

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Allgemeines.....	1
1.2 Bakterielle DNA-Verteilung.....	1
1.3 Plasmid-Verteilung.....	3
1.3.1 Plasmide mit hoher Kopienzahl.....	5
1.3.2 Plasmide mit geringer Kopienzahl.....	6
1.3.2.1 Toxin-Antitoxin Systeme.....	7
1.3.2.2 <i>par</i> -Systeme.....	8
Walker-Typ ATPasen.....	9
MinD von <i>Escherichia coli</i>	10
Soj von <i>Bacillus subtilis</i>	11
Actin-ähnliche ATPase (Typ II)	13
1.3.3 Plasmide der <i>Inc18</i> Familie.....	13
1.3.3.1 Segregation von pSM19035.....	14
ω -Protein bindet an die <i>parS</i> -DNA.....	15
<i>parA</i> -homologes δ -Gen.....	16
1.4 Zielsetzung	18
Vorarbeiten.....	18
Ziel dieser Arbeit.....	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Materialien.....	20
2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Kits.....	20
2.2 Biochemische und molekularbiologische Methoden.....	22
2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese.....	22
2.2.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	23
2.3 Gentechnische Methoden.....	24
2.3.1 Primer-Design.....	24
2.3.2 PCR.....	24
2.3.3 Restriktion, Ligation und Transformation.....	26
2.3.4 DNA-Isolierung aus Agarosegelen.....	27
2.3.5 Plasmidisolierung und Sequenzierung.....	27

2.3.6	Klonierung von ORF δ	27
2.3.7	Herstellung von bakteriellen Stammkulturen.....	28
2.4	Proteinpräparation.....	28
2.4.1	Bakterienkultivierung.....	28
2.4.2	Zellaufschluss mittels French [®] -Press.....	29
2.4.3	Auftrennung der Zellbestandteile mittels Ultra-Zentrifugation.....	29
2.4.4	Ionenaustausch-Chromatographie.....	29
2.4.4.1	Kationenaustausch-Chromatographie an Heparin.....	30
2.4.4.2	Anionenaustausch-Chromatographie an PL_SAX.....	30
2.4.5	Konzentrieren von Proteinlösungen.....	31
2.4.6	Konzentrationsbestimmung nach Bradford).....	31
2.4.7	Gelpermeations-Chromatographie (GPC).....	31
2.5	Materialcharakterisierung.....	31
2.5.1	MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	31
2.5.2	N-terminale Sequenzierung.....	32
2.5.3	Dynamische Lichtstreuung (DLS).....	32
2.5.4	Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD).....	33
2.5.5	Quervernetzung des δ -Proteins mit Glutardialdehyd	34
2.6	Kristallisation.....	34
2.6.1	<i>Sitting-Drop</i> -Verfahren.....	35
2.6.2	Dampfdiffusionsmethode nach <i>Hanging-Drop</i>	35
2.6.3	K, Na-Tartrat Kristallisationsbedingung.....	36
2.6.4	Co-Kristallisation von δ mit ATP γ S.....	36
2.6.4.1	Die HEPES-Bedingung.....	37
2.7	Montierung von Kristallen in Glaskapillaren.....	38
2.8	Cryo-Bedingungen für Kristalle.....	38
2.9	Kristallographische Methoden.....	38
2.9.1	Aufnahme von Röntgen-Diffraktionsdaten.....	39
2.9.2	Prozessierung von gemessenen Reflexen.....	40
2.9.3	Strukturbestimmung.....	40
2.9.3.1	Molekularer Ersatz.....	41
2.9.4	Verfeinerung und Modellbau.....	42
2.9.5	Abbildungen und Koordinatenanalyse.....	43
2.10	Funktionsanalyse.....	44

2.10.1 Enzymaktivitätsbestimmungstest (ATPase-Assay).....	44
2.10.2 Sedimentation.....	47
2.10.3 Elektronenmikroskopie.....	47
3 Ergebnisse und Diskussion.....	49
3.1 Biochemische Analysen an das δ-Protein	49
3.1.1 Der Oligomere-Status des δ -Proteins in der Lösung.....	50
3.1.2 Quervernetzung des δ -Proteins.....	51
3.1.3 Messung der thermischen Stabilität des δ -Proteins.....	52
3.1.4 MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	53
3.1.5 ATPase-Aktivität.....	53
3.1.6 Dynamische Lichtstreuungs-Versuche.....	57
3.1.7 Sedimentation.....	59
3.2 Nukleoprotein-Filamente von δ_2.....	61
3.3 Subzelluläre Lokalisation des δ_2-Proteins in <i>B. subtilis</i>.....	63
3.4 Kristallographischer Teil der Analyse von δ.....	66
3.4.1 Kristallisation.....	66
3.4.2 Co-Kristallisation von δ in Komplex mit ATP- γ -S.....	68
3.4.2.1 Die hexagonale Kristallform.....	68
3.5 Datensammlung.....	69
3.6 Strukturbestimmung.....	70
3.7 Kristallstruktur des Komplexes δ•ATPγS/Mg²⁺.....	72
3.7.1 Hauptkettenverlauf und Tertiärstruktur von δ	72
3.8 Quartärstruktur des δ_2-Homodimers.....	76
3.9 Die Kristallpackung.....	78
3.9.1 Monomer-Monomer Kontaktfläche.....	79
3.10 Temperaturfaktorverteilung.....	82
3.11 Aktive Zentren und konservierte Domänen.....	84
3.11.1 Konservierte P-Loop-Region.....	84
3.11.2 Die ATP-Bindetasche.....	86
3.11.3 Das gebundene Magnesium-Ion.....	90
3.11.4 Das Hepes-Molekül.....	93
3.12 Die N-terminale Helix.....	94

3.13 C-terminale Helix-Turn-Helix Motiv	96
3.14 Das Oberflächenpotential	97
3.15 Vergleich der homologen Strukturen	98
3.15.1 Der Vergleich mit dem Soj-Protein.....	102
3.15.2 Der Vergleich mit dem Zellteilungsregulator MinD.....	106
3.15.3 Der Vergleich mit dem Nitrogenase Eisenprotein NifH.....	107
3.15.4 Die Ligase (Dethiobiotin Synthetase).....	109
3.15.5 HypB.....	109
3.16 Plasmidpartitionierungs-Modell	110
3.16.1 Modellierung des <i>par</i> -Systems (δ_2 - ω_2 - <i>parS</i>).....	111
4 Zusammenfassung	115
5 Summary	117
6 Literaturverzeichnis	119
7 Anhang	133
8 Danksagung	137