

Zusammenfassung der Doktorarbeit

Mit der Entdeckung der ersten, natürlich vorkommenden Z-DNA-bindenden Proteindomäne, $Z\alpha$, am N-Terminus des RNA editing Enzyms ADAR1 erhob sich die Frage nach den strukturellen und funktionalen Charakteristika, die für eine spezifische Interaktion zwischen $Z\alpha$ und Z-DNA verantwortlich sind. In dieser Doktorarbeit wurde die hochaufgelöste Struktur der $Z\alpha$ -Domäne aus humanem ADAR1 mittels mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie in Lösung bestimmt. Die Proteinstruktur wurde mit Hilfe von systematischer, ortsspezifischer Mutagenese, Interaktionskartierung und biochemischen Bindungsexperimenten in einen funktionalen Zusammenhang gestellt. In der systematischen Mutagenesestudie wurden eine Reihe von Aminosäureresten identifiziert, die die Bindungsaffinität an Z-DNA reduzieren, wenn sie zu Alanin mutiert werden. Diese Daten erlauben in Verbindung mit der komplementären Information aus der Interaktionskartierung die Wechselwirkungsfläche zwischen $Z\alpha$ und Z-DNA in wässriger Lösung zu bestimmen. Aminosäurereste aus α -Helix 3 und dem C-terminalen β -Faltblatt von $Z\alpha$ bilden eine zusammenhängende, positiv geladene Oberfläche, die so geformt ist, daß sie mit dem negativ geladenen Rückgrat von Z-DNA interagieren kann. Die biochemischen Bindungsstudien zeigten, daß zwei $Z\alpha$ -Domänen an einem $d(\text{CG})_3\text{T}_4(\text{CG})_3$ -Hairpin-Molekül in der Z-DNA Konformation mit einer Dissoziationskonstante von 30 nM binden.

Der Vergleich der NMR-Struktur von ungebundenem $Z\alpha$ mit der Kristallstruktur des $(Z\alpha)_2$ /Z-DNA Komplexes [6] zeigte, daß 7 der insgesamt 9 Z-DNA kontaktierenden Aminosäureresten in der freien Proteinstruktur bereits so positioniert sind wie in der gebundenen Form, obgleich diese Reste an der Proteinoberfläche liegen. Diese „vorpositionierten“ Aminosäurereste setzten die freie Bindungsenergie (ΔG) stark herab, als sie zu Alanin mutiert wurden, während die 2 flexiblen, Z-DNA kontaktierenden Aminosäurereste die freie Bindungsenergie nicht veränderten. Dies läßt darauf schließen, daß $Z\alpha$ vorpositionierte Aminosäurereste verwendet, um den Entropiebetrag, der für die Bindung an Z-DNA aufzubringen ist, zu minimieren.

Durch eine Ähnlichkeitssuche in der Proteinstrukturdatenbank (PDB) mit dem Programm DALI [206] wurden mehr als ein Duzend strukturhomologe ($\alpha+\beta$) helix-turn-helix B-DNA bindende Proteine, wie z.B. Histon H5, CAP, DtxR, E2F-4 u.a., gefunden. Der Vergleich der NMR-Struktur von $Z\alpha$ mit den Kristallstrukturen dieser homologen Domänen gebunden an ihre Ziel-DNA deutet darauf hin, daß die Bindung von $Z\alpha$ an B-DNA durch sterische Hinderung an 2 Positionen benachteiligt wird. In der Übereinanderlagerung von $Z\alpha$ mit einem Teil der homologen Komplexstrukturen zeigte sich in der kleinen Grube der B-DNA eine sterische Hinderung durch die längere α -Helix 1 von $Z\alpha$, die durch eine vorausgehende α -Helix zusätzlich verlängert. Bei dem anderen Teil der homologen Komplexstrukturen ergab sich eine sterische Hinderung zwischen der großen Grube der B-DNA und dem aromatischen Ring von $Z\alpha$ -Rest Y177. Zusammenfassend läßt sich schließen, daß $Z\alpha$ bevorzugt an Z-DNA bindet, weil $Z\alpha$ eine derart geformte Bindungsoberfläche besitzt, die energetisch vorteilhafte Interaktionen mit Z-DNA, nicht aber vergleichbare Interaktionen mit B-DNA, erlaubt.