

10. Zusammenfassung

DNA ist in der Lage, viele verschiedene Konformationen einzunehmen. Die biologisch zweifellos wichtigste Konformation ist die rechtsgängige B-DNA Doppelhelix. In den letzten Jahren konnten jedoch viele DNA-Strukturen zumeist mit röntgenkristallographischen Methoden bestimmt werden, die teilweise erheblich von der B-Form abweichen. Viele dieser Konformationsvarianten wurden zuerst *in vitro* entdeckt. Es gibt jedoch zahlreiche Beispiele dafür, daß dieselben Strukturen auch in der lebenden Zelle vorkommen, dort spezifisch erkannt werden und auf diese Weise ganz bestimmte Funktionen erfüllen.

Die linksgängige doppelhelikale DNA-Form, die Z-DNA, deren Struktur noch vor der B-DNA im atomaren Detail bekannt war, ist eine der auffallendsten alternativen DNA-Strukturen überhaupt. Sie kann reversibel aus der B-Form gebildet werden, allerdings ist ihre Bildung abhängig von der Nukleotidsequenz des Doppelstrangs. Das Gleichgewicht zwischen B- und Z-DNA ist unter physiologischen Bedingungen aus energetischen Gründen weitgehend auf Seiten der B-Form. Es kann jedoch verschoben werden, zum Beispiel durch Anwendung negativ-superhelikalen Stresses auf doppelhelikale DNA. Transkribierende Gene stehen in der Zelle unter solchem Stress und es ist bekannt, dass diese Gene vorübergehend Z-DNA-Abschnitte ausbilden können. Eine offene Frage ist jedoch, ob die Bildung von Z-DNA in der Zelle eine Funktion erfüllt. Um dieser Frage nachzugehen, wurde intensiv nach Proteinen gesucht, die Z-DNA spezifisch erkennen können. Mitarbeitern in Alexander Rich's Labor am Massachusetts Institute of Technology in Cambridge, U.S.A., gelang es, ein eukaryontisches Protein zu isolieren, das Z-DNA mit nanomolarer Affinität spezifisch erkennt. Dieses Protein, die Doppelstrang-RNA abhängige Adenosin-deaminase ADAR1, editiert unprozessierte Boten-RNA so, daß in translatierten Protein einzelne Aminosäuren ausgetauscht sind. Um richtig zu funktionieren, muss die mRNA noch unprozessiert sein, d.h. das Editieren muss sehr rasch nach der Transkription erfolgen. Die Fähigkeit, Z-DNA mit hoher Affinität zu binden, könnte folglich dazu dienen, ADAR1 an seinen Funktionsort – transkribierende Gene – zu lenken.

Ziel der hier beschriebenen Arbeit war, die Z-DNA-bindende Domäne aus ADAR1 zu isolieren und die Struktur im Komplex mit dem Z-DNA-Liganden aufzuklären. Die Domänengrenzen der 9 kD großen Proteindomäne Z α wurden mit limitierter Proteolyse bestimmt. Diese Experimente legen nahe, daß Z α Teil einer zweigeteilten Domäne Zab ist. Die isolierte Z α Domäne ist jedoch auch alleine imstande, an Z-DNA mit nanomolarer Affinität zu binden. Die Z α Domäne wurde in Bakterien überproduziert und anschließend chromatographisch gereinigt. Ein Komplex von Z α mit dem 6 Basenpaare langen DNA Oligomer d(TCGCGCG)₂ mit dT Überhang konnte kristallisiert werden, mit dem Röntgendiffraktionsdaten gesammelt wurden. Anschließend wurde die Struktur bei einer Auflösung von 2.1 Å mit der Technik des einfachen isomorphen Ersatzes einschließlich anomaler Streuung (SIRAS) bestimmt.

Die Struktur zeigt, daß die gebundene DNA eine unverzerrte Z-Konformation einnimmt, die der Z-Form sehr ähnlich ist, die 1979 von Wang *et al.* in reinen DNA Kristallen erstmals bestimmt wurde. Z α ist eine kompakte Domäne, bestehend aus einem Bündel von 3 α -Helices das zur einen Seite von einem 3-strängigen, antiparallelen β -Faltblatt abgeschlossen ist. Die Kontakte zwischen Z α und der DNA bestehen zwischen Aminosäuren der Helix α 3 und der C-terminalen β -Haarnadel einerseits und in erster Linie dem Z-DNA spezifischen Zick-Zack Zucker-Phosphat Rückgrat andererseits. Die Struktur zeigt nur einen einzigen Basenkontakt zum exponierten Kohlenstoff 8 eines Guaninnukleosids in der Z-DNA spezifischen syn Konformation. Anders als in Z-DNA sind in B-DNA alle Nukleoside in der anti Konformation, welche diese Interaktion nicht erlauben würde. Z α erscheint deswegen maßgeschneidert für die Erkennung der Z-DNA Konformation durch Komplementarität sowohl seiner Oberfläche als auch seiner elektrostatischen Eigenschaften.

Überraschenderweise enthält Z α ein Helix-Turn-Helix (HTH) Motiv, welches gewöhnlich in B-DNA-bindenden Proteinen gefunden wird. Z α benutzt dieses Motiv in einer gänzlich anderen Art und Weise um Z-DNA zu erkennen, als sie für B-DNA üblich ist. B-DNA wird von HTH-Proteinen meistens basenspezifisch erkannt, indem das Protein Kontakte zu den Basenrändern ausbildet, die über die große und kleinen Furche zugänglich sind. Die 4 DNA-Basen sind aufgrund ihrer spezifisch unterscheidbaren Möglichkeit zur Ausbildung nicht-kovalenter Bindungen an den Rändern erkennbar. Eine

in der großen Furche liegt und so mehrere nebeneinanderliegende Basenpaare spezifisch binden kann. Im Falle der Erkennung von Z-DNA durch $Z\alpha$ handelt es sich dagegen nicht um basenspezifische, sondern um konformationsspezifische Erkennung. Im Vordergrund stehen Wechselwirkungen mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat, welches eine für Z-DNA charakteristische Struktur einnimmt. Der einzige Basenkontakt, der im Komplex besteht, ist nicht basenspezifisch, sondern ist prinzipiell mit allen 4 Basen möglich, vorausgesetzt sie liegen als Nucleoside in der Z-DNA-charakteristischen syn Konformation vor. Die zweite Helix des HTH-Motivs wird in $Z\alpha$ zwar auch zur DNA Erkennung verwendet, allerdings liegt sie in einer vollkommen anderen Orientierung als bei B-DNA bindenden HTH-Proteinen auf der konvexen Oberfläche der Z-DNA. $Z\alpha$ ist nicht das einzige HTH-Protein, das DNA in einer nicht-kanonischer Art erkennt. In jüngster Zeit wurden mehrere Komplexstrukturen veröffentlicht, in denen HTH-Proteine an B-DNA in einer neuartigen Weise, ja sogar an RNA binden. Zusammengenommen zeigen diese Experimente, daß kleine Modifikationen im HTH-Motiv zu drastischen Veränderungen der Ligandenspezifität führen können. Die Faltung des HTH-Motivs erscheint in idealer Weise geeignet, verschiedene Nukleinsäurestrukturen spezifisch erkennen zu können.

Die hier analysierte Kristallstruktur liefert zum ersten Mal ein strukturelles Verständnis dafür, wie Z-DNA spezifisch durch ein Protein erkannt werden kann. Die auffallende Konservierung der Aminosäuren in der $Z\alpha$ -Domäne, die DNA-Kontakte ausbilden, legt nahe, daß die Z-DNA Bindung eine funktionelle Bedeutung hat und keine zufällige Eigenschaft der hier charakterisierten humanen Variante der Domäne ist. Eine Kristallstruktur kann jedoch den funktionellen Nachweis in lebenden Zellen nicht ersetzen. Die Funktionsweise des Enzyms ADAR1 wird im Moment intensiv untersucht, wobei neben der Z-DNA Bindungsaktivität auch viele andere Eigenschaften noch nicht geklärt sind. Zur Aufklärung der biologischen Funktion(en) von Z-DNA könnte es daher auch hilfreich sein, in der Datenbank nach Proteinen zu suchen, die Ähnlichkeit zu $Z\alpha$ aufweisen. Möglicherweise kann man auch auf diesem Wege letztlich die Frage der biologischen Funktion(en) von Z-DNA beantworten.