζ erheblich von anderen Systemen. Ein *in vivo* Freisetzen des Toxins durch eine einfache Dissoziation kann nicht als Aktivierungsmechanismus angenommen werden. Ebenso wird ε *in vitro* weder von der Protease Lon noch von ClpXP abgebaut. Jedoch wurde gezeigt, dass *in vivo* ε schneller abgebaut wird als ζ (Alonso, pers. Mitt.). In diesem Punkt stimmt dieses TA-System mit den Systemen aus Gram-negativen Organismen überein. Das Protein ε ist nicht in den Regulationsmechanismus der Genexpression miteingebunden. Es konnten bis jetzt keine Protein-Protein-Interaktionen von ω und ε oder ζ nachgewiesen werden. Das $\varepsilon_2\zeta_2$ -Heterotetramer und das rekonstituierte $\varepsilon_1\zeta_2$ -Heterotrimer binden unspezifisch an relaxierte, geschlossene Plasmid-Doppelstrang-DNA, wobei diese kompaktiert wird. Wenngleich ε alleine nicht nachweislich an DNA bindet, bindet ζ an linearisierte DNA (Alonso, pers. Mitt.). Camacho konnte für ζ und für das $\varepsilon_1\zeta_2$ -Heterotrimer eine schwache ATPase-Aktivität nachweisen (pers. Mitt.).