
Funktionsmechanismus

Die Kombination von molekularbiologischen und biochemischen Ergebnissen und die nun bekannte Struktur des $\varepsilon_2\zeta_2$ -Heterotetramers ermöglichen, den Funktionsmechanismus dieses TA-Systems beim Verlust der plasmidischen DNA zu erklären. Das ganze Operon besteht aus drei Proteinen: ω und dem Komplex, den ε und ζ bilden (Gerdes, 2000). Das Regulatorprotein ω regelt über den Promotor P_ω die Expression des vollständigen Operons und über den Promotor P_ε die Expression der Gene ε und ζ als Bicistron (de la Hoz *et al.*, 2000). Camacho (pers. Mitt.) zeigte mit Hilfe eines künstlichen Expressionssystems mit hoher Kopienzahl (~ 200 Kopien/Zelle), dass ~ 500 ε, ζ -Moleküle pro Zelle vorliegen. Da die Anzahl an Wild-Typ Plasmid-DNA pSM19035 *in vivo* zwischen einem und drei Molekülen liegt, ist hier die Konzentration an ε, ζ im Cytosol des Ursprungsorganismus sehr gering.

Dass ε und ζ als Heterotetramer *in vitro* vorliegen, wurde durch Massenbestimmung in Gelfiltrationsexperimenten und Ultrazentrifugationsexperimenten gezeigt. Deshalb handelt es sich bei der hier beschriebenen Komplexform um kein *Artefact* der Kristallisation. Über *in vitro* zusätzlich vorkommende Komplexformen oder getrennte ε und ζ Moleküle bestehen noch Unklarheiten. Das $\varepsilon_2\zeta_2$ -Heterotetramer ist jedoch die dominante Komplexform (Alonso, pers. Mitt.). Auch *in vivo* wird in Zellen, die noch TA-kodierende Plasmid-DNA enthalten, dessen Vorliegen angenommen. *In vitro* wurde jedoch gezeigt, dass nur in Lösungen, die 3 M Harnstoff enthalten und damit nicht-physiologischen Bedingungen entsprechen, beide Proteine vollständig getrennt werden können.

Die in dieser Arbeit diskutierten strukturellen Homologien zu Phosphotransferasen zeigen, in welchem Bereich der Struktur die Bindung eines ATP-Moleküls zu erwarten ist. In allen strukturell verwandten Phosphotransferasen bindet ATP an vergleichbarer Position der Tertiärstruktur an den P-Loop. Eine Bindung von ATP im $\varepsilon_2\zeta_2$ -Heterotetramer wird jedoch inhibiert, da die Seitenketten Tyr ε 5 und Phe ε 9 eine sterische Hinderung für die Bindung des Adenins von ATP darstellen. Die Carboxylatgruppen von Glu ε 12 und Glu ε 16 führen zu einem negativen Potential in der Bindungstasche für ATP, das repulsiv auf die Phosphatbindung wirken sollte. Zusätzlich fixiert die Seitenkette von Glu ε 16 die Konformation von Arg ζ 158. Helix a von ε muss daher entfernt werden, um eine ATP-Bindung an ζ zu ermöglichen.

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Experimenten zur ATP-Hydrolyse (ATPase Aktivität). Sie zeigen, dass das $\varepsilon_2\zeta_2$ -Heterotetramer keine Aktivität besitzt. Die in dieser Arbeit angefertigte ζ (K46A) Mutante zeigt aber auch in der Konformation des aktiven Wild-Typ Proteins keine ATPase Aktivität (Camacho, pers. Mitt.). Wie die Struktur dieses Komplexes

zeigte, bleibt die Faltung von ζ von der Mutation unbeeinflusst. Deshalb kann angenommen werden, dass die ATPase-Aktivität, selbst wenn diese sehr schwach ist (Alonso, pers. Mitt.), eng mit der Toxizität in Verbindung steht.

Außerdem wurde durch diese Mutationen gezeigt, dass das Walker A Motiv den Hauptanteil zur Bindungsenergie des β -Phosphates von ATP bereitstellt. Dieses "*giant anion hole*" (Dreusike und Schulz, 1986) bindet in vielen Proteinstrukturen des Apoenzyms einen anionischen Komplex. Das K46A modifizierte ζ -Protein zeigt eine geringere Affinität zu Sulfationen als das Wild-Typ Protein, obwohl der Verlauf des Proteinrückgrats konserviert blieb. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der Aminogruppe von Lys ζ 46 bei der Bindung eines ATP-Moleküls.

Selbst wenn keine Rückschlüsse über eine mögliche aktive Form von ε, ζ durch die Ergebnisse dieser Arbeit getroffen werden können, so kann der toxische Effekt von ζ durch die signifikante Strukturhomologie zu Phosphotransferasen erklärt werden. Nicht nur die Tertiärstruktur ist ähnlich, sondern die Mehrheit der für eine Phosphotransferaseaktivität notwendigen Aminosäuren sind an vergleichbarer Position zu finden. Ein Vergleich der offenen, nicht substratgebundenen Strukturen ermöglichte, weitere katalytisch wichtige Aminosäuren zu identifizieren. Im Verlauf dieser Arbeit wurden einige dieser Aminosäuren durch solche ersetzt, die für eine Phosphotransferaseaktivität ungeeignet waren. Diese führten immer zu nicht- oder verringert toxischen Konstrukten. Damit lässt sich folgender Reaktionsmechanismus postulieren:

Das strukturell konservierte Asp ζ 67 könnte als Base die Deprotonierung des Zielmoleküls vornehmen. Das daraus resultierende Nukleophil würde dann das γ -Phosphat des ATP-Moleküls angreifen und zu einem pentakovalenten Übergangszustand führen. Arg ζ 171 würde Wasserstoffbrückenbindungen zum γ -Phosphat ausbilden und so den pentakovalenten Übergangszustand stabilisieren.

Dafür müsste Arg ζ 171, analog zu Arg136 in CmP, eine Rotation in das aktive Zentrum durchführen. Die Konstellation des T-A-R-A-T-Motivs deutet stark auf diese mögliche Rotation hin. Durch Mutationsstudien konnte die funktionelle Wichtigkeit von Arg ζ 171 gezeigt werden.

Ein Mg²⁺-Ion unterstützt diese Reaktion als katalytisches Kation, indem es die entstehende negative Ladung neutralisiert. Es würde in ζ von Glu ζ 116 und zusätzlich von der Thr ζ 47

Hydroxylgruppe koordiniert und damit an eine zu CmP und AK vergleichbare Position gebracht. Die Peptid-NH Gruppe und die Seitenketten von Lys ζ 46, Arg ζ 158 und Arg ζ 171 würden zusätzlich den pentakovalenten Zustand der γ -Phosphorylgruppe stabilisieren und zur Übertragung auf das Zielmolekül führen.

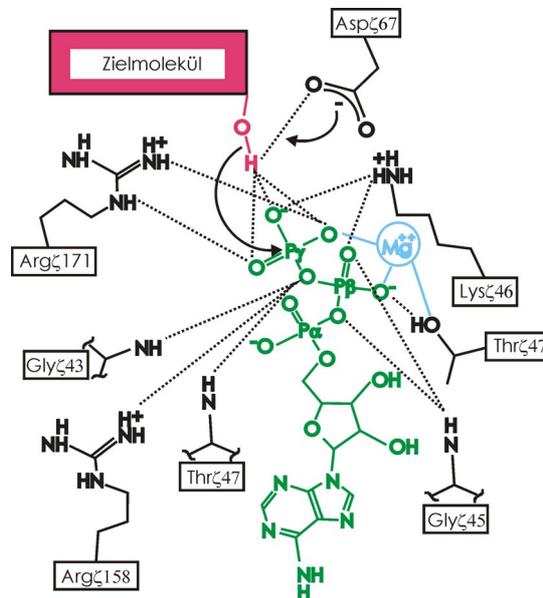


Abb.12.1. Schematische Darstellung des Übergangszustandes während der Phosphorylierung des Zielmoleküls; der Reaktionsmechanismus wurde aufgrund der Homologien zur Adenylatkinase (Berry und Phillips, 1998) und zur Choramphenikol-Phosphotransferase (Izard und Ellis, 2000) abgeleitet

Es verbleibt noch die Frage nach der Bindung des Adenins von ATP. Hier bieten sich Arg ζ 206 und Arg ζ 245 als mögliche Bindungspartner an. Interessanterweise wurde bei der Klonierung von ζ (R171S) immer eine spontane Nebenmutation beobachtet. In einem Konstrukt liegt diese als Prolin inmitten des Arg ζ 206 vorgelagerten β -Strangs, im zweiten Konstrukt wurde der Leserahmen für Arg ζ 245 zu einem Stopkodon geändert.

