

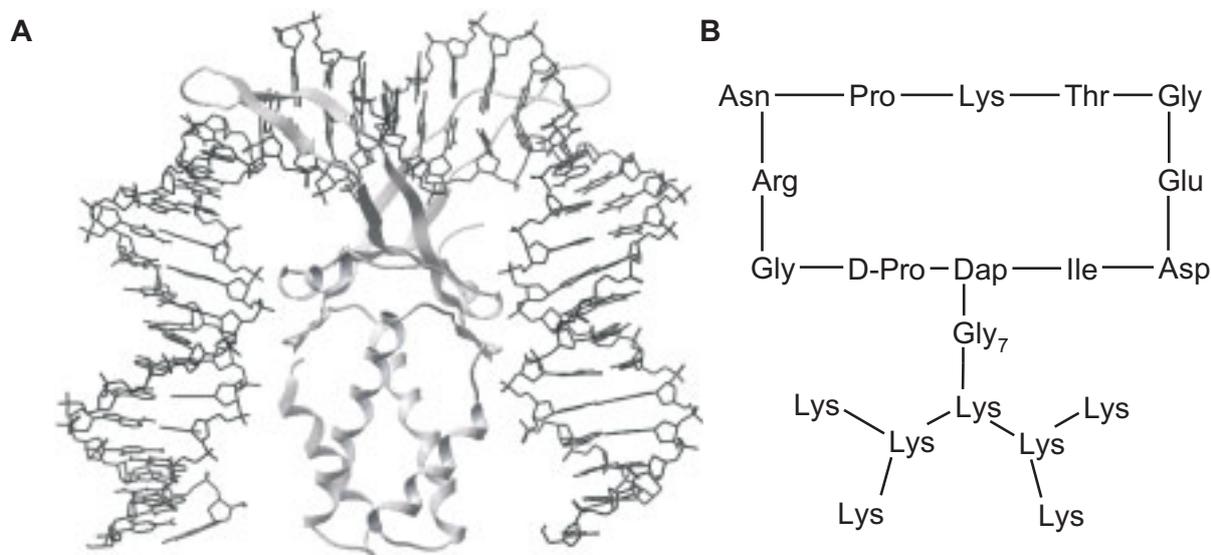


# 1. Einleitung

Der Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion von Proteinen ist Gegenstand aktueller biochemischer Forschung. [1] Er bildet die Grundlage zentraler biologischer Prozesse.

Proteine werden in der Regel an den Ribosomen im Cytoplasma der Zelle als lineare Polymere aus einem Satz von 21 Aminosäuren synthetisiert (*Primärstruktur*). Nach oder während der Synthese falten sich diese Aminosäureketten in eine definierte dreidimensionale räumliche Struktur (*Tertiärstruktur*), die lokale *Sekundärstrukturen* ( $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt,  $\beta$ -turn und *random-coil*-Strukturen) enthält. [2,3] Diese in sich flexiblen Strukturen ermöglichen die wechselseitige Beeinflussung von Proteinen untereinander und vor allem mit DNA.

Die DNA besteht aus einem polyanionischen Zucker-Phosphat-Rückgrat, das mit den vier kanonischen Nukleobasen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin glykosidisch verbunden ist. [4] Unter normalen physiologischen Voraussetzungen beschreibt die DNA eine rechts gewundene Doppelhelix (B-DNA), aus durch Wasserstoffbrücken-Bindungen gepaarten Einzelsträngen. Unter bestimmten Bedingungen, wie erhöhten Salzkonzentrationen, kann sich die Windungsrichtung der Doppelhelix umdrehen (Z-DNA). [5] Der Doppelstrang kann geknickt (engl. *kinked*), zu einem Bogen gekrümmt (engl. *bent*) oder entwunden vorliegen. Für die Replikation der DNA ist ein Aufwinden des Doppelstranges in die korrespondierenden Einzelstränge unerlässlich. Nur so kann die DNA-Polymerase die beiden Einzelstränge zu zwei neuen Doppelsträngen ergänzen. Gleiches gilt für die Transkription der DNA in RNA, auch hier wird vom codierenden DNA-Einzelstrang durch die RNA-Polymerase abgelesen. Die lineare Struktur der DNA ist daher erkennbar ungeeignet für die vielfältigen biophysiologicalen Ansprüche, die an sie gerichtet sind.



**Abb. 1.1 Vergleich des IHF Proteins mit dem Synthetischen Mimetikum.**

**A** IHF-DNA Co-Kristallstruktur.

**B** Aufbau eines potentiellen Mimetikums.

Ein weiteres Problem ergibt sich aus der reinen Länge der DNA-Moleküle. In lebenden Zellen besteht die Notwendigkeit DNA-Moleküle zu falten, was in Eukaryoten mittels bestimmter Proteine, den *Histonen* verwirklicht ist. Auch das ca. 1 mm lange Chromosom des Prokaryoten *Escherichia coli* muss kompaktiert werden, um in einem Einzeller von 1  $\mu\text{m}$  Durchmesser unterzukommen. [6] In Bakterien wurde eine Reihe von Histon-ähnlichen Proteinen gefunden, die diese Aufgabe erfüllen und darüber hinaus in einige wichtige biomolekulare Prozesse eingreifen. Das Phänomen gebogener oder gekrümmter (engl. *bent*) DNA lässt sich anschaulich an einem sequenzspezifischen Protein demonstrieren, das aus Bakterien isoliert und mit DNA im Komplex co-kristallisiert werden konnte.

Die Arbeit beschäftigt sich im Wesentlichen mit dem Design und der Synthese peptidischer Analoga des DNA-biegenden Proteins IHF (engl. *integration host factor*). Hierfür wurde das Protein (ca. 22 kDa) auf der Basis einer Co-Kristallstruktur [7] strukturell analysiert und sollte mittels kleiner peptidischer Moleküle im Bereich von 2.5 kDa imitiert werden (Abb. 1.1).

Ziel der Arbeit war es die Sequenzspezifität, wie sie sich im IHF-Protein findet, über die Inkorporation eines Zyklopeptids mit identischem Ausschnitt,

der für Bindung und *bending* verantwortlichen Primärstruktur, zu erreichen. Dabei spielt die konformationelle Präorganisation eine wichtige Rolle in der spezifischen DNA-Erkennung. Die intramolekulare Versteifung des Zyklopeptids über eine Disulfid- oder Esterbrücke, könnte ein wesentliche Stabilisierung der Konformation leisten. Darüber hinaus muss bei der Bindung an einen DNA-Doppelstrang eine Ladungskompensation zur negativ geladenen DNA sichergestellt sein. Die Verwendung polykationischer Dendrimere verspricht hier ein ausreichendes Potenzial. Durch die Verbindung beider Einheiten, Zyklopeptid und Dendrimer, sollte ein Mimetikum aufgebaut werden, das in der Lage ist DNA sequenzspezifisch zu binden und abzubiegen.

Anhand detaillierter Elektrophoresestudien soll das Bindungsverhalten der Peptide in Bezug auf kleine (13-34 bp) und mittlere (200 bp) DNA-Segmente experimentell überprüft werden. Die Synthese geeigneter DNA-Segmente, die eine IHF-Bindungsseite enthalten kann durch gentechnische Verfahrensweisen wie *In-vitro Rekombination* und *Genklonierung* ermöglicht werden. Für einen direkten Wirkungsvergleich der Proteinmimetika mit dem IHF-Protein selbst, sollten die beiden IHF-Untereinheiten separat als Fusionsproteine exprimiert und anschließend zum Heterodimer gepaart werden.

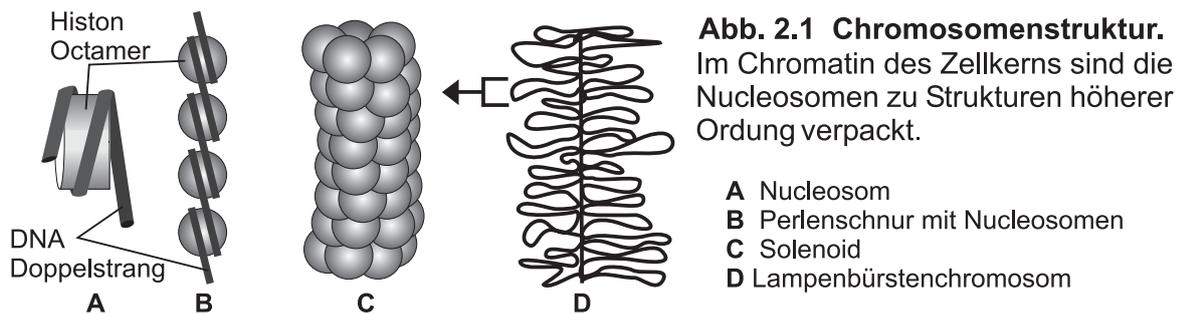
## 2. Natürliche DNA-biegende Proteine

Die Organismen lassen sich aufgrund der Struktur und Organisation ihrer Zellen in zwei Hauptkategorien einteilen, *Prokaryoten* und *Eukaryoten*. Die Zellen der Eukaryoten besitzen im Gegensatz zu den Prokaryoten einen echten Zellkern. Auch wenn die prokaryotische Zelle einfacher organisiert und deshalb als ursprünglicher einzustufen ist als die eukaryotische, verfügen Prokaryoten doch über ein großes Spektrum an biosynthetischen Fähigkeiten und Möglichkeiten. Der aus Sicht der Proteinbiosynthese wichtigste Unterschied ist der fehlende Zellkern. Sind RNA- und Proteinsynthese in eukaryotischen Zellen in verschiedenen Kompartimenten (Zellkern/Cytoplasma) lokalisiert, finden sie bei Prokaryoten gekoppelt und nacheinander im Cytoplasma der Zelle statt.

Die DNA eukaryotischer Zellen liegt nicht nackt vor. Sie ist fest mit einer Gruppe kleiner basischer Proteine, den *Histonen*, verbunden. Der Histon-DNA-Komplex wird als *Chromatin* bezeichnet, wobei die Histone gut die Hälfte der Masse des Chromatins ausmachen. Das entscheidende Merkmal der Histone ist der hohe Gehalt an basischen Aminosäuren wie Lysin und Arginin. Man unterscheidet fünf Histontypen, die an der Organisation der eukaryotischen Chromosomen beteiligt sind: H1, H2A, H2B, H3 und H4. Sie werden von einer Fünfergruppe von Genen codiert, die in der DNA nebeneinander liegen und tandemrepetiert sind ( $400\times$ ). Histone gehören zu den in der Evolution am stärksten konservierten Proteinen. So unterscheidet sich das aus 102 Aminosäuren bestehende Histon H4 bei Rind und Erbse nur in zwei Positionen. Allgemein bilden die Histone das Rückgrat der eukaryotischen Chromosomen (Abb. 2.1).

Prokaryoten wie das Bakterium *Escherichia coli* besitzen lediglich ein einzelnes Chromosom mit ca.  $4 \cdot 10^6$  Basenpaaren. Die DNA ist hier zirkulär angeordnet und in übergeordneter Struktur als *Nukleoid* organisiert. Diese

## 2. Natürliche DNA-biegende Proteine



übergeordnete Struktur wird durch eine Reihe von Proteinen vermittelt, die teils spezifisch, teils unspezifisch an DNA binden. Unter diesen Proteinen befinden sich alleine zehn so genannte *histone-like* Proteine, einschließlich HU (*heat-unstable nucleoid protein*) sowie IHF (*integration host factor*). [8–10] Sie alle zählen zur selben Proteinfamilie DNABII. Zu dieser Familie zählen neben HU und IHF weiterhin verschiedene Transkriptionsfaktoren (TF) und andere DNA-bindende Proteine wie H-NS (*histone-like nucleoid structuring protein*). [11] Die Kompaktierung der DNA resultiert aus der Fähigkeit dieser Proteine den DNA-Doppelstrang, an den sie binden, zu verbiegen und zu krümmen (engl. *bending*). Auf diese Weise ist das bakterielle Chromosom vergleichsweise hoch organisiert und wird elektronenmikroskopisch sichtbar. [12] Das *bending* des Doppelstranges dient dagegen nicht ausschließlich der Kompaktierung. Es ist ebenfalls notwendig für die Regulation der Transkription von ca. 120 Genen in *E. coli*, [13] Rekombinationsreaktionen [14, 15] und die Initiierung der DNA-Replikation an *oriC*<sup>1</sup>. [16–18]

Diese Proteine sind in ihrer Funktion daher teilweise analog<sup>2</sup> zu den eukaryotischen Histonen. Dennoch sind sie strukturell zu keinem der eukaryotischen Histone homolog<sup>3</sup>. Alle prokaryotischen Genome weisen wenigstens ein Mitglied der DNABII Familie auf. [19] Unter den Vertretern dieser Familie zeigen sich erhebliche Übereinstimmungen in den Aminosäuresequenzen (Tab. 2.1). Die letzten vier Proteineinträge in Tab. 2.1 beschreiben sequenzspezifisch bindende Proteine, wobei IHF $\alpha$  und IHF $\beta$  sowie EHU $\alpha$  und EHU $\beta$ , die beiden Untereinheiten, aus denen IHF bzw EHU aufgebaut sind,

<sup>1</sup>*ori* = *origin of replication*, 245 bp lange Sequenz im *E. coli* Chromosom, an der die DNA-Replikation startet.

<sup>2</sup>Anpassungsähnlichkeit von Merkmalen aufgrund ähnlicher Funktion.

<sup>3</sup>Gleiche evolutive Herkunft von Merkmalen - unabhängig von der Funktion.

## 2. Natürliche DNA-biegende Proteine

**Tabelle 2.1**

Sequenzhomologie unter den Proteinen der DNABII Familie in Prozent

	AHU	THU	EHU $\alpha$	EHU $\beta$	<i>Bst</i> HU	<i>Bsu</i> HU	IHF $\alpha$	IHF $\beta$	BHbb	TF1
AHU	–	49	45	42	45	50	35	34	29	27
THU	49	–	51	50	52	53	35	37	31	29
EHU $\alpha$	45	51	–	69	56	57	34	32	27	33
EHU $\beta$	42	50	69	–	55	52	30	34	29	31
<i>Bst</i> HU	45	52	56	55	–	67	33	33	27	36
<i>Bsu</i> HU	50	53	57	52	67	–	35	35	28	39
IHF $\alpha$	35	35	34	30	33	35	–	30	28	21
IHF $\beta$	34	37	32	34	33	35	30	–	30	24
BHbb	29	31	27	29	27	28	28	30	–	18
TF1	27	29	33	31	36	39	21	24	18	–

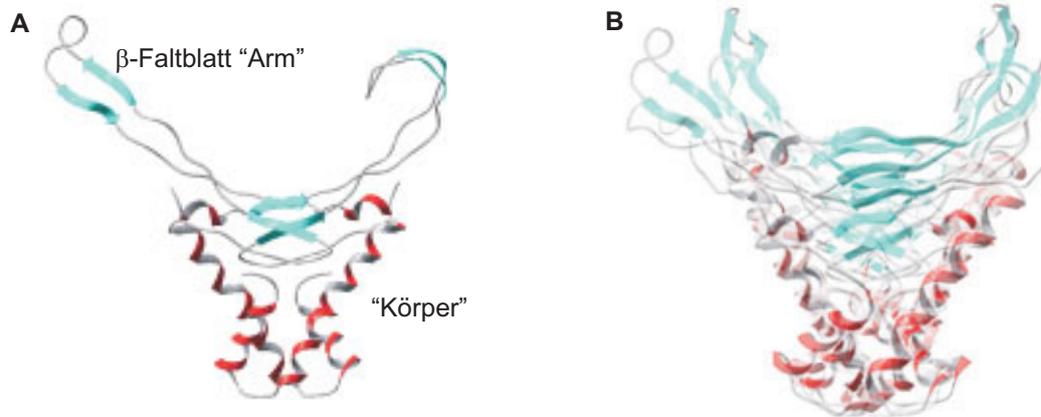
AHU: *Anabaena* HU; THU: *T. maritima* HU; EHU  $\alpha$ : *E. coli* HU  $\alpha$ -subunit; EHU  $\beta$ : *E. coli* HU  $\beta$ -subunit; *Bst*HU: *B. stearotherophilus*; *Bsu*HU: *B. subtilis* HU; IHF  $\alpha$ : *E. coli* IHF  $\alpha$ -subunit; IHF  $\beta$ : *E. coli* IHF  $\beta$ -subunit; BHbb: *B. burgdorferie* HU; TF1: HU der Bakteriophage SPO1

bezeichnen. Die Mehrzahl der *histone-like* Proteine ist in ihrer Bindung an DNA nicht sequenzspezifisch.

Der kurze strukturelle Überblick beschränkt sich hier auf die zahlenmäßig größte Gruppe der DNABII-Familie, von denen sich auch IHF ableitet, die HU-Proteine. Allen HU-Proteinen gemeinsam ist der Aufbau aus zwei Untereinheiten. Innerhalb der Klasse der HU-Proteine zeigt sich jedoch keinerlei Konstanz bezüglich des Aufbaus als Homodimer oder Heterodimer. [19] Das HU-Protein (EHU) aus *E. coli* kann während des Zellzyklus sowohl als  $\alpha, \beta$ -Heterodimer vorliegen, wie auch als  $\alpha_2$ - oder  $\beta_2$ -Homodimer. Dies ist eine Folge des unterschiedlichen Expressionsausmaßes beider Untereinheiten während des Zellzykluses. Alle drei EHU-Dimere unterscheiden sich in diesen Stadien ebenfalls hinsichtlich ihrer Bindungskonstanten. [20]

Die Kristallstrukturen der HU-Protein-Dimere weisen untereinander eine ähnliche Grundstruktur auf: Ein großer globulärer „Körper“, der weitgehend aus Helices aufgebaut ist und jeweils zwei „Arme“, die aus dem Grundkörper herausragen (Abb. 2.2). Die optisch übereinander gelegten Strukturen der HU-Proteine zeigen, dass diese Arme prinzipiell stark flexibel sind und in den Kristallstrukturen ungeordnet vorliegen (Abb. 2.2). Trotz dieser unregelmäßig angeordneten Arme zeigen NMR-Studien, dass die Spitzen der Arme in der Regel gefaltet sind. [21–24] Erst im Komplex mit einem DNA-Doppelstrang zeigt sich eine organisierte Anordnung der Arme entlang

## 2. Natürliche DNA-biegende Proteine



**Abb. 2.2 Strukturvergleich.** **A** Struktur des *BstHU*. **B** Überlagerung der HU-Strukturen aus Tab. 2.1. Die  $\beta$ -Faltblatt Arme sind deutlich flexibler als die helicalen Domänen im Bereich des Körpers. PDB Codes: TF1 ( 1WTU), *BstHU* ( 1HUU), *BsuHU* (1HUE), AHU (1P71), THU (1B8Z), EHU(1MUL). Die Abkürzungen sind in Tab. 2.1 erläutert.

des DNA-Doppelstranges. Der grundsätzlich ähnliche Aufbau aller DNABII Proteine lässt sich auf hohe Sequenzhomologien in der Aminosäureabfolge zurückführen (Tab. 2.1, Abb. 2.3). Ferner wurde in einem Vergleich von TF1, *BsuHU* und IHF eine Reihe hoch konservierter Aminosäuren wie Lysin und Glutamin an spezifischen Positionen der Proteinoberfläche gefunden, die mit der Stabilisierung eines DNA-Fragmentes in Verbindung gebracht werden. [25]

Das durch die einzelnen Proteine vermittelte *bending* der DNA wird stets auf dieselbe Art erreicