

# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeines

Die Entdeckungen auf dem Gebiet der Molekularbiologie in den letzten zwei Jahrzehnten haben gezeigt, dass unsere Vorstellung über die prokaryontische Zelle als eine einzelne, einfache und unstrukturierte Entität mit einer einzelnen zirkulären DNA (*desoxyribonucleic acid*), zu einfach ist. Während die DNA bei Eukaryonten in Form von Chromosomen im Zellkern zu finden ist, liegt sie bei Prokaryonten als Nucleoid frei schwimmend im Zytosol bzw. an mehreren Punkten der Innenfläche der Plasmamembran verankert vor. Der Verlust oder auch die nicht vollständige Weitergabe der genetischen Information an den Nachkommen bzw. an die Tochterzellen führt unmittelbar zum Zelltod. Dadurch wird die Erhaltung bzw. die Weitergabe der chromosomalen DNA streng geregelt und gesichert (Bork *et al.*, 1992; Hiraga, 1992; Ireton *et al.*, 1994).

Die bakterielle Zellteilung und besonders die Mechanismen der Weitergabe der genetischen Information sind jedoch bis jetzt nicht hinreichend untersucht worden. So war z. B. bis vor kurzem nicht bekannt, dass auch bei Bakterien Actin-ähnliche Filamente existieren, die bei der Zellteilung, analog zu der Spindelapparat-Bildung bei der Mitose, die aktive Segregation von Plasmiden (siehe Kapitel 1.3) sicherstellen (van den Ent *et al.*, 2002; Salje *et al.*, 2009).

## 1.2 Bakterielle DNA-Verteilung

Als Speichermolekül der genetischen Information spielt die DNA eine zentrale Rolle bei allen Lebewesen. Der Zellteilungsprozess und die damit zusammenhängende Chromosomverteilung bei eukaryontischen Zellen wurden bereits detailliert untersucht und verstanden (Mitose und Meiose). Trotz ihrer Bedeutung konnten die ersten Erkenntnisse über die prokaryontische Zellteilung bzw. die DNA-Verteilung jedoch erst in den letzten Jahren gewonnen werden (Gerdes *et al.*, 2004). Diese Erkenntnisse basieren überwiegend auf der *in vivo* Lokalisation von *oriC*- (*origin of replication* = Replikationsursprung C) und *terC*- (*termination of replication* = Terminationsstelle C) DNA-Regionen von *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli*. Die subzelluläre Lokalisation von Proteinen und DNA beruht auf Techniken, die die Markierung von Proteinen mit GFP (*green fluorescence protein* = Grün Fluoreszierendes Protein) beinhalten (GFP-Fusionen) oder auf Färbemethoden, die die Visualisierung von DNA in der Bakterienzelle mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) bewerkstelligen, sowie auf Mutationsstudien der an der DNA-Verteilung beteiligten *par*-Gene (*par* für Partitionierung) von *Caulobacter crescentus* (Quisel *et al.*, 1999; Easter und Gober, 2002; Fige *et al.*, 2003).

Unter Verwendung von *in vivo* Protein- und DNA-Nachweisverfahren konnten die unterschiedlichen subzellulären Positionen von *oriC* (in der Viertel-Zell-Position oder in der Nähe

von Zellpolen) und *terC* (überwiegend in der Mittel-Zell-Position) eindeutig lokalisiert werden (Gordon *et al.*, 1997; Niki und Hiraga, 1997; Webb *et al.*, 1997). Die rapide Bewegung dieser Regionen, die unabhängig vom zellulären Wachstum sowohl in *E. coli* als auch in *B. subtilis* stattfand (Webb *et al.*, 1998), deutete auf einen Mitose-ähnlichen Mechanismus hin, der die *oriC*-Regionen aktiv trennt bzw. auf die spezifischen zellulären Positionen schiebt (Gerdes, *et al.*, 2000).

Weitere Studien zur DNA-Verteilung zeigten, dass SopA/SopB des F-Plasmids und ParA/B des P1-Plasmids von *E. coli* für die exakte Weitergabe der chromosomalen DNA erforderlich sind (Nordstrom und Austin, 1989; Hiraga, 1992). Die Deletion der chromosomalen *parA*- und *parB*-Gene von *B. subtilis* (*soj* und *spo0J*), die an der DNA-Verteilung beteiligt sind und sich in unmittelbarer Nähe der *oriC* befinden, führte zur Erhöhung der Anzahl von Nucleoid-freien Zellen (Ireton *et al.*, 1994). Die alleinige Deletion von *soj* zeigte keinen messbaren Effekt auf die chromosomale DNA-Verteilung. Nur die Doppel-Mutante (*soj*- und *spo0J*-Mutante) zeigte eine erkennbare Wirkung. Dieses Phänomen deutete auf die essentielle Bedeutung des ParB-homologen Spo0J-Proteins hin, das an die acht *parS*-ähnlichen Sequenzen (AT-reiche DNA-Regionen) in der Nähe von *oriC* bindet (Lin und Grossman, 1998). Um ein Plasmid in *B. subtilis* zu stabilisieren, genügte nur eine Spo0J-Bindungsregion (eine *parS*-Region), wobei die Stabilisation des Plasmids von der Existenz beider Gene (*soj* und *spo0J*) streng abhing. Dies galt als der indirekte Beweis dafür, dass der *parAB*-Locus in der aktiven Verteilung der chromosomalen DNA von *B. subtilis* beteiligt war. Weitere unterstützende Beweise lieferten zytologische Lokalisationsstudien von Soj und Spo0J. Die subzelluläre Lokalisation von Spo0J stimmte mit der zellulären Position der *oriC* überein (Lewis und Errington, 1997; Lin und Grossman, 1998; Teleman *et al.*, 1998), während sich Soj entweder in den Zellpolen befand oder sich mit dem Nucleoid colokalisieren ließ (Marston und Errington, 1999; Quisel *et al.*, 1999). Auch eine Oszillation des Soj-Proteins vom Nucleoid zum Nucleoid (oder von Pol zu Pol) in Abhängigkeit von Spo0J konnte nachgewiesen werden (Webb *et al.*, 1998). Der Mechanismus dieser Oszillation des Soj-Proteins konnte erst in den letzten zwei Jahren näher untersucht werden (K. Doubrovinski und M. Howard, 2005; Ebersbach und Gerdes, 2005; C.M. Hester und J. Lutkenhaus, 2007).

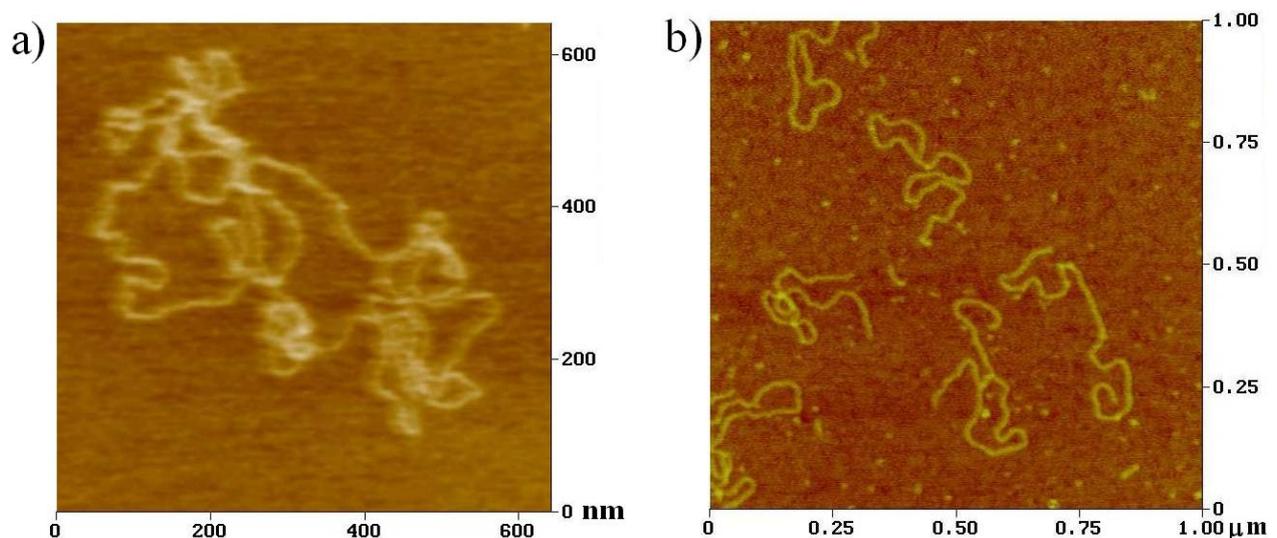
Auch das Chromosom von *Caulobacter crescentus* weist in der Nähe von *oriC* *parA*- und *parB*-Gene auf (Mohl und Guber, 1997). Hier sind die *par*-Gene für die Lebensfähigkeit der Zellen essentiell und ihre Überexpression führt unmittelbar zu Chromosom-Verteilungsanomalien. Das ParB-Protein bindet an die AT-reiche Region (*parS*-DNA) flussabwärts (*downstream*) von *parB*, und vor der Zellteilung befinden sich die ParA- und ParB-Proteine an den beiden Zellpolen. Diese ersten Untersuchungen an *E. coli*, *B. subtilis* und an *C. crescentus* hatten gezeigt, dass die *par*-Gene in die aktive Segregation ihrer Chromosomen involviert sind (siehe weiter Kapitel 1.3). Es wurden mehrere *par*-Systeme identifiziert, die sowohl an der Chromosom-Verteilung als auch an der extra-chromosomalen DNA-Verteilung (Plasmidverteilung) beteiligt sind. Alle bis jetzt

identifizierten und untersuchten *par*-Systeme waren chromosomal kodiert. Die Plasmid-kodierten *par*-Systeme der Plasmide R1, F und RK2 aus dem gram-negativen *E. coli* waren zwar bereits identifiziert, jedoch konnten bisher die beteiligten ParA-Proteine nicht genau untersucht werden. Auch bei dem gram-positiven *B. subtilis* war das Bild nicht anders. Auch hier wurden erst die chromosomalen *par*-Systeme genau analysiert, während der Mechanismus der Plasmid-kodierten *par*-Systeme unklar blieb.

Das non-konjugative Plasmid pSM19035, welches ursprünglich aus dem gram-positiven *Streptococcus pyogenes* isoliert wurde, war aufgrund seines Toxin-Antitoxin-Systems ( $\zeta$ - $\epsilon$ ) bereits untersucht worden (Ceglowski *et al.*, 1993a; Ceglowski *et al.*, 1993b; Sitkiewicz *et al.*, 1999, de la Hoz *et al.*, 2000; Camacho *et al.*, 2002; Meinhart *et al.*, 2003). Nach weiterer Analyse des *par*-Locus von pSM19035 jedoch konnte ein zweites Plasmid-Erhaltungssystem identifiziert werden. Als möglicher Kandidat des Plasmid-kodierten *par*-Systems in einem gram-positiven Bakterium konnte dieses System näher untersucht werden. Dieses *par*-System des Plasmids pSM19035 bzw. das ParA-homologe  $\delta$ -Protein ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

### 1.3 Plasmid-Verteilung

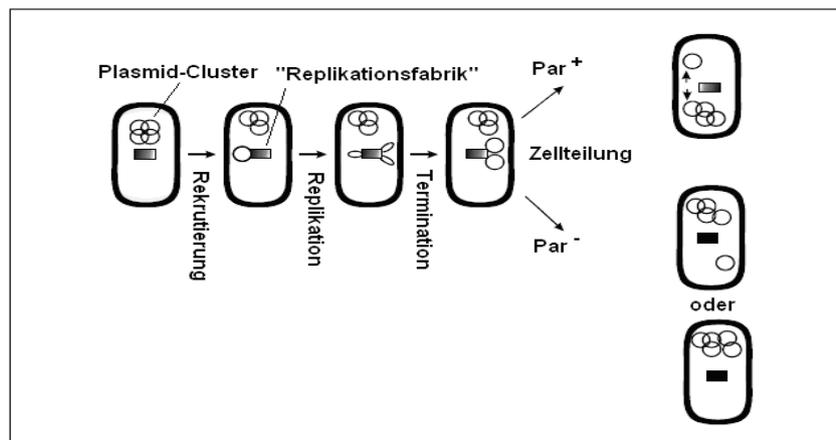
Plasmide sind extra-chromosomale autonome genetische Entitäten, deren Existenz für die Bakterien vorteilhaft ist. Im Gegensatz zur chromosomalen DNA sind Plasmide kurze (1-10 Kbp), ringförmige DNA-Moleküle, die unabhängig vom Wirtschromosom transkribiert, repliziert und auf die Nachkommen verteilt werden. Eine weitere Eigenschaft der Plasmide ist ihre Topologie; in der Zelle liegen sie als entspannte, offene Ringe (*relaxed* DNA) oder als super-spiralisierte Elemente (*supercoiled* DNA) vor (siehe Abb. 1).



**Abb. 1** Raster-Kraft-Mikroskopie (AFM, *Atomic force microscopy*)-Images **a)** von gereinigter zirkulärer Plasmid-DNA, **b)** von linearisierter Plasmid-DNA (Bonin, *et al.*, 2006).

Meistens verleihen Plasmide der jeweiligen Bakterienzelle Selektionsvorteile wie z. B. Resistenz gegen Antibiotika. Ist der Selektionsvorteil durch den Erhalt eines Plasmids einmal gegeben, so wird sich diese Bakterienzelle in der Population verbreiten, während Zellen ohne Plasmid dezimiert werden. Die dauerhafte Erhaltung der Plasmide ist wichtig, wenn in einer Bakterienpopulation ein schwankender Selektionsdruck herrscht. Im Laufe der Evolution wurden die Mechanismen der Zellteilung bzw. der DNA-Verteilung unter dem Druck der natürlichen Selektion immer weiter optimiert und an die neuen Umweltbedingungen angepasst.

Unter den gegebenen Umwelt- und Wachstumsbedingungen in einer bestimmten Wirtszelle kontrollieren Plasmide ihre eigene Replikation, und zwar so, dass sie mit einer bestimmten Anzahl von Kopien vorkommen. Die Anzahl der Plasmide pro Zelle variiert je nach Wirtsstamm von zwanzig bis zu hundert Kopien. Plasmide haben verschiedene Systeme (bzw. Gen-Kassetten) entwickelt, die sicherstellen, dass sie in einer wachsenden Bakterien-Population dauerhaft erhalten werden (Hiraga, 1992; Nordström und Austin, 1989). Ein solches System kontrolliert während der Zellteilung die Plasmid-Verteilung so, dass jede Tochterzelle mindestens eine Plasmid-Kopie erhält (Hiraga, 1992, 2000; Møller-Jensen *et al.*, 2000; Nordström und Austin, 1989).



**Abb. 2** Plasmid-Cluster (engl. *cluster* „Bündel“, „Haufen“, „Klumpen“) (Plasmid-„Klumpen“) und ihre Replikation sowie Verteilung in Bakterien ausgestattet mit oder ohne Par-Systemen (Par<sup>+</sup> und Par<sup>-</sup>) (Nordström, K. und Gerdes, K., 2003). Demnach werden die Plasmide in der „Replikationsfabrik“ vervielfältigt und nach der Beendigung (Termination) der DNA-Replikation auf die Tochterzellen verteilt. Abhängig von der jeweiligen Plasmidklasse sind die Plasmide entweder in Clustern angesammelt und zufällig verteilt (Par<sup>-</sup>) oder werden mit Hilfe der *par*-Proteine aktiv partitioniert.

Darüber hinaus haben die Forschungen in den letzten Jahren gezeigt, dass zwischen der bakteriellen DNA-Verteilung und der DNA-Replikation ein enger Zusammenhang besteht (Gordon und Wright, 2000; Koppes *et al.*, 1999; Lemon und Grossman, 2000, 2001; Sawitzke und Austin, 2001). Demzufolge findet die Replikation chromosomaler DNA in der Mitte der Zelle in s. g. „Replikationsfabriken“ statt. In dem Modell sind die Replisomen stationär (stabil lokalisiert) und die DNA wird durch einen „Checkpoint“ in der Zelle (siehe Abb. 2) hindurch gezogen. Dies deutet auf einen Prozess hin, in dem die Chromosom-Verteilung und die DNA-Replikation gleichzeitig

stattfinden, was dazu führt, dass die neu gebildeten *oriC*-Kopien von der Mitte der Zelle aktiv zu der neuen Position (Viertel-Zell-Position) bewegt werden. Diese Position macht später die Mitte der entstehenden Tochterzelle aus (Gordon *et al.*, 1997; Niki und Hiraga, 2000; Niki *et al.*, 2000). Ähnlich werden auch die Plasmide in der zentral lokalisierten „Replikationsfabrik“ (Onogi *et al.*, 2002) vervielfältigt (siehe Abb. 2). Dem abgebildeten Modell nach werden Plasmide abhängig von der jeweiligen Plasmidklasse entweder in Form von Clustern zufällig verteilt ( $Par^-$ ) oder aktiv segregiert ( $Par^+$ ). Die Bildung der Plasmid-Cluster taucht sowohl bei  $Par^-$ -Zellen als auch bei  $Par^+$ -Zellen auf, was darauf hindeutet, dass dieses Phänomen nicht durch den alleinigen Verlust bzw. die Abwesenheit der *par*-Gene verursacht wird. Es ist noch nicht geklärt, wie die Plasmid-Cluster-Bildung genau funktioniert und wie die Plasmidkopien zusammenhalten werden. Eine generelle Sequenzhomologie könnte die Bildung dieser Plasmid-spezifischen Cluster ermöglichen (K. Nordström und K. Gerdes, 2003).

Die Wachstumsbedingungen einer Bakterien-Population in der Natur sind Schwankungen wie Kohlenstoffmangel, UV-Licht, Trockenheit, usw. unterworfen. Begegnet eine Population solchen Schwankungen, so reagiert sie mit einer Reihe von Überlebensstrategien, was als „generelle Stress-Antwort“ bezeichnet wird (G. Storz und R. Hengge, 2000). Bei prokaryontischen Mikroorganismen geht diese „Stress-Antwort“ mit der Verschiebung der Wachstumsphase einher, in der eine Reihe von lebenswichtigen zellulären Vorgängen wie Replikation, Transkription, Translation und Stoffwechselmechanismen unterdrückt werden (Hengge-Aronis, R., 2000). Da die DNA-Replikation, somit auch die Plasmid-Replikation davon unmittelbar betroffen sind, ist für die Plasmide mit geringer Kopienzahl eine besondere Herausforderung, solche Situationen bzw. die daraus resultierenden Kopienzahl-Schwankungen zu überleben (Gerdes, 2000). Offenbar haben Plasmide mit geringer Kopienzahl im Laufe der Evolution viele Mechanismen akkumuliert, um sich in einer Bakterienpopulation unter einem Selektionsdruck durchsetzen zu können. Diese Plasmide weisen Plasmidverteilungs-Systeme auf, die eine „Besser-als-Zufall-Verteilung“ (*better-than-random segregation*) ermöglichen und durch die oben genannten *par*-Systeme vermittelt werden. Die Existenz solcher Plasmide, die sich überwiegend, wenn nicht hauptsächlich, bei pathogenen Mikroorganismen durchsetzen bzw. verbreiten konnten, ist eventuell auf diese im Laufe der Evolution durch den Selektionsdruck optimierten Mechanismen zurückzuführen. In den folgenden Kapiteln werden diese Mechanismen näher beschrieben.

### 1.3.1 Plasmide mit hoher Kopienzahl

Da Schwankungen in der Plasmidanzahl (bei Plasmiden mit geringer Kopienzahl) die Selektionsvorteile einer Zelle gefährden, sind Plasmidverteilungs-Mechanismen notwendig, die resistent gegenüber Schwankungen der Wachstumsbedingungen sind. Es wurde lange vermutet, dass *E. coli* einige aktive (d. h. Energie abhängige) Mechanismen besitzt (Jacob *et al.*, 1963), die

während der Zellteilung eine effiziente Verteilung des bakteriellen Chromosoms und der Plasmide mit geringer Kopienzahl zu den Tochterzellen sicherstellen. Theoretisch ist die aktive Segregation auch eine Option für die Plasmide mit hoher Kopienzahl. Sie ist aber nicht essentiell, da bei hoher Kopienzahl die auf Zufall basierte Segregation ähnlich effektiv sein kann.

Die Verteilung der natürlich vorkommenden Plasmide mit hoher Kopienzahl (*high-copy-number* Plasmide, mehr als 100 Kopien pro Zelle) in einem Bakterienstamm basiert in der Regel auf einer zufälligen Verteilung der Plasmide auf die Tochterzellen („*random segregation*“). Da der Mechanismus stark von der Kopienzahl der Plasmide abhängt, spielt die Kontrolle der Kopienzahl hierbei eine entscheidende Rolle.

Die Plasmide wie ColE1, die in *E. coli* mit hoher Kopienzahl vorliegen, werden während der Zellteilung zufällig verteilt, und in der Regel entstehen Plasmid-freie Zellen nur selten. Die Kopienzahl der Plasmide in einer wachsenden Zell-Population variiert jedoch stark, und es kommt zur Bildung von s. g. Multimeren bzw. Plasmid-Clustern, die die zufällige Verteilung einschränken und zu einer erhöhten Zahl Plasmid-freier Zellen führen können („*copy number depression*“) (Summers, D., 1998). Diese Multimere der Plasmide mit hoher Kopienzahl, wie ColE1 von *E. coli*, werden durch das ortsspezifische Rekombinations-System (Xer-cer) zu Monomeren aufgelöst. Für die Rekombination werden die heterodimere Rekombinase XerCD und zwei weitere akzessorische Proteine (ArgR und PepA) benötigt, die zum einen die Rekombination aktivieren und zum anderen intermolekulare Interaktionen vermeiden (Summers D., 1998; Colloms *et al.*, 1996; Stirling *et al.*, 1988 und 1989).

### 1.3.2 Plasmide mit geringer Kopienzahl

Die Verteilung der in der Natur weit verbreiteten Plasmide mit hoher Kopienzahl wird durch das „*random segregation*“-System gewährleistet. Es gibt aber eine weitere Klasse von Plasmiden, die meistens wenige Kopien (1-3) pro Zelle aufweisen, und deshalb als „*low-copy-number*“ bezeichnet wurden. Diese Plasmide sind unter den Prokaryonten sowohl vertikal als auch horizontal weit verbreitet und meistens für die Erschließung neuer ökologischer Nischen bzw. für die Pathogenität eines Mikroorganismus verantwortlich (C. M. Thomas, 2000). Der durch Lebensmittel übertragbare und *Bacillus cereus*, der Anthrax-Erreger *Bacillus anthracis* und der für Insekten pathogene und daher als ein kommerzielles Pestizid verwendete *Bacillus thuringiensis* stellen Beispiele für den Beitrag der Plasmide zu der bakteriellen Variabilität dar. Trotz ihrer Ähnlichkeit weisen diese Mikroorganismen völlig verschiedene biologische Funktionen auf, was auf das Resultat einer horizontalen Plasmidverbreitung zurückgeführt werden kann (Read *et al.*, 2003).

Die *low-copy-number* Plasmide waren im Laufe der Evolution aufgrund ihrer geringen Kopienzahl ständig damit konfrontiert, dass in der Wirtpopulation die Anzahl der Plasmid-

erhaltenden Zellen zurückging (Bildung von Plasmid-Multimeren, „*copy number depression*“, Inkompatibilität usw.). Der Selektionsdruck auf diese extra-chromosomalen DNA-Elemente führte letztlich zur Akkumulation der für die Plasmid-Erhaltung kodierenden Gene. So verfügen diese Plasmide mit geringer Kopienzahl über mehr als einen Mechanismus, der ihrer Verbreitung dient. Die bekannten Mechanismen der Plasmid-Erhaltung werden in drei Klassen eingeteilt (Gerdes *et al.*, 2004; Gordon, G. S. und Wright, A., 2000; Hiraga, S., 2000; Gerdes *et al.*, 1997).

1) Zufalls-Verteilung (*random segregation*), Mechanismen, die zur Maximierung der Plasmidkopienzahl beitragen (Alonso *et al.*, 1996; Summers, D., 1998). Wie oben bereits beschrieben, bestimmt dieses System überwiegend das Schicksal von *high-copy-number* Plasmiden.

2) Toxin/Antitoxin-Systeme (TA-Systeme) oder PSK-Systeme (*postsegregational killing*) zur Plasmid-Erhaltung (Jensen und Gerdes, 1995; Gerdes, K., 2000).

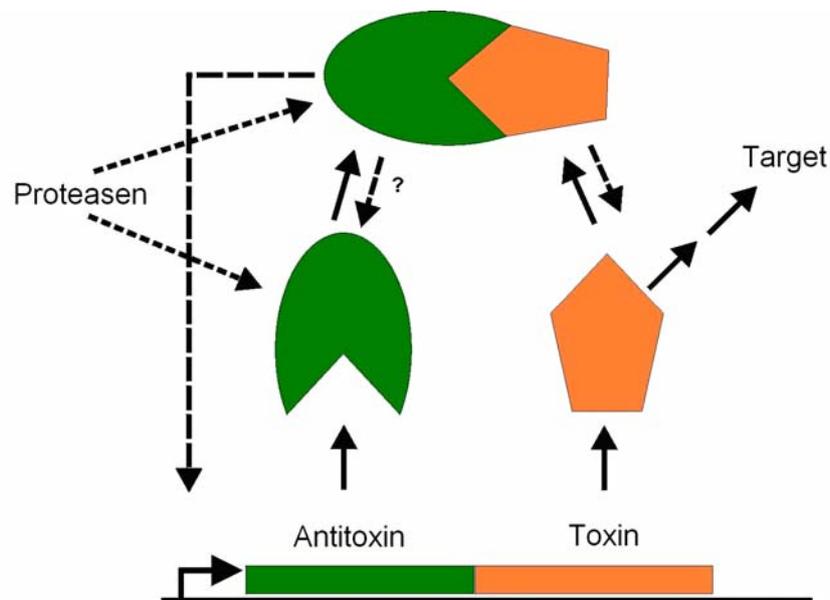
3) Aktive Plasmidverteilungs-Systeme (Partitionierung, *par*-System). Dabei wird mindestens eine Plasmidkopie durch die aktive Verschiebung an die Tochterzelle weitergegeben (Niki und Hiraga, 1997; Gordon *et al.*, 1997).

Der „*random segregation*“ Mechanismus wurde im Kapitel 1.3.1 näher beschrieben. In den folgenden Kapiteln wird auf die weiteren Mechanismen wie das TA- und *par*-System näher eingegangen.

### 1.3.2.1 Toxin-Antitoxin Systeme

Dieser Mechanismus der Plasmid-Verteilung wurde erstmals bei Plasmiden mit geringer Kopienzahl und breitem Wirtsspektrum entdeckt (Gerdes *et al.*, 1997; Gerdes, K., 2000). Das System basiert auf zwei wechselwirkenden Komponenten und kann in zwei Untergruppen aufgeteilt werden: (i) Die Komponenten des Systems sind „instabile“ RNAs, die als Antitoxin die Translation von „stabilen“ toxin-kodierenden mRNAs inhibieren. Der am besten charakterisierte Typ ist der *hok/sok*-Locus (*host killing/suppressor of killing*) des Plasmids R1 von *E. coli*. (Gerdes *et al.*, 1997). (ii) Die regulierenden Produkte sind zwei Proteine: ein „instabiles“ Antitoxin und ein „stabiles“ Toxin (TA-Systeme) (siehe Abb. 3). Die Wirkung des Toxins wird dadurch aufgehoben, dass das Antitoxin an das Toxin bindet und es maskiert. Als Toxin wird ein Protein bezeichnet, das aktiv in die lebenswichtigen zellulären Prozesse eingreift und so den Zelltod herbeiführt. Bekommt die Tochterzelle während der Zellteilung kein Plasmid, das für die beiden Proteine kodiert, so werden die beiden Proteine durch Proteasen abgebaut (nur im Falle, wenn die beiden Komponente des Systems Proteine sind). Da das als Toxin agierende Protein in der Regel stabiler ist als das Antitoxin, reduziert sich die Konzentration des Antitoxins gegenüber dem Toxin schneller. Das verbleibende Toxin entfaltet seine Wirkung und die Plasmid-freie Zelle wird abgetötet (Apoptose).

Zur den bis jetzt näher untersuchten TA-Systemen gehören u.a. folgende Systeme: CcdB/CcdA des Plasmids F, ParE/ParD des Plasmids RK2, RelE/RelB des Plasmids P307, Phd/Doc von P1,  $\zeta / \epsilon$  des Plasmids pSM19035 usw. (L. van Melderen, 2002; Jiang *et al.*, 2002; Pederson *et al.*, 1999 und 2002; Camacho *et al.*, 2002; Meinhart *et al.*, 2003). Im Bezug auf die Plasmid-Erhaltung weisen diese TA-Systeme unterschiedliche Plasmid-stabilisierende Eigenschaften auf (Gerdes, 2000). Das Plasmid pSM19035, das ursprünglich aus *S. pyogenes* isoliert wurde und dort in niedriger Kopienzahl vorkommt, besitzt eine Plasmid-stabilisierende Eigenschaft von mehr als 1000-fach (Ceglowski *et al.*, 1993a). Dieses Plasmid weist in seiner SegB-Region (Seg für Segregation), drei Proteine auf ( $\epsilon$  als Antitoxin,  $\zeta$  als Toxin und  $\omega$  als Transkriptionsregulator, die das TA-System repräsentieren. Die Strukturen des heterotetrameren  $\epsilon_2\zeta_2$ -Komplexes und die des homodimeren  $\omega_2$ -Proteins sowie die des  $\omega_2$ -DNA-Komplexes ( $\omega_2\Delta 19$ -DNA) konnten in unserer Arbeitsgruppe aufgeklärt werden (Meinhart *et al.*, 2003; Murayama *et al.*, 2002; Weihofen *et al.*, 2006).



**Abb. 3** Das Modell des genetischen und funktionellen Aufbaus eines TA-Locus (nach Gerdes, 2000). Unmittelbar nach der Expression von beiden Proteinen (Antitoxin und Toxin) formt sich der TA-Komplex. Das Fragezeichen symbolisiert die offene Frage nach der Komplexform des Antitoxins beim Abbau durch Proteasen (Lon oder Clp).

### 1.3.2.2 *par*-Systeme

Dieses sowohl bei chromosomaler DNA als auch bei Plasmiden nachgewiesene DNA-Verteilungs-System setzt sich aus zwei *trans*-wirkenden Proteinen (ParA und ParB) und einer oder mehreren *cis*-wirkenden Zentromer ähnlichen DNA-Sequenzen (*parS*) zusammen und ist für die aktive Partitionierung von DNA während der Zellteilung verantwortlich (Davis und Austin, 1988; Funnell, 1988; Gerdes, 2000; Ebersbach und Gerdes, 2005; Hayes und Barilla, 2006).

Das erste Gen der *par*-Loci kodiert in der Regel für eine ATPase, die in zwei verschiedene Hauptklassen unterteilt werden, nämlich (i) die Walker-Typ ATPase (ParA-Typ) und (ii) die Actin-ähnliche ATPase (ParM-Typ). Das zweite Gen (*parB*) kodiert für ein sequenz-spezifisches DNA-bindendes Protein (ParB), das an eine Partitionierungsstelle (*parS*, *parC* oder *sopC*) bindet (Ebersbach und Gerdes, 2005; Funnell, 2005; Hayes und Barilla, 2006).

### (i) Walker-Typ ATPasen

Im Gegensatz zum Actin-ähnlichen ParM-Typ (Typ II) kann die ParA-Typ-ATPase in zwei weitere Unterklassen aufgeteilt werden, nämlich den ParA-Typ-Ia und den ParA-Typ-Ib (Hiraga, S., 2000; Gerdes, 2000; Errington J., 2003; Lutkenhaus J. und Addinall S. G. 1997; Ebersbach und Gerdes, 2005).

**Tab. 1** Übersicht einiger funktionell und strukturell untersuchter *par*-Systeme. Typ-Ia und Ib (Walker Typ-ATPase) und Typ II (Actin-ähnliche ATPase). (\*Typisierung nach Gerdes, *et al.*, 2000). n. b. (nicht bekannt).

<i>par</i> -Locus	ParA-Protein	Typ *	Organismus	ParA-Struktur (PDB)
<i>parAB</i> und <i>parS</i>	ParA	Ia	P1 von <i>E. coli</i>	n.b.
<i>sopAB</i> und <i>sopC</i>	SopA	Ia	F von <i>E. coli</i>	n.b.
<i>incC-korB</i>	IncC	Ia	RK2 von <i>E. coli</i>	n.b.
<i>parFG</i> und <i>parS</i>	ParF	Ib	TP228 von <i>S. newport</i>	n.b.
<i>parAB</i> und <i>parS</i>	ParA	Ib	pTAR von <i>A. tumefaciens</i>	n.b.
<i>parAB</i> und <i>parC1-C2</i>	ParA	Ib	pB171 von <i>E. coli</i>	n.b.
<i>minCDE</i>	MinD	Ib	<i>E. coli</i> (chromosomal)	1hyq
<i>soj-spo0J</i> und <i>parS(1-8)</i>	Soj	Ib	<i>T. thermophilus</i> (chromosomal)	2Bej
$\delta$ - $\omega$ und <i>parS1-2-3</i>	$\delta$ (Delta)	Ib	pSM19035 von <i>S. pyogenes</i>	(diese Arbeit)
<i>parMR</i> und <i>parC</i>	ParM	II	R1 von <i>E. coli</i>	1mwm
<i>mreB-setB</i> und <i>parC</i>	MreB	II	<i>E. coli</i>	1jcg

Die beiden ATPase-Typen unterscheiden sich dadurch, dass die Typ-Ia-Proteine (ParA des Plasmids P1 und SopA des Plasmids F oder IncC von *E. coli*) eine N-terminale ca. 100 Aminosäuren lange HTH-Domäne (*Helix-Turn-Helix*) aufweisen, die für die Autoregulation zuständig ist (Gerdes *et al.*, 2000; Surtees und Funnell, 2003). Durch die Bindung an die Operatorregionen in ihren Promotoren regulieren die Typ-Ia-ATPasen ihre eigene Transkription. Die DNA-Bindungsdomäne dieser ParA-Proteine befindet sich im N-Terminus (Hayas *et al.*, 1994; Radnedge *et al.*, 1998). Dass jedoch die Typ-Ib-ATPasen keine solche DNA-bindenden Domänen in ihrem N-terminalen Ende aufweisen und ihre eigene Transkription nicht regulieren, steht im Einklang damit, dass die ParB-Proteine vom Typ-Ib-Locus die gesamten *par*-Operons durch die

Bindung an den *upstream*-Bereich (flussaufwärts) des *parAB*-Operons regulieren (Kalnin *et al.*, 2000).

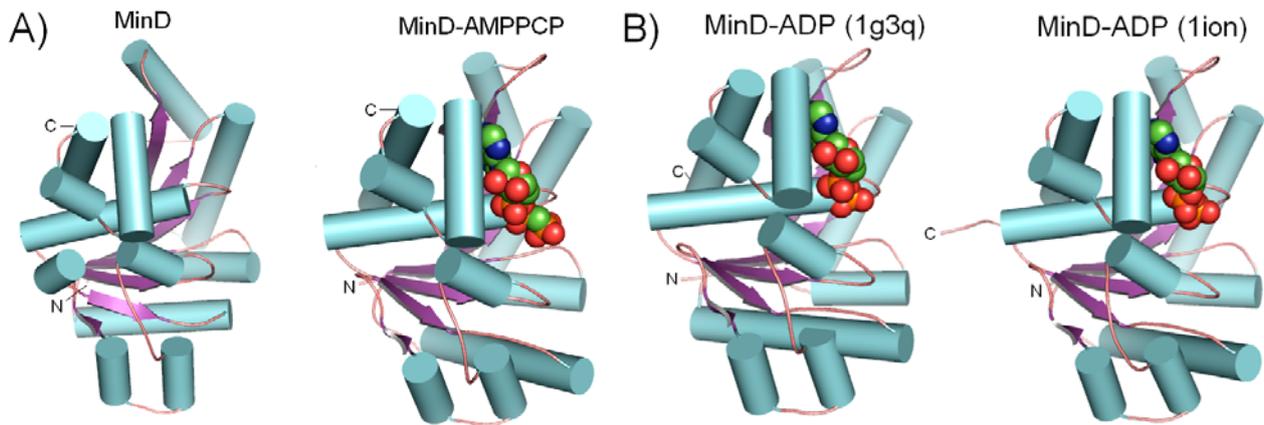
Trotz der relativ hohen Anzahl von molekular und biochemisch untersuchten Vertretern dieser Gruppe der ATPasen, sind bis jetzt nur MinD von *E. coli* und Soj von *B. subtilis* bzw. ihre jeweiligen Homologen aus dem Archaea-Reich strukturell und funktionell untersucht worden; nämlich MinD von *Archaeoglobus fulgidus*, MinD von *Pyrococcus furiosus* und Soj von *Thermus thermophilus* (Cordell, S. C. und Lowe, J., 2001; Hayashi *et al.*, 2001; Sakai *et al.*, 2001; Leonard *et al.*, 2005).

### **MinD von *E. coli***

Als Walker-Typ ATPase des *minCDE*-Systems ist MinD zusammen mit zwei weiteren Proteinen (MinC und MinE) im oszillatorischen Mechanismus (Nucleoid-Oszillation) bzw. in der Regulation der Zellteilung in *E. coli* beteiligt (de Boer *et al.*, 1991 und 1992; Hu und Lutkenhaus, 2001). Wenngleich viele ungeklärte Vorgänge bei dem erwähnten DNA-Verteilungssystem noch offen sind, konnten folgende Zusammenhänge bereits geklärt werden: MinD interagiert im Hefe-Zwei-Hybrid-System direkt mit MinC (Huang *et al.*, 1996), wobei die ATPase-Aktivität für die Aktivierung von MinC benötigt wird (de Boer *et al.*, 1991); andererseits interagiert MinD mit MinE und führt damit zur Lokalisierung von MinE in der Mitte der Zelle (Raskin und de Boer, 1997). In dem gram-positiven Bakterium *B. subtilis* enthält der *min*-Locus nur die beiden Gene *minC* und *minD*, jedoch ohne irgendein *minE* homologes Gen. Stattdessen spielt ein nicht-homologes Protein, nämlich DivIVA dieselbe Rolle wie MinE in der Zellteilungsphase (Edwards und Errington, 1997).

Bis jetzt sind vier Strukturen von MinD bekannt; nämlich Apo-Protein MinD von *A. fulgidus* (1hyq) (Cordell und Löwe, 2001), MinD-AMPPCP (1g3r) und MinD-ADP von *P. furiosus* (1g3q) (Hayashi *et al.*, 2001) und MinD-ADP von *P. horikoshii* (1ion) (Sakai *et al.*, 2001). In allen bis jetzt veröffentlichten Daten taucht MinD ausschließlich als Monomer auf, sowohl wenn es alleine ist als auch wenn es mit nicht-hydrolysierbaren ATP-analogen AMPPCP oder mit ADP kristallisiert wurde (im Gegensatz dazu bilden die anderen homologen und strukturell bekannten ParA-Proteine in ihrer Nukleotid-bindenden Form (wie Soj-ADP) Dimere).

MinD unterscheidet sich von den übrigen Proteinen der ParA-Familie dadurch, dass es aufgrund seiner C-terminalen amphipathischen Helix, welche an die Lipid-Doppelschicht bindet, einer ATP- und Membran-abhängigen Selbst-Assoziation ausgesetzt ist (Lutkenhaus und Sundaramoorthy, 2003).



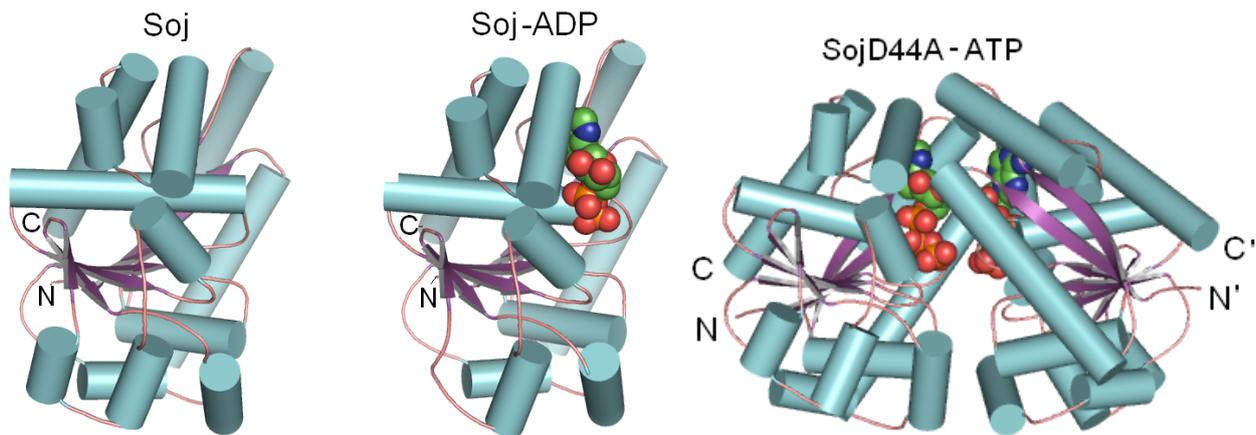
**Abb. 4** Die bekannten homologen Strukturen von MinD. **A)** MinD-Apo-Protein von *A. fulgidus* (Cordell, und Löwe, 2001) und MinD-AMPPCP von *P. furiosus* (Hayashi *et al.*, 2001). **B)** MinD-ADP von *P. furiosus* (Hayashi *et al.*, 2001) und MinD-ADP von *P. horikoshii* (Sakai *et al.*, 2001). Die  $\beta$ -Faltblätter sind als lilafarbene Pfeile,  $\alpha$ -Helices als hellblaue Zylinder und die Schleifen als orangefarbene Bänder dargestellt. Die jeweiligen Liganden (ADP und AMPPCP) sind als CPK-Modelle abgebildet.

Im Unterschied zu den Typ-Ia-ATPasen (~370-400 Aminosäuren) sind die Typ-Ib-Proteine kurz (~260-300 Aminosäuren), binden die DNA sequenz-unspezifisch, haben keine N-terminalen DNA-bindenden Helix-Turn-Helix-Motive (HTH) und kontrollieren nicht die Expression ihrer *par*-Loci (Gerdes *et al.*, 2000). Zu der Unterklasse der ParA-Typ-Ib ATPase gehören unter anderem ParA von pBT171, ParF vom *multidrug resistance* Plasmid TP228, das  $\delta$  (ParA) von pSM19035 und das chromosomal kodierte Soj-Protein (ParA) (Gerdes *et al.*, 2000; Hayes und Barilla, 2006; Leonard *et al.*, 2005).

### **Soj von *B. subtilis***

Soj, wie alle anderen Proteine der ParA-Familie, gehört zusammen mit dem bakteriellen Zellteilungsregulator MinD und dem Nitrogenase Eisenprotein NifH zu einer großen Familie der ATPasen (Koonin, 1993). Als ATPase ist Soj (ParA) zusammen mit Spo0J (ParB) für die stabile Verteilung von Plasmiden verantwortlich, indem es direkt bei der vom *parS*-Spo0J geleiteten Partitionierung mitwirkt (Lin und Grossman, 1998). Soj kann auch an die Promotor-Regionen binden und dadurch die Inhibierung der Transkription von mehreren Sporulations-Genen beeinflussen, wobei Spo0J diesem Effekt entgegenwirkt (Ireton *et al.*, 1994; Quisel *et al.*, 1999; Quisel und Grossman, 2000). Durch neue Studien wurde weiterhin nachgewiesen, dass Soj von *T. thermophilus* ein ATP-abhängiges „Sandwich“ Dimer bildet (siehe Abb. 5, SojD44A-ATP), dass es eine Dimerisierungs-abhängige DNA-Bindungsaktivität aufweist und schließlich die ATP-Hydrolyse durch die N-terminalen Reste von Spo0J stimuliert wird (Leonard *et al.*, 2005). Für Soj konnte durch *in vitro* Versuche gezeigt werden, dass für die Stimulierung der ATP-Hydrolyse nur die ersten 20 Reste des N-Terminus von Spo0J wesentlich sind und dabei Arg10 eine entscheidende Rolle spielt (Leonard, *et al.*, 2005).

Die Interaktion zwischen ParA und ParB wurde bereits für die ParA-Familie-Proteine von *C. crescentus* nachgewiesen. Für ParB von *C. crescentus* wurde gezeigt, dass es für das ParA-Protein als ein Nukleotid-Austauschfaktor fungiert, indem es den rapiden Austausch von ADP für ATP stimuliert (Quisel *et al.*, 1999; Easter und Gober, 2002; Figge *et al.*, 2003). Auch für die weiteren ParA-Familie-Proteine wie ParB des Plasmids P1 und SopB des Plasmids F konnte nachgewiesen werden, dass ihre N-terminalen Regionen für die Interaktion mit ParA/SopA als Determinanten fungieren (Radnedge *et al.*, 1998; Figge *et al.*, 2003; Ravin *et al.*, 2003).



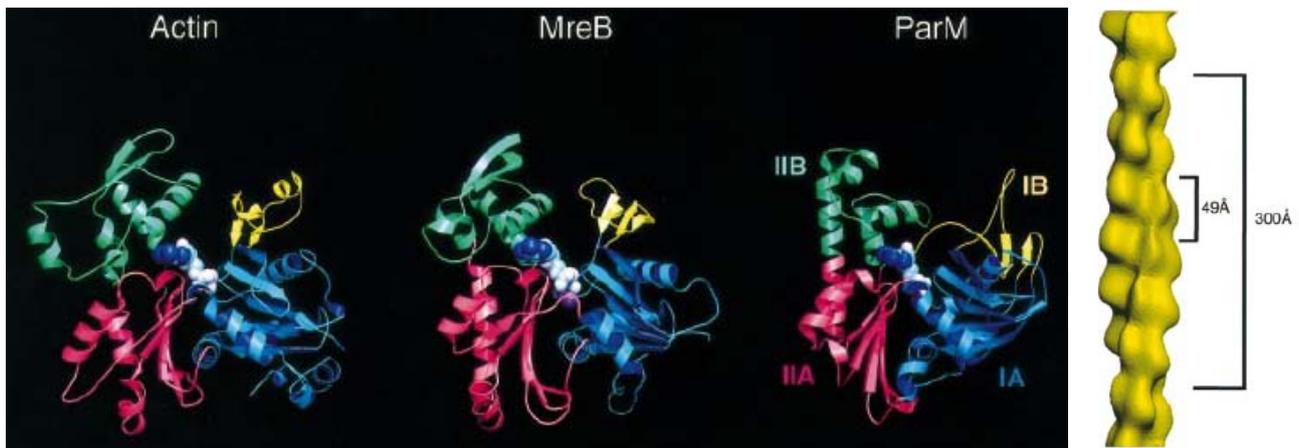
**Abb. 5** Die bekannten Strukturen des ParA-homologen Proteins Soj-Apo-Protein (PDB-Eintrag 1wcv) und seiner Nukleotid-(ADP)bindende Form (PDB-Eintrag 2bej) sowie die Mutante SojD44A von *T. thermophilus* (Leonard *et al.*, 2005), die im Komplex mit ATP ein Dimer bildet (PDB-Eintrag 2bek).

Das ParB Protein vom Typ-Ia (ParB des Plasmids P1 und SopB des Plasmids F) leitet die Repressor-Aktivität von ParA und SopA ein, indem es mit diesen interagiert (Funnell, 2005; Hiraga, 1992; Surtees und Funnell, 2003). Im relativ gut untersuchten P1 System bindet das homodimere ParB an die *parS*-DNA und formt einen Nukleoprotein-Komplex (Davis und Austin, 1988; Funnell, 1988; Schumacher und Funnell, 2005). Das ParB der Typ-Ib-Unterklasse ist hingegen weniger einheitlich. Im Gegensatz zum *trans*-wirkenden ParB von Typ-Ia (~300-350 Reste lang) gibt es innerhalb der ParB-Typ-Ib-Unterklasse eine Subgruppe, die mittlere Proteingröße (~200-300 Reste) aufweist und mit Hilfe ihrer HTH-Domäne die DNA erkennt (z. B. Spo0J). Die andere Subgruppe dagegen umfasst kleinere Proteine (~70-100 Reste), die mit Hilfe ihrer zwei antiparallelen  $\beta$ -Faltblätter die DNA erkennen und eine Ribbon-Helix-Helix (RHH)-Faltung besitzen (z. B.  $\omega$ -Protein von pSM19035) (Ebersbach und Gerdes, 2005; Gerdes *et al.*, 2000; Weihofen, *et al.*, 2006). Dieser Typ von Proteinen reguliert die Expression von *par*-Genen und interagiert mit mehr als einer *cis*-wirkenden DNA-Region (Ebersbach und Gerdes, 2005; Funnell, 2005; Hayes und Barilla, 2006; Leonard *et al.*, 2005).

### **Actin-ähnliche ATPase (Typ II)**

Die erste bei Prokaryonten entdeckte Actin-Typ ATPase ist das ParM-Protein des Plasmids R1 von *E.coli*. Das *par*-Locus des R1-Systems kodiert für ein *trans*-wirkendes ParA-homologes

Protein, genannt ParM, für ein DNA-bindendes ParB-homologes Protein, genannt ParR und beinhaltet eine *cis*-wirkende zentromer ähnliche DNA-Region, genannt *parC*. Das strukturell Actin-ähnliche ParM polymerisiert in Form von zwei gestreckten Filamenten, die dem eukaryontischen F-Actin ähneln (van den Ent *et al.*, 2002), während ParR an *parC* bindet und so die Plasmid-Paarung einleitet (Jensen, R. B. und Gerdes, K., 1997; Jensen *et al.*, 1998; Möller-Jensen *et al.*, 2002; van den Ent *et al.*, 2002).



**Abb. 6** Vergleich der Kristallstrukturen von Actin und Actin-ähnlichen Proteinen. Das eukaryontische zytoskeletale Actin, das prokaryontische MreB (Holm und Sander, 1993; van den Ent, *et al.*, 2001) und das Plasmid-kodierte ParM vom Plasmid R1. Ein aus EM-Daten rekonstruiertes Filament von ParM zeigt, wie der Proteinkomplex polymerisiert ist (rechte Abbildung). Der Abstand zwischen zwei Untereinheiten beträgt demnach 49 Å, und zwischen zwei Furchen 300 Å (siehe rechte Abbildung) (van den Ent *et al.*, 2002).

Die 3D-Struktur von ParM (van den Ent *et al.*, 2002), MreB und Actin wie in Abb. 6 dargestellt, zeigt, dass ParM eine sowohl zum MreB als auch zum Actin sehr ähnliche charakteristische Faltung aufweist. Trotz der strukturellen Unterschiede spielen diese zwei Hauptklassen von ATPasen (ParM-Typ und ParA-Typ) eine zentrale Rolle bei der Plasmidpartitionierung, da sie mit der Bildung von filamentösen Strukturen (Abb. 6 rechts) und Paarung der extra-chromosomalen DNA-Elemente die Segregation einleiten (Ebersbach und Gerdes, 2005; Funnell, 2005; Hayes und Barilla, 2006; Leonard *et al.*, 2005; Surtees und Funnell, 2003). Die filamentösen Strukturen von ParM wurden durch eine neulich veröffentlichten Studie nochmals bestätigt (Salje *et al.*, 2009). Dabei konnten diese Filamente mit Hilfe von Cryo-Elektronenmikroskopie dargestellt werden.

### 1.3.3 Plasmide der *Inc18* Familie

Plasmid pSM19035 gehört zusammen mit pIP501 und pAMβ1 zur Familie der *inc18* (*inc* für *incompatibility*) Plasmide, die durch ihre charakteristischen Merkmale, wie eine geringe Kopienzahl und ein breites Wirtsspektrum von pathogenen gram-positiven Bakterien (*S. pyogenes*, *S. agalacticae*) gekennzeichnet sind. Sie zeigen in ihren Replikations- (Cop, RNIII, Rep, ori) und Segregationsregionen (SegA und SegB) eine 90 %ige Sequenzhomologie auf (Ceglowski, P. und



bilden, deren Produkte dem Plasmid helfen, sich „Besser als Zufällig“ zu verteilen. Die erste Einheit transkribiert das Gen  $\delta$  (*parA*) und zweite die Gene  $\omega$ -(*parB*),  $\epsilon$ - (Antitoxin) und  $\zeta$ - (Toxin) (Ceglowski *et al.*, 1993a). Wie bereits im vorigen Kapitel beschrieben, sichern die Toxin-Antitoxin Proteine  $\zeta$  und  $\epsilon$  die Abtötung von pSM19035-freien Bakterien (siehe Kapitel 1.3.2.1 TA-System) (Camacho *et al.*, 2002; Ceglowski *et al.*, 1993b; de la Hoz *et al.*, 2000; Lioy *et al.*, 2006; Meinhart *et al.*, 2003).

Die Plasmid-Kopienzahl bzw. ihre Replikation wird durch zwei Regulatoren gesteuert. Dies basiert hauptsächlich auf der Reduzierung bzw. Hemmung der Transkription, wobei die Menge an *rep*-mRNA (das *rep*-Gen kodiert für das Replikation-Initiationsprotein Rep) stark reduziert wird. Während das Cop-Protein, als ein negativer Regulator, die Transkription der *rep*-mRNA blockiert, bindet auf der anderen Seite eine stabile *antisense* RNA (RNA III) an das 5'-Ende der *rep*-mRNA und induziert damit eine Reduzierung der Transkription (Brantl *et al.*, 1993; Brantl, 1994; Le Chatelier *et al.*, 1994; Brantl und Wagner, 1997). Dies führt zur Regulierung der Schwankungen der Kopienzahl.

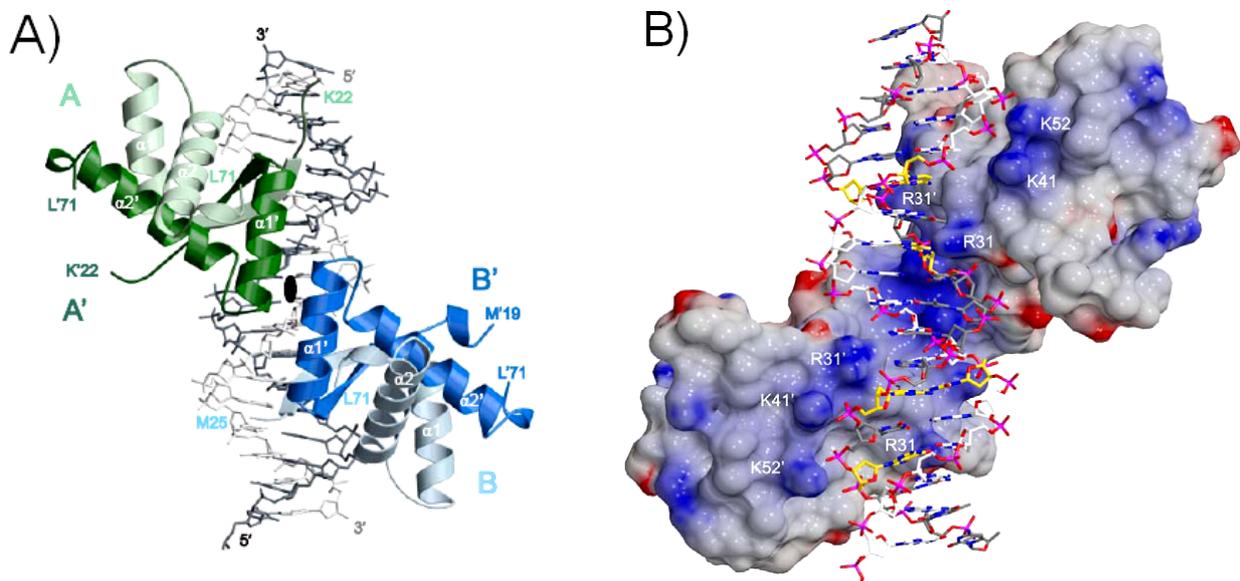
### ***$\omega$ -Protein bindet an die *parS*-DNA***

Das 71 Aminosäuren lange homodimer  $\omega$ -Protein ( $\omega_2$ ) wirkt als ein multifunktionaler Gen-Regulator und funktioniert zusammen mit dem ParA-homologen  $\delta$ -Protein (ParA von Typ-Ib) als ParB analog (ParB von Typ-Ib), indem es an die *cis*-wirkende *parS*-DNA-Region (bezeichnet auch als  $P_\delta$ ,  $P_{cop}$  und  $P_\omega$ ) im *par*-System von pSM19035 bindet (de la Hoz *et al.*, 2000; Weihofen *et al.*, 2006).

Die Bindungsaffinität von  $\omega_2$  an eine 7-bp lange Heptade mit der Sequenz 5'-WATCACW-3' ist moderat (>500 nM), während die Bindungsaffinität an mindestens zwei Heptaden stark ist ( $k_a \sim 12$  nM). Die Heptaden können verschiedene Orientierungen (symbolisiert durch  $\longrightarrow \longrightarrow$  oder  $\longrightarrow \longleftarrow$ ) besitzen (de la Hoz *et al.*, 2000; de la Hoz *et al.*, 2004). Die Assoziations- ( $k_a \sim 4$  nM) bzw. Dissoziationskonstanten ( $k_d \sim 0.1$  s<sup>-1</sup>) von  $\omega_2$  für die Bindung an drei DNA-Heptaden oder für komplette  $P_\delta$ -,  $P_{cop}$ - und  $P_\omega$ -Regionen mit verschiedenen Orientierungen der Heptaden sind ähnlich (de la Hoz *et al.*, 2004; Weihofen *et al.*, 2006).

Die Deletion des  $\omega$ -Gens führt u. a. zu Kopienzahl-Fluktuationen des Plasmids pSM19035 (de la Hoz *et al.*, 2000) und damit verbunden zu einer Reduzierung der exakten Plasmid-Segregation. Im Vergleich zum Wildtyp- $\omega$  zeigt die Deletion von N-terminalen und wahrscheinlich unstrukturierten 19 Resten ( $\omega_2N\Delta 19$ ) keinen erkennbaren Effekt (*in vivo* und *in vitro*) bezüglich der Bindung an DNA-Heptaden sowie der transkriptionalen Repression. Im Gegensatz dazu führt der Austausch von Threonin 29, dessen Seitenkette direkt an eine DNA-Base bindet, gegen Alanin

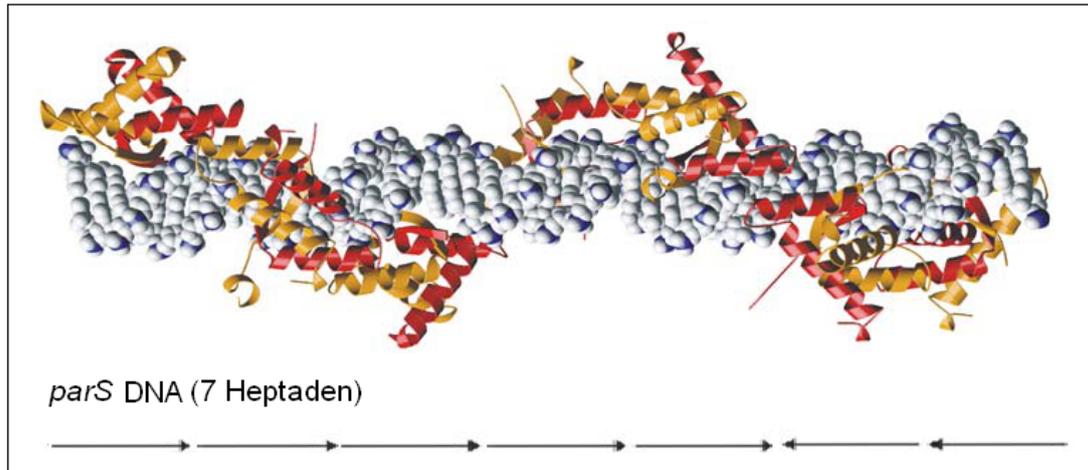
(T29A) zu einem drastischen Verlust der Repressionsaktivität sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Dostál *et al.*, 2006; Weihofen *et al.*, 2006; Welfle *et al.*, 2005).



**Abb. 8** Bänderdarstellung und das Oberflächenpotential von  $[\omega_2\Delta N19]_2$  (beide Abbildungen stammen aus der Dissertation von W. Weihofen 2005). **A)** Die Struktur des  $[\omega_2\Delta N19]_2$ -( $\rightarrow\leftarrow$ ). Die schwarze Ellipse kennzeichnet die zweizählige Rotationsachse. Die jeweiligen  $\omega$ -Monomere sind in unterschiedlicher Farbe dargestellt und die Untereinheiten der  $\omega\Delta N19$ -Dimere als A und A' bzw. B und B' gekennzeichnet. **B)** Das Oberflächenpotential der beiden an zwei Heptaden ( $\rightarrow\rightarrow$ ) gebundenen Strukturen von  $\omega\Delta N19$ . Positive Oberflächenladung wurde in blau (Maximalwert: 10 kT/e) und negative Ladung in rot (Maximalwert: -10 kT/e) dargestellt.

Die Kristallstruktur von wt- $\omega_2$  und des Komplexes bestehend aus  $\omega_2\Delta N19$  gebunden an zwei DNA-Heptaden wurde in unserem Institut bestimmt. Anhand der Kristallstruktur wurde das  $\omega$ -Protein der RHH-(Ribbon-Helix-Helix) Familie (MetJ/Arc-Überfamilie) von Repressoren zugeordnet (Murayama *et al.*, 2001; Weihofen *et al.*, 2006). Die strukturell bekannten Mitglieder dieser Familie bilden ebenfalls Dimere und weisen einen hydrophoben Kern auf (Phillips *et al.*, 1994; Raumann *et al.*, 1994; Suzuki, 1995).

Sequenzspezifische Kontakte werden durch Reste des in die große Furche der DNA eingelagerten 2-strangigen  $\beta$ -Faltblatts vermittelt. Zusätzlich kontaktieren Reste der beiden  $\alpha$ -Helices der beiden Untereinheiten das Phosphat-Rückgrat der DNA (Weihofen *et al.*, 2006). Im Komplex mit natürlichen Promotorregionen formt  $\omega$  eine linkshändige Proteinmatrix um die rechthändige DNA Doppel-Helix, welche nahezu eine ideale B-Form einnimmt (Weihofen *et al.*, 2006, Abb.8B und 9).



**Abb. 9** Modellierung von sieben aufeinander folgenden Heptaden des natürlichen Promotors  $P_\omega$  (*parS2*), welche von sieben  $\omega_2N\Delta 19$  gebunden werden. Die DNA ist in Grau als raumfüllendes Kugelmodell dargestellt, die  $\Delta 19\omega$ -Dimere als gelbrote Bändermodelle. Die Orientierungen der Heptaden der *parS* DNA werden durch Pfeile markiert. Die DNA zeigt im Bereich der invertiert wiederholten Heptaden ( $\rightarrow\leftarrow$ ) eine Krümmung von  $\sim 10^\circ$ , und die  $\omega N\Delta 19$ -Dimere bilden eine linksgängige Protein-Matrix um die rechtsgängige DNA des  $P_\omega$  Promotors. Die fünf direkt wiederholten Heptaden und ihre gebundene  $\omega N\Delta 19$ -Dimere wurden mit Hilfe der Struktur von  $[\omega_2N\Delta 19]_2-(\rightarrow\rightarrow)$  erstellt. Für die invertiert wiederholten Heptaden werden analog die Strukturen von  $[\omega_2N\Delta 19]_2-(\rightarrow\leftarrow)$  verwendet (Dissertation von W. A. Weihofen).

### ***parA*-homologes $\delta$ -Gen**

Die in Kapitel 1.3.3.1 Abb. 7 dargestellte SegB-Region, welche die „Besser-als-Zufall-Verteilung“ des Plasmids pSM19035 (Ceglowski *et al.*, 1993b) gewährleistet, umfasst auch das unmittelbar *upstream* von  $\omega$  lokalisierte  $\delta$ -Gen (Ceglowski *et al.*, 1993a; de la Hoz *et al.*, 2000), welches eine Sequenzhomologie zur ParA Familie von Walker-Typ ATPasen aufweist, die zu einer aktiven Partitionierung von bakteriellen Plasmiden und Chromosomen beitragen (Motallebi-Veshareh *et al.*, 1990; de la Hoz *et al.*, 2000). Das *parA* homologe Gen  $\delta$  besitzt seinen eigenen Promotor,  $P_\delta$  (auch *parS1* genannt) und stellt nach der ersten Transkriptionseinheit ( $\omega$ - $\epsilon$ - $\zeta$ ) die zweite Einheit des SegB-Operons dar. Der ORF  $\delta$  kodiert für das 34,5 kDa große  $\delta$ -Protein (298 Aminosäurenreste), welches der Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist.

Im Gegensatz zu ParA- und SopA-Proteinen, die die Expression des *par*- bzw. des *sop*-Operons des Plasmids R1 bzw. F regulieren, oder zum IncA-Protein des Plasmids RK2, welches an seiner Regulation indirekt beteiligt ist (Nordström, K. und Austin, S. J., 1989; Thorsted *et al.*, 1998; Thomas, C. M., 2000), reguliert das  $\delta$ -Protein seine eigene Synthese nicht (de la Hoz *et al.*, 2000). Darüber hinaus konnte durch diese Studien gezeigt werden, dass die Initiation der Transkription des  $\delta$ -Gens durch die Anwesenheit des *in trans* exprimierten  $\omega$ -Proteins um das etwa siebzigfache zurückging (de la Hoz *et al.*, 2000), was auf einen engen Zusammenhang zwischen beiden Genen hindeutete.

## 1.4 Zielsetzung

### **Vorarbeiten**

Die vorliegende Arbeit basiert auf einer Reihe von Vorarbeiten, deren Ziel hauptsächlich darin bestand, Struktur und Funktionsmechanismen einiger an der Segregation des Plasmids pSM19035 von *Streptococcus pyogenes* beteiligten Proteine wie  $\omega$  ( $\omega$ -Repressor und auch ParB-analog) (Murayama *et al.*, 2002; Dissertation von W. A. Weihofen, 2005; Weihofen *et al.*, 2006) und  $\epsilon$ - $\zeta$  (Antitoxin-Toxin-Proteine) (Dissertation von A. Meinhart, 2001) aufzuklären. Während die auf der Kristallstrukturbestimmung basierenden Aufgaben von unserer Arbeitsgruppe übernommen wurden, erfolgte die molekularbiologische und biochemische Charakterisierung der in der Plasmidverteilung beteiligten Komponente des gesamten Systems durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. C. Alonso (Kooperationspartner) am Centro Nacional de Biotecnología, Madrid.

Die von dem Kooperationspartner durchgeführten *in vitro* (molekularbiologische und biochemische Analysen) und *in vivo* (subzelluläre Lokalisation von GFP-Fusionen in *B. subtilis* und *E. coli*) Experimente deuteten auf einen möglichen Zusammenhang zwischen zwei Genen bzw. Proteinen hin ( $\omega$ -Repressor und ParA-homologes  $\delta$ -Protein). Diese neuen Erkenntnisse regten die strukturellen und weiteren detaillierten biochemischen und zellbiologischen Untersuchungen an dem ParA-homologen  $\delta$ -Protein an.

### **Ziel dieser Arbeit**

Das Hauptanliegen dieser Arbeit ist es, neue Erkenntnisse über die 3-dimensionale Struktur des  $\delta$ -Proteins mit Hilfe von Röntgenbeugung an Proteinkristallen zu gewinnen. Die ersten auf der Primärsequenz des  $\delta$ -Proteins basierten Analysen deuteten daraufhin, dass  $\delta$  als Walker-Typ ATPase zu der Familie der ParA-Proteine (Par für Partitionierung) gehört. Zusammen mit einem *trans*-wirkenden DNA-bindenden Protein (ParB) und einer *cis*-wirkenden Zentromer-ähnlichen DNA-Region (*parS*-DNA) gewährleisten diese Proteine die aktive Verteilung der Plasmide und der chromosomalen DNA während der bakteriellen Zellteilung an die Tochterzellen. In diesem Zusammenhang wurden neben den strukturellen Analysen auch die Untersuchungen zur Funktion des  $\delta$ -Proteins als eine mögliche ATPase in dem gesamten Mechanismus des *par*-Systems von pSM19035 d. h. im Hinblick auf eine mögliche Interaktion mit dem  $\omega$ -Repressor und der *parS*-DNA als weitere Aufgaben gestellt.

Um diese Aufgaben zu bewerkstelligen, sollte zunächst das  $\delta$ -Gen in *E. coli* kloniert, überexprimiert, gereinigt und möglichst mit ADP, ATP und mit nicht hydrolysierbaren ATP-Analoga wie AMPPCP oder ATP $\gamma$ S co-kristallisiert werden. Anschließend sollte die Kristallstruktur des  $\delta$ -Proteins mittels kristallographischer Methoden bestimmt werden. Da die Struktur des chromosomal kodierten ParA-homologen MinD (Hayashi *et al.*, 2001) bereits vor dem Beginn dieser Arbeit

---

bekannt war, sollte aufgrund der Primärsequenz-Homologie von 19 % zunächst versucht werden, die Kristallstruktur des Proteins mit Hilfe der Methode des Molekularen Ersatzes (MR) unter Verwendung der atomaren Koordinaten einer der MinD-Strukturen als Suchmodell zu bestimmen. Sollten diese Versuche scheitern, dann sollten die Kristalle mit Schweratomen derivatisiert werden, um das Phasenproblem mit Hilfe von Methoden wie Datensammlung mit mehreren Wellenlängen und anomaler Dispersion (MAD), Multiplem Isomorphem Ersatz (MIR) bzw. Multiplem Isomorphem Ersatz mit anomaler Streuung (MIRAS) zu lösen. Die Struktur des  $\delta$ -Proteins und seine biochemische und zellbiologische Charakterisierung sollten Rückschlüsse auf die Wirkungsweise des gesamten *par*-Systems vom Plasmid pSM19035, isoliert aus dem humanpathogenen Bakterium *S. pyogenes*, ermöglichen.