Ein Vergleich von AK und CmP mit ζ zeigt, dass eine mögliche Substratbindungstasche an analogen Positionen liegt. In ζ wird diese als Kluft zwischen Helices E und F gebildet. Zwar kann die Lage der Bindungstasche in der Tertiärstruktur ζ ermittelt werden, aber das Wissen um deren Form und Ladung reicht nicht aus, ein mögliches Substrat abzuleiten. Allenfalls lässt die Tiefe dieser Kluft die Aussage zu, dass entweder ein kleines Molekül oder ein sehr solvensexponierter schlanker Teil eines Proteins als mögliches Substrat in Frage kommt. Camacho (pers. Mitt.) konnte ausschließen, dass es sich bei ζ um eine NMP-Kinase handelt. Trotzdem verbleibt eine Vielzahl an kleinen Molekülen, die in der Zelle häufig als Botenstoffe

wichtige regulatorische Funktionen übernehmen (z.B. cAMP, cGMP oder ppGpp etc.). Ebenso kann die Möglichkeit, dass es sich bei ζ um eine Proteinkinase (z.B. Histidinkinase) handelt, nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund der fehlenden molekularbiologischen und biochemischen Ergebnisse kann hier keine weitere Aussage getroffen werden.

Um vergleichbar wie bekannte TA-Systeme zu funktionieren, muss es bei ϵ und ζ zu einem Mechanismus wie in Abb.12.2 dargestellt kommen. Wichtig dabei ist eine Aktivierung von ζ .

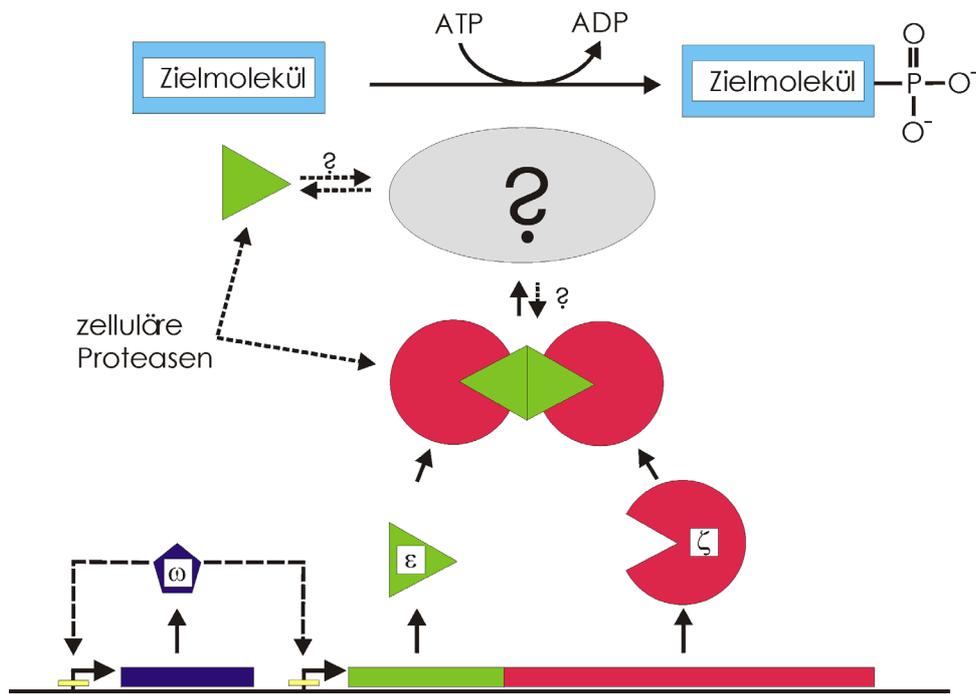


Abb.12.2. Schematische Darstellung des genetischen und funktionellen Aufbaus des $\epsilon\zeta$ -Locus; Fragezeichen symbolisiert die offenen Fragen;

Der nicht-toxische $\epsilon_2\zeta_2$ -Komplex in der hier beschriebenen Konformation muss verändert werden, um aktiv zu werden. Diese aktive, unbekannt Form, sei es ein $\epsilon_1\zeta_2$ -Heterotrimer oder ζ alleine, wird in Abb.12.2 durch das Fragezeichen im grauen Ellipsoid symbolisiert. Die beiden anderen Fragezeichen symbolisieren den Weg, wie es zu einer Aktivierung kommen könnte. Die Aktivierung des Toxins ζ kann nicht von der Struktur des $\epsilon_2\zeta_2$ -Heterotetramers abgeleitet werden. Die zweizählige Symmetrie des $\epsilon_2\zeta_2$ -Komplexes ermöglicht keine Rückschlüsse, in welchem Bereich des Heterotetramers die Komplexkonformation sich öffnen und folglich dissoziieren könnte. Auch die hydrophobe Kontaktfläche zwischen den ϵ Molekülen zeigt in den verschiedenen Kristallmodifikationen nur geringe Unterschiede, die auf unterschiedliche Molekülkontakte im Kristallverband zurückzuführen sind.

Da ζ unter *in vitro* Bedingungen, die einem physiologischen Umfeld vergleichbar sind, nicht von ε dissoziiert, kann ein einfacher Dissoziationsmechanismus der Proteine *in vivo* nicht angenommen werden. Vielmehr wirft dies die Frage nach einer dritten, unbekanntem Komponente auf. So könnte eine induzierte Konformationsänderung (*induced fit*), die durch diese dritte Unbekannte hervorgerufen würde, zu einer Destabilisierung des Komplexes führen. Dies könnte die Dissoziationsenergie von ε und ζ stark verringern und folglich die Freisetzung einer aktiven Form ermöglichen. Eine dritte *in vivo* Komponente konnte bis jetzt noch nicht nachgewiesen werden.

Eine andere Möglichkeit wäre ein Abbau von ε . Hier besteht ein Unterschied des ε, ζ -Systems zu bekannten TA-Systemen. Ist in Phd/Doc (Gazit und Sauer, 1999) und CcdA/CcdB (Dao-Thi *et al.*, 2000) das Antitoxin *in vitro* thermisch instabiler als das Toxin, so ist dies bei ε, ζ umgekehrt (Alonso, pers. Mitt.). Die drei-Helix-Bündel Tertiärstruktur des ε -Proteins wird durch hydrophobe Wechselwirkungen in sich stabilisiert und deutet auf eine thermisch stabile Konfiguration. ζ hingegen ist reich an Schleifenbereichen und schwach gebundenen Untereinheiten (z.B. Helix K - Schleife - Helix L Motiv). Dies kann als Indiz für dessen geringe thermische Stabilität angesehen werden. Beginnt ζ allein schon bei 35°C partiell zu entfalten, so beginnt der Entfaltungsprozess des $\varepsilon_2\zeta_2$ -Komplexes bei 40°C (Alonso, pers. Mitt.). Der Grund könnte der stabilisierende Einfluß von Helix a des ε auf die Tertiärstruktur des ζ sein.

Ebenso konnte kein *in vitro* Abbau des $\varepsilon_2\zeta_2$ -Heterotetramers durch die Proteasen Lon und ClpXP nachgewiesen werden. Die zwischen zwei ζ -Polypeptidketten eingeschlossene und geschützte Lage des ε_2 -Dimers kann der Grund sein, dass Proteasen nicht an die Polypeptidketten der ε -Proteine binden können.

Kürzlich wurde jedoch gezeigt, dass ε *in vivo* weniger stabil ist als ζ . Dies würde zu Änderungen im stöchiometrischen Verhältnis von ε und ζ im Cytosol führen. Wieder kann keine Aussage über das Vorhandensein eines $\varepsilon_1\zeta_2$ -Heterotrimers oder von freiem ζ gemacht werden. Für die Annahme, dass ein $\varepsilon_1\zeta_2$ -Heterotrimer die aktive, toxische Form ist, spricht folgendes: ATPase Studien zeigten, dass ein vermeintlicher $\varepsilon_1\zeta_2$ -Komplex höhere Aktivität besitzt als freies ζ (Camacho, pers. Mitt.).

Einem einfachen Abbau von ε , der nicht an eine dritte Komponente gekoppelt ist, widerspricht folgendes: ω und nicht ε regelt über die Promotorregion $P\varepsilon$ die Expression der Gene ε und ζ . Trotz vorhandenem Plasmid käme es zum Freisetzen der toxischen Form von

ζ . Eine Möglichkeit, dies zu verhindern, wäre, dass ein anderes vom Plasmid kodiertes Protein in dieses Operon miteingreift. Ebenso könnte die Regulatoreigenschaft ω am P_{ε} Promotor von der Konzentration an ε und ζ beeinflusst werden. Bis jetzt wurde von der molekularbiologischen Kooperationsgruppe weder eine Wechselwirkung zwischen ω und ε, ζ noch eine andere, dritte *in vivo* Komponente nachgewiesen.

Die *in vivo* Expression des Gens ζ allein führt zum Stillstand des Zellwachstums und nach 3 Stunden zum Zelltod. Ebenso wird eine schwache SOS-Antwort der Zelle beobachtet. Innerhalb dieser Zeit des Wachstumsstillstands ist der Effekt von ζ durch die Expression des Gens ε umkehrbar (Alonso, pers. Mitt.). Dieser reversible Effekt würde darauf hinweisen, dass das mögliche Zielmolekül der Phosphotransferaseaktivität von ζ ein Botenstoff ist. Dieser könnte den Regelmechanismus hemmen, die Hemmung würde aber vom Organismus rückgängig gemacht. Der Zelltod wäre somit die Folge einer lang andauernden Hemmung des Zellwachstums und damit ein sekundärer Effekt (Alonso, pers. Mitt.).