

5 Diskussion

5.1 TelN als Tyrosinintegrase-Analog

In dieser Arbeit wird zum ersten Mal *in vitro* gezeigt, daß das phagenkodierte Enzym TelN alleine für die *telomere resolution* hinreichend ist (Deneke *et al.*, 2000). Es wird damit bewiesen, daß Kofaktoren oder Hilfsproteine für die Reaktion nicht benötigt werden. Kurz darauf wurde ein *in vivo*-System beschrieben, welches bestätigt, daß TelN für die *telomere resolution* essentiell ist (Ravin *et al.*, 2001). Dieses *in vivo*-System hat aber nur eingeschränkte Aussagekraft, da es eventuell an der Reaktion beteiligte Kofaktoren oder Hilfsproteine nicht ausschließen kann.

TelN ist ein Tyrosinintegrase-Analog, dies zeigt eine Analyse der Primärstruktur und der katalysierten Reaktion. Zwei TelN-Moleküle katalysieren je eine doppelte Transesterifikation, die sehr ähnlich einer sequenzspezifischen DNA-Rekombination ist (Abb. 6). Bei der *telomere resolution* sind Donor- und Akzeptor-DNA jedoch identisch, anders als bei einer herkömmlichen sequenzspezifischen DNA-Rekombination, wie sie z.B. von der λ -Integrase (λ Int) katalysiert wird. Bei der Integration des λ -Genoms ist die Donor-DNA das λ -Genom und die Akzeptor-DNA das Chromosom von *E. coli*. Die Rekombination läuft im Falle von λ Int über das Zwischenstadium der Holliday-*junction*. Bei TelN ist der Reaktionsmechanismus aber wahrscheinlich grundlegend anders. Dieser Schluß läßt sich einerseits aus der Notwendigkeit ziehen, einen DNA-Strang mit seinem Gegenstrang zu verknüpfen, was bei anderen Tyrosinintegrasen/Rekombinasen nicht vorkommt. Andererseits gibt es experimentelle Hinweise, die eine kruziforme DNA Konformation unwahrscheinlich machen: (i) TelN prozessiert lineare DNA nur unwesentlich langsamer als DNA mit negativer Superhelizität (Daten nicht gezeigt). Negative Superhelizität begünstigt kruziforme DNA-Strukturen. (ii) Es gibt experimentelle Indizien, die für eine Z-DNA Konformation während der *telomere resolution* sprechen. Diese werden in Abschnitt 5.4 ausführlicher diskutiert.

Der Name TelN bzw. Protelomerase erscheint unglücklich gewählt, weil TelN nicht wie eine eukaryontische Telomerase, also eine *template*-unabhängige Polymerase zur Verlängerung linearer, doppelstängiger DNA-Enden, wirkt. TelN hat auch keine Ähnlichkeit mit terminalen Proteinen, die die Aufgabe haben, lineare DNA-Enden zu schützen.

5.2 Vorhersage der Domänenstruktur von TelN

Die Analyse der Primärstruktur von TelN (Abb. 23) fördert zwar Motive zutage, die TelN mit vielen Tyrosinintegrasen/Rekombinasen teilt (Box A, B und C; Esposito & Scocca, 1997), aber für die Aufklärung der Domänenstruktur ist das zu wenig. Auch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Sekundärstrukturanalyse brachte keine eindeutigen Hinweise auf die Domänenstruktur von TelN. Die gefundenen Motive waren aber Ausgangspunkt für die in dieser Arbeit durchgeführten Mutagenesestudien (4.5.1 und 4.5.3). Die Mutagenesestudien erbrachten Hinweise auf mindestens drei Domänen in TelN:

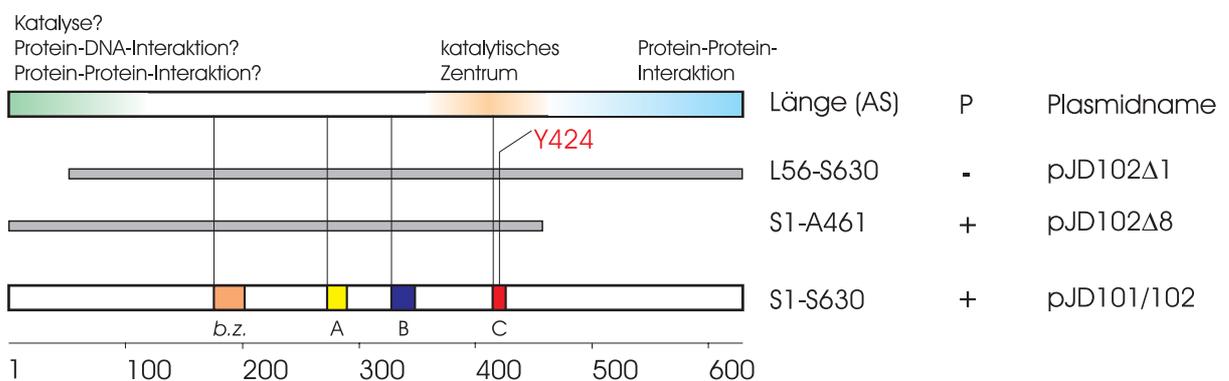


Abb. 38 Vorhergesagte TelN-Domänenstruktur

Die Domänenstruktur ist schematisch als Balken über den TelN-Proteinmutanten pJD102Δ1 und pJD102Δ8 dargestellt. Die verschiedenen Domänen sind farblich markiert und mit der vermuteten Funktion überschrieben. Die grauen Balken stellen den noch verbleibenden Proteinanteil der TelN-Deletionsmutanten dar. Die Wildtyp-Proteinsequenz entspricht dem unteren Balken. Der potentielle *bacterial zipper* (b.z.), sowie die konservierten Motive Box ‚A‘, ‚B‘ und ‚C‘ sind im Wildtyp-Protein eingezeichnet. Die Position des potentiellen katalytischen Tyrosins Y424 ist rot markiert. Die Proteinlänge ist neben den Balken angegeben, daneben die *telomere resolution* Aktivität des verkürzten Proteins (P, siehe auch Abb. 24). Der Plasmidname ist in der Spalte ganz rechts aufgeführt.

(i) eine Transesterasedomäne (Abb. 38). Das katalytische Zentrum von TelN liegt vermutlich in BoxC. Diese Annahme beruht einerseits auf einem Sequenzvergleich von TelN mit Tyrosinintegrasen, der auf konservierte Aminosäurereste hinweist. Punktmutationen in diesem Bereich zeigen mehrere für die *telomere resolution* essentielle Aminosäuren (Abb. 19). Darunter ist vor allem auch Y424, welches die katalytische Aminosäure sein könnte: Die TelN Punktmutanten Y424A und Y424F sind bezüglich der Transesterifikation inaktiv. Der Beweis, daß Y424 das katalytische Tyrosin ist, könnte durch Analyse des TelN-DNA-Intermediats, das bei der Reaktion mit pJD105(TA)₇ entsteht, erbracht werden. Es gibt Hinweise, daß noch mindestens ein weiterer Aminosäurerest Teil des katalytischen Zentrums

ist: H415 stabilisiert möglicherweise das Nukleophil, da TelN H415A eine stark veränderte *telomere resolution* Aktivität zeigt (Abb. 20). Die Reaktion läuft in Gegenwart von TelN H415A mit sehr stark verminderter Effizienz ab, und es entstehen Nebenprodukte in der Form von Dimeren. Die sequenzspezifische DNA-Bindung aber ist gegenüber dem Wildtyp-Protein unverändert (Abb. 26). Die Bedeutung von Box A und B bleibt unklar, sie könnten aber der strukturellen Stabilisierung des aktiven Zentrums dienen.

(ii) eine Protein-DNA-Interaktionsdomäne. Das Protein TelN Δ 1 (pJD102 Δ 1, siehe Abb. 24 und Abb. 38) zeigt ein ungewöhnliches Verhalten in der *telomere resolution*. Diese TelN-Mutante, der die ersten 55 Aminosäurereste fehlen, hat eine sequenzspezifische Topoisomeraseaktivität im Rohextrakt, d. h. die *linking-number* des Substrats nimmt ab (Daten nicht gezeigt). TelN Δ 2 (pJD102 Δ 2) zeigt dieses Verhalten in geringerem Ausmaß (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung kann erklärt werden durch (1) die Annahme einer gestörten Proteinstruktur, bei der die intermolekulare Transesterifikation zwischen den beiden komplementären DNA-Strängen nicht mehr stattfinden kann. (2) Durch eine gestörte TelN-TelN-Wechselwirkung, so daß keine konzertierte Aktion zwischen beiden Proteinen erfolgen kann. (3) Als weitere Möglichkeit ist in Betracht zu ziehen, daß das verkürzte Protein sein Substrat nicht mehr in die für die Reaktion notwendige Konformation bringen kann. Da beim gereinigten Protein TelN Δ 1 die im Rohextrakt beobachtete Topoisomeraseaktivität fehlt (vorläufige Ergebnisse, nicht gezeigt), das Protein also einen im Rohextrakt enthaltenen Kofaktor braucht (z.B. HU), erscheint die zuletzt genannte Hypothese am wahrscheinlichsten. Daraus folgt, daß der N-terminale Bereich des Proteins (AS 1-100) eine Protein-DNA-Interaktionsdomäne enthalten könnte (Abb. 38).

(iii) eine Protein-Protein-Wechselwirkungsdomäne. *In vivo* ist der C-terminale Bereich (AS 450-630) von TelN essentiell (pers. Mitteilung, N. Ravin), *in vitro* aber nicht (4.5.3). Der C-terminale Bereich von TelN hat also offensichtlich eine Funktion, die vom *in vitro*-System nicht erfaßt wird. Die Interaktion mit anderen Replikations- oder Regulationsproteinen erscheint als plausible Erklärung.

5.3 Die Schritte der *telomere resolution* Reaktion

Die Betrachtung der Topologie der *telomere resolution* Reaktion zeigt, daß es sich um ein symmetrisches Substrat handelt, in dem zwei Transesterifikationen stattfinden müssen. Es ist aber nur ein potentielles katalytisches Tyrosin in TelN bekannt. Daraus ergibt sich die

Forderung, daß zwei TelN Moleküle an ein *telRL*-Substrat binden (Abb. 27 und Abb. 39). Die SPR-Messung ergab aber nur ein Verhältnis von 1,5:1 (TelN:*telRL*). Eine mögliche Erklärung hierfür liefert eine genauere Betrachtung der Meßmethode und der zugrundeliegenden Annahmen. Das innere Palindrom von *telRL*, *telO* verhält sich vermutlich in der SPR wie DNA mit einer Zufallssequenz, da es (wie in 4.5.4 beschrieben) nicht zur hochaffinen, sequenzspezifischen Bindungsaktivität beiträgt, was dazu führt, daß in der SPR ein zu niedriges stöchiometrisches Verhältnis von Protein : DNA gemessen wird. Eine weitere Erklärung böte sich, wenn man postuliert, daß der publizierte Korrekturfaktor (nach Speck *et al.*, 1999) beim Vergleich von Protein und DNA in der SPR nicht korrekt ermittelt oder in diesem Experiment nicht anwendbar ist. Eine unkorrekte Bestimmung halte ich jedoch für unwahrscheinlich, da sich der von Speck bestimmte Faktor ($RU_{\text{protein}} = 0,73 RU_{\text{dsDNA}}$) nur unwesentlich von dem für einzelsträngige DNA ermittelten ($RU_{\text{protein}} = 0,79 RU_{\text{ssDNA}}$; Fisher & Fivash, 1994) unterscheidet.

Im einzelnen läßt sich die *telomere resolution* in folgende Reaktionsschritte zerlegen (Abb. 39):

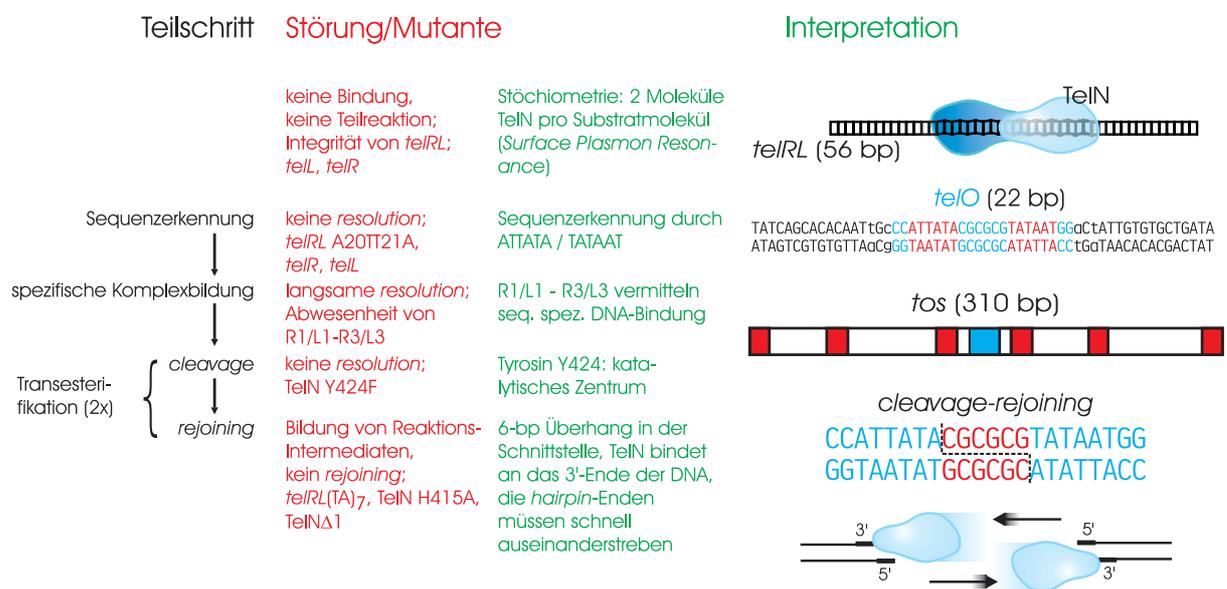


Abb. 39 Teilschritte der *telomere resolution* Details siehe Text und Abb. 12.

(i) Die *telomere resolution* beginnt mit der nicht sequenzspezifischen DNA-Bindung von TelN, die notwendig ist, um das Zielsubstrat *tos*, finden zu können. Alle DNA-Bindungsproteine müssen eine kinetische Barriere überwinden, um ihre Bindungsstelle zu finden. Es gibt verschiedene Mechanismen, die das ermöglichen. (i) Lineare Diffusion entlang des DNA-Moleküls und (ii) *on-off* Diffusion, bis die Bindungsstelle (in diesem Falle also

telRL bzw. *tos*) durch Zufall gefunden ist. Im Falle der linearen Diffusion und auch der *on/off* Diffusion vergrößern die äußeren invertierten Repetitionen R1/L1 und R2/L2 die Zielsequenz. Sie könnten als ‚Wegweiser‘ dienen, die die TelN-Moleküle in Richtung der *telomere resolution site* dirigieren. Die *repeats* könnten aber auch eine *long-range* Konformationsänderung in *telRL* bewirken und so bei der *on/off*-Diffusion die spezifische Bindung von TelN an *telRL* begünstigen. Der nächste Schritt in der *telomere resolution* ist:

(ii) Die Substraterkennung. Diese läuft vermutlich über den ATTATA-Bereich (bzw. TATAAT-Bereich) in *telO*, wo ein möglicher Übergang von B- nach Z-DNA lokalisiert sein könnte (Abb. 37). Die in dieser Arbeit hergestellten *telRL*-Mutanten zeigen, daß der genannte Bereich von *telO* essentiell ist (Abb. 30). Alle nachfolgenden Schritte der *telomere resolution* werden unmöglich, oder sind stark eingeschränkt. Im Falle einer erfolgreichen Substraterkennung folgt:

(iii) eine sequenzspezifische DNA-Bindung. Diese Fähigkeit wird über die invertierten Repetitionen R3/L3 von *telRL* vermittelt. Die Abhängigkeit der sequenzspezifischen DNA-Bindung von diesen Repetitionen ist in Absatz 4.5.5 gezeigt. Eine Mutation in der Erkennungssequenz behindert diesen Schritt. Die sequenzspezifische DNA-Bindung ist der zweite Schritt in der *telomere resolution* und sorgt vermutlich dafür, daß das Enzym für den entscheidenden Schritt der Reaktion in reaktiver Distanz auf *telRL* positioniert ist. Auch kann nicht ausgeschlossen werden, daß zur Stabilisierung des TelN-DNA-Komplexes die beiden beteiligten TelN-Moleküle über das Substrat kooperativ interagieren, da *tell* oder *telR* alleine nicht mehr spezifisch erkannt und prozessiert wird. Der entscheidende und letzte Schritt der *telomere resolution* ist

(iv) die Transesteraseaktivität. Die Transesterifikation findet im zentralen Bereich von *telO* statt. Dies ist in Abschnitt 4.7 gezeigt. Dabei müssen verschiedene Einzelschritte nacheinander in genau festgelegter Reihenfolge ablaufen. Die gesamte *telomere resolution* besteht aus vier einzelnen Transesterifikationen. Die beiden ersten Reaktionen müssen dabei von den beiden beteiligten TelN-Molekülen als konzertierte Aktion durchgeführt werden. Es entsteht eine transiente Zwischenstufe, in der jeweils ein TelN-Molekül an ein 3'-Ende der *cleavage-site* in *telO* gebunden ist (Abb. 39, unten rechts). Anschließend müssen die beiden TelN-Moleküle schnell auseinanderstreben, da ansonsten die Gefahr der Rückreaktion gegeben ist. Die beiden letzten Transesterifikationen, also das Schließen der *hairpins* erfolgt dann unabhängig vom jeweils anderen Protein-DNA-Intermediat. Danach diffundiert das

Enzym von der DNA ab. Es ist unklar, ob das Enzym rezyklisierbar ist, also anschließend für eine weitere *telomere resolution* zur Verfügung steht.

Die Transesterifikation in *telO* erfolgt sehr wahrscheinlich mit einem Überhang von 6 Basenpaaren. Dies geht aus den in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigten Experimenten hervor, in denen die 3'-Bindung von TelN an die DNA in dem Mutantensubstrat pJD105(TA)₇ und die *next-neighbor*-Analyse zu sehen sind (siehe 4.7.1 - 4.7.3).

Die von anderen Autoren (Kobryn & Chaconas, 2002) publizierten Hypothesen zur *telomere resolution* bei *B. burgdorferi* decken sich mit den in dieser Arbeit dargestellten Beobachtungen. Die von Chaconas veröffentlichten Experimente zur *cleavage site* von ResT in der *telomere resolution site* von *B. burgdorferi*, B31/lp17 sind jedoch teilweise unvollständig. Das Experiment zur Bindungspolarität von ResT in *B. burgdorferi* (siehe Kobryn & Chaconas, 2002; Figure 3 C) ist schwer zu interpretieren, da dort nur das 5'-Ende der DNA markiert wurde. Dadurch ist ein Nachweis des an das 3'-Ende der DNA gebundenen ResT-Proteins nur indirekt möglich. Der direkte Nachweis ist nur mit einer 3'-Markierung zu erbringen, wie bei den in Abb. 35 in dieser Arbeit an TelN gezeigten Daten (siehe auch Deneke *et al.*, 2002). Deswegen können die von Chaconas gezeigten Daten das Vorhandensein eines Protein-DNA-Intermediates nicht beweisen. Die Frage, ob im *Borrelia*-System die Transesterifikation mit einem 4-bp Überhang oder 6-bp Überhang stattfindet, wurde dementsprechend nicht diskutiert, da diese Frage nur entschieden werden kann, wenn man weiß, ob das entsprechende Protein an das 3' oder 5'-Ende der DNA bindet.

Die chemische Reaktion ist bei der *telomere resolution* vermutlich ein nukleophiler Angriff des Sauerstoffatoms der OH-Gruppe des aktiven Tyrosins. Eine derartige nukleophile Substitution ist ein häufig anzutreffender Mechanismus bei Tyrosinintegrasen/Rekombinasen (Nunes-Duby *et al.*, 1998). Die Substratkonformation ist bei dieser Reaktion voraussichtlich von entscheidender Bedeutung.

5.4 Die DNA-Substratkonformation: der Schlüssel für die *telomere resolution* Reaktion?

Es gibt mindestens drei theoretisch mögliche Konformationen für den TelN-*telRL*-Komplex während der Transesterifikation.

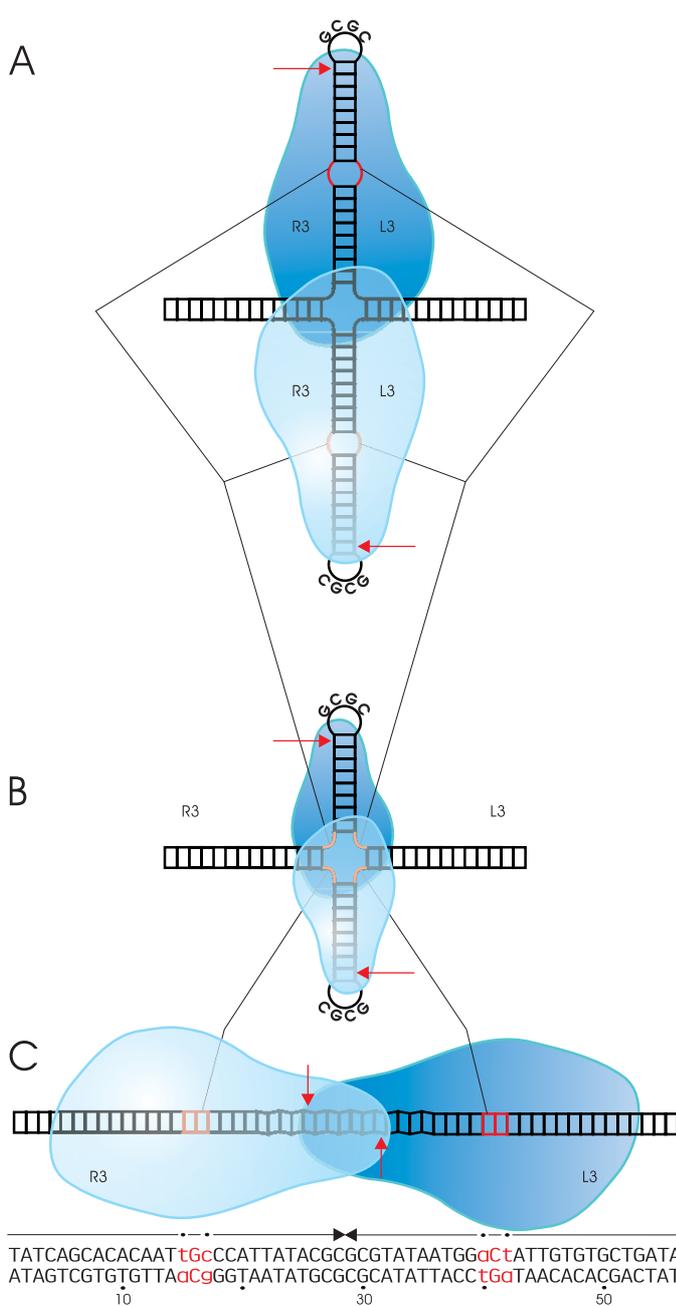
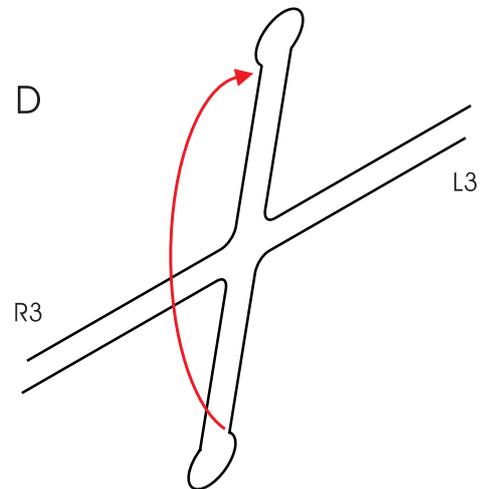


Abb. 40 Modelle für die TelN-*telRL* Interaktion



A: großes *hairpin*-Modell. Die gesamte *telRL*-Region nimmt *hairpin* Konformation ein. Die Transesterifikation muß an den äußeren Enden der beiden *hairpins* stattfinden. B: kleines *hairpin*-Modell. Die *telO*-Region bildet einen *hairpin*. Auch hier muß die Transesterifikation an den Enden der herausgestülpten *hairpins* stattfinden. C: Z-DNA Konformation in der *telO*-Region (B-Z-Modell). Die Unterbrechungen im Palindrom (siehe auch Abb. 12) sind rot dargestellt und mit Linien verbunden, um ihre Position zu kennzeichnen. Die Region mit möglicher Z-DNA Konformation in C ist in Zick-Zack dargestellt.

Rote Pfeile kennzeichnen die Stellen der Transesterifikation in der DNA. D: Modell der Ortsveränderung der beiden DNA-Stränge in *telRL* während zwei der vier Transesterifikationen, bei kruziformer Konformation des Substrats. R3/L3 bezeichnet die invertierten Repetitionen von *telRL*.

i) Die gesamte *telRL*-Region könnte einen *hairpin* bilden (ähnlich einer Holliday-*junction*) d.h. die Transesterifikation würde jeweils an den Enden dieser *hairpins* stattfinden müssen (Abb. 40, A). Diese Konformation ist allerdings aus sterischen Gründen sehr unwahrscheinlich. Der bei der Transesterifikation zu überbrückende Abstand zwischen beiden Protein-DNA-Intermediaten wäre sehr groß, da ja die beiden DNA-Enden mit dem auf der

gegenüberliegenden Seite‘ des *hairpins* befindlichen Gegenstrang verknüpft werden müßten. Dazu müßten die beiden *hairpin*-Enden um jeweils 90° zur Längsachse der DNA umklappen (Abb. 40, D), so daß insgesamt eine Winkelveränderung um 180° stattfinden würde. Bei diesem Rearrangement des Protein-DNA-Komplexes würde der *hairpin* vermutlich dissoziieren und damit bestände die Gefahr einer unvollständigen Reaktion. Es sind aber *in vitro* keine Intermediate bei der Reaktion des Wildtyp-Proteins beobachtet worden. Außerdem wäre die Reaktion in dieser Konformation vermutlich zweistufig und daher relativ langsam. Der beobachtete schnelle Substratumsatz (Abb. 16) spricht gegen diese Möglichkeit. Zusätzlich deutet die in der SPR gemessenen Bindungskinetik (4.5.6) auf eine einstufige Reaktion hin, da es sich um eine Reaktionskinetik erster Ordnung handelt (Daten nicht gezeigt).

ii) Die *telO*-Region könnte einen kleineren *hairpin* bilden (Abb. 40, B). Dies ist ebenfalls unwahrscheinlich, da auch in diesem Falle die beiden *hairpin*-Enden wie in (i) eine große Strecke überwinden müßten (Abb. 40, D). Auch ergibt sich in dieser Konformation ein weiteres Problem. TelN ist ein anisometrisches Protein (Achsenverhältnis 1:1,8) und die in dieser Arbeit vorgestellten DNaseI-*footprint* Experimente zeigen, daß fast die gesamte *telRL*-Sequenz von TelN bedeckt ist (4.5.7). Es ist aber schwer vorstellbar, daß zwei TelN Moleküle die gesamte, kruziforme *telRL*-Sequenz bedecken können, da diese Struktur mehr oder weniger quadratisch ist (siehe 4.1 und Abb. 40, D).

iii) Die *telRL*-Region kann in B-DNA, oder im Gleichgewicht mit Z-DNA Konformation vorliegen (Abb. 40, C). In diesem Falle würden sich die oben beschriebenen Anforderungen nicht ergeben, und eine weitere Forderung des Reaktionsmechanismus könnte erfüllt werden: direkt nach der Transesterifikation, möglicherweise bereits nach der Bildung des kovalenten TelN-DNA-Intermediates, müssen die beiden erzeugten DNA-Enden mit sofort schnell auseinanderstreben, um eine Rückreaktion zu vermeiden. Die Energie für dieses Auseinanderstreben kommt möglicherweise aus einer Konformationsänderung von Z-DNA nach B-DNA.

In welcher Konformation - B-DNA oder Z.-DNA - liegt das DNA-Substrat aber vor? Z-DNA Konformation wurde in *telO* vorhergesagt (Rybchin & Svarchevsky, 1999), aber auch eine B-DNA Konformation ist möglich. Nachfolgend sollen die Stärken und Schwächen der beiden Modelle analysiert werden.

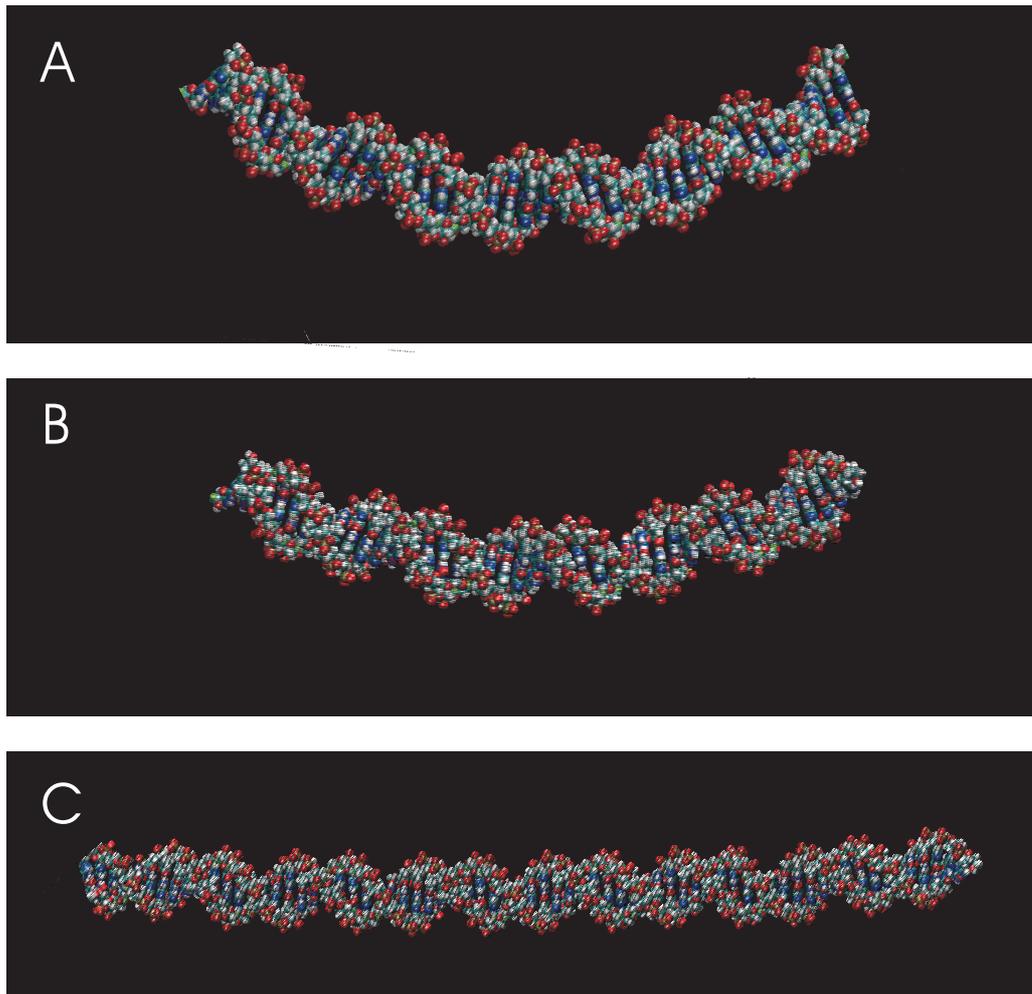


Abb. 41 Mögliche Krümmung verschiedener *telomere resolution sites*

Computersimulation der Krümmung verschiedener *telomere resolution sites* in B-DNA Konformation. Die Simulation wurde mit dem *bend.it* online-server des *International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology* in Triest, Italien erstellt (<http://www2.icgeb.trieste.it/~dna/>). Das *bend.it* Programm errechnet die Krümmung der DNA basierend auf der Sequenz. Die Krümmung wird als Vektorsumme der Dinukleotideometrien *roll*, *tilt*, *twist* und *angle* nach dem Algorithmus von Godsell und Dickerson (Godsell & Dickerson, 1994) errechnet. Das Ergebnis wird in Grad/DNA-Helixdrehung ausgedrückt (10,5°/Umdrehung würde 1°/Basenpaar entsprechen) und ist im Molekülmodell dargestellt. Teil A zeigt *telRL* des Bakteriophagen N15 (56 bp), Teil B *telRL* des Bakteriophagen PY54 (42 bp) und Teil C das *replicated telomere* des linearen Plasmids lp17 aus *B. burgdorferi* (70 bp).

Computersimulationen deuten darauf hin, daß *telRL* in B-DNA Konformation aufgrund der alternierenden Pu/Py-Basenpaare im Zentrum des *telO* Palindroms gekrümmt sein könnte (Abb. 41, Munteanu *et al.*, 1998). Das hätte Konsequenzen für den Ablauf der Reaktion im Falle einer B-Konformation der DNA.

(i) Krümmung der DNA würde bedeuten, daß die Reaktionsanordnung einfach symmetrisch ist. Eine gebogene DNA durchbricht die Symmetrie auf der Längsachse, nur die Symmetrie auf der Querachse bleibt erhalten. Durch den DNA-*bend* würden möglicherweise die TelN-Proteine sterisch behindert. Es ist denkbar, daß eine solche sterische Behinderung die notwendige Energie liefert, um die nach der ersten Transesterifikation entstandenen DNA-Enden schnell auseinander streben zu lassen (siehe 5.3, iv und Abb. 39).

(ii) In der B-Form der DNA werden 10,5 bp für eine vollständige Helixwindung benötigt. Da aber die Transesterifikation wahrscheinlich mit einem Abstand von 6 bp stattfindet, wären die beiden *cleavage-sites* auf der DNA um ca. 34° gegeneinander versetzt. Die Folge davon wäre, daß auch die TelN-Proteine versetzt und damit asymmetrisch angeordnet wären. Das passiert sowohl, wenn beide TelN-Moleküle in derselben Furche der DNA liegen - ganz gleich, ob kleine oder große Furche -, als auch dann, wenn die beiden Moleküle nicht in derselben Furche der DNA liegen und ist unabhängig von einer eventuellen Krümmung der DNA.

Die Z-DNA Hypothese wird von der Beobachtung gestützt, daß Z-DNA 12 bp pro Helixdrehung hat. Damit würde man ein einfacheres Modell als bei einer B-DNA Konformation erhalten, weil die *cleavage-sites* vermutlich 6 bp, also genau eine halbe Helixdrehung, voneinander entfernt sind. Die Konsequenz wäre, daß die beiden *cleavage-sites* auf einer Seite der DNA liegen würden, da es sich ja um Strang und Gegenstrang handelt. Die an der Reaktion beteiligten TelN-Moleküle können auf zweierlei Weise an die Z-DNA binden.

(i) Es ist möglich, daß beide Proteine in derselben Furche der DNA binden und so auf sich gegenüber liegenden Seiten der DNA lokalisiert wären.

(ii) Die TelN-Moleküle könnten auf einer Seite des DNA-Stranges liegen. Würde man entlang der DNA blicken, lägen die beiden TelN-Proteine in diesem Falle übereinander und würden sich in unterschiedliche Furchen befinden. Diese Komplexarchitektur ist deswegen möglich, weil in Z-DNA Konformation die kleine und große Furche gleich groß sind. Diese Möglichkeit ist in B-DNA Konformation nicht gegeben.

Z-DNA Konformation im zentralen Abschnitt von *telO* scheint jedoch nicht nur theoretisch möglich zu sein, sondern auch experimentelle Indizien deuten darauf hin. Die *telomere resolution* wird von Polyaminen wie Spermin und Cobalthexamin besonders stark stimuliert. Die genannten Substanzen begünstigen Z-DNA Konformation, es wird also das

Gleichgewicht zwischen B-DNA und Z-DNA zugunsten der Z-DNA verschoben (Kim *et al.*, 1997).

Auch wenn das Substrat ausschließlich in B-DNA Konformation vorliegt, ist es immer noch möglich, daß im Substrat Z-DNA Konformation durch die spezifische Bindung von TelN induziert wird. Diese Hypothese wird von der experimentellen Beobachtung gestützt, daß eine Hälfte von *telRL*, also nur *telL* oder *telR*, kein Substrat mehr für TelN ist. Weder eine sequenzspezifische DNA-Bindung noch die Transesterifikation können in diesen Substraten ablaufen (Abb. 30, pJD105Δ8.7).

Aufgrund der angeführten theoretischen Betrachtung der möglichen DNA-Konformationen und der experimentellen Beobachtungen favorisiere ich die Hypothese einer Z-DNA Konformation im Zentrum von *telO*, während der *telomere resolution* durch TelN.

Die Frage nach der Substratkonformation könnte durch Untersuchung des TelN-*telRL*-Komplexes mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie geklärt werden, weil Z-DNA im Protein-DNA-Komplex ein charakteristisches Spektrum aufweist, da sie eine andere Elliptizität ergibt, als B-DNA. Auch die Hypothese einer gekrümmten B-DNA ist experimentell nachprüfbar, da permutiert geschnittene, gebogene DNA-Stücke eine zu nicht gekrümmter DNA unterschiedliche gelelektrophoretische Mobilität haben (Koo *et al.*, 1986).

5.5 Gemeinsamkeiten zwischen eng verwandten *telomere resolution* Systemen

Ein Ansatz zum weiteren Verständnis der *telomere resolution* ist es, Enzyme (TelN, ResT, PY54-TelN), die ähnliche Reaktionen katalysieren, mit TelN zu vergleichen (Abb. 23), das gleiche gilt für deren Substrate (Abb. 42). Während der Vergleich der TelN-Analoga Aufschluß über die Domänenstruktur der Proteine zu geben vermag, kann der Vergleich der DNA-Substrate Hinweise auf den Mechanismus der Reaktion geben.

Das System mit der größten Ähnlichkeit zur *telomere resolution* in N15 ist jenes des Bakteriophagen PY54. Das Tel-Enzym in PY54, welches die *telomere resolution* katalysiert, hat die größte Zahl identischer Aminosäuren im Vergleich zu TelN von N15. Auch die *telomere resolution site* von PY54 ist sehr ähnlich zu *telRL* von N15, da auch in PY54 eine relativ kurze (42 bp), palindromische DNA-Sequenz mit einem zentralen (CG)₃-Bereich zu finden ist (Abb. 42). Das *telomere resolution*-System aus *B. burgdorferi* scheint wesentlich weniger eng mit dem in N15 zu findenden System verwandt zu sein. Das die *telomere*

resolution katalysierende Enzym ResT zeigt nur wenige mit TelN von N15 identische Bereiche. Auch dient das *telomere resolution*-System von *B. burgdorferi* der Erhaltung eines linearen Bakteriengenoms.

Der Phage N15 hat mit *telRL* die komplexeste der verglichenen Sequenzen. Sie besteht aus invertierten Repetitionen und einem zentralen Palindrom. Die *telomere resolution sites* von PY54 und *B. burgdorferi* enthalten lediglich ein Palindrom. Nur für *telRL* war das Vorhandensein von Z-DNA vorhergesagt (Rybchin & Svarchevsky, 1999), es fällt jedoch auf, daß bei allen diesen *telomere resolution* Systemen das DNA-Substrat ebenfalls einen Bereich mit potentieller Z-DNA Konformation hat. Dabei handelt es sich im Falle von N15 und PY54 sowohl um CG als auch um TA alternierende Basenpaare, während im Falle von *B. burgdorferi* nur TA alternierende Basen das Zentrum der *resolution site* bilden. Aber in *telO* aus N15 können die CG alternierenden Basen, bei zumindest teilweiser Bewahrung der Funktionalität, durch TA alternierende Basen ersetzt werden (Abb. 34). Umgekehrt ist es jedoch unmöglich, in *telO* die TA Basen durch CG zu ersetzen, da dann im N15-System TelN die *telomere resolution* nicht mehr durchführen kann (4.6.1 und 4.7.2). Der Grund dafür ist wahrscheinlich der Verlust der Sequenz ATATTA / TATAAT in *telO*, was dazu führt, daß TelN sein Substrat nicht mehr erkennen kann.



Abb. 42 DNA-Sequenzvergleich verschiedener *telomere resolution sites*

Gezeigt sind die *telomere resolution sites* des Bakteriophagen N15, PY54 und *B. burgdorferi* (lineares Plasmid lp17). Die Länge in bp ist rechts von der Sequenz angegeben. Alternierende Pu/Py-Basenpaare sind rot/blau hinterlegt. Gleiche Nukleotide in allen drei Sequenzen sind grün hinterlegt, ähnliche (gleiche oder komplementäre Base in allen drei Sequenzen) sind gelb hinterlegt. Nukleotide, die nicht zum Palindrom der *resolution site* gehören, sind orange. Symmetrisch angeordnete und identische Basenpaare sind durch Punkte über den Sequenzen gekennzeichnet.

Der Bereich der invertierten Repetitionen R3/L3 von N15 (Abb. 42) weist wesentlich weniger Übereinstimmungen mit den zwei anderen *resolution sites* auf. Es fällt aber auf, daß es in allen drei Sequenzen ein identisches A bzw. T gibt, welche die Zentren der Palindrome

im Abstand von 8 bp zum Symmetriezentrum flankieren. Bei N15 reicht der Bereich vorhergesagter Z-DNA Konformation mit 14 bp bis auf ein bp an dieses A/T heran, bei PY54 und *B. burgdorferi* hingegen sind immer noch 10 bp potentielle Z-DNA vorhanden. Hier könnte im Laufe der Evolution eine ‚stumme Mutation‘ in diesen Organismen stattgefunden haben. Die gleichen und ähnlichen Basenpaare rechts und links des Bereichs potentieller Z-DNA scheinen in den *resolution sites* periodisch im Abstand von drei- bis vier bp aufzutreten. Ob dieser Tatsache allerdings Bedeutung zukommt, kann nur durch weitere Experimente geklärt werden.

Der Bereich von potentieller Z-DNA in allen Substraten läßt die Vermutung zu, daß in den N15-verwandten Systemen der gleiche enzymatische Mechanismus Verwendung findet, TelN also repräsentativ für eine neue Subklasse der Tyrosinintegrasen ist.

5.6 Perspektiven

Wie bereits von Ravin *et al.*, 2000 postuliert und in der Einleitung erwähnt (Abb. 5), erfolgt die Replikation des N15-Prophagen *in vivo* wahrscheinlich über zirkuläre Dimer-Intermediate. Diese sind inzwischen bei N15 *in vivo* beobachtet worden (Ravin *et al.*, 2001), und auch für *B. burgdorferi* wurden solche Dimer-Intermediate postuliert (Chaconas *et al.*, 2001). Es ist daher wahrscheinlich, daß diese auch in einem potentiellen *in vitro*-System zu finden sein werden.

Das Verständnis der *telomere resolution* in N15 (und damit analog auch in *B. burgdorferi* oder *A. tumefaciens*) könnte die Möglichkeit eröffnen, Erkrankungen wie die Borreliose über einen anderen Weg als der Antibiotikatherapie zu bekämpfen. Durch die gezielte Entwicklung von Protelomerase-Hemmern könnte der zunehmenden Antibiotikaresistenz bei pathogenen Organismen wenigstens in diesem Falle wirksam entgegengetreten werden.

Bei der Induktion des Phagen λ , also dem Übergang vom lysogenen in den lytischen Modus, muß das Phagen genom wieder aus dem Chromosom seines Wirtes *E. coli* ausgeschnitten und rezirkularisiert werden. Für die Exzision des λ -Genoms ist eine Excisionase, das λ Xis-Protein, essentiell. λ Xis befähigt die Integrase λ Int dazu, die sequenzspezifische Rekombination der DNA zum zirkulären Phagen zu katalysieren, kehrt also die normale Reaktionsrichtung von λ Int um. Der Mechanismus dieser Reaktion ist nicht aufgeklärt. Es ist lediglich bekannt, daß λ Xis einen scharfen Knick in der DNA in der Nähe

der Zielsequenz POB' für λ Int induziert (Hendrix *et al.*, 1982). Für die Existenz eines Hilfsproteins wie λ Xis gibt es in der *telomere resolution* von N15 bisher keine Hinweise. Bei N15 ist aber genau wie bei λ für den Übergang vom Prophagenstadium in den lytischen Zyklus eine „Rückreaktion“ zwingend notwendig. Das lineare Plasmid unterscheidet sich topologisch von der zirkulären Form. Die Genorganisation ist im linearen Plasmid permutiert (Abb. 2). Daraus ergibt sich die Vorhersage einer zweiten möglicherweise wirtskodierten Komponente, im System der *telomere resolution*. Alternativ könnte TelN die Rückreaktion alleine, unter von der Hinreaktion unterschiedlichen Bedingungen, wie z.B. Änderungen im pH, der Temperatur, Ionenkonzentration, etc. katalysieren. Diese Änderungen der Reaktionsbedingungen könnten durch Stress für *E. coli* (Nahrungsmangel, UV-Bestrahlung, etc.) ausgelöst werden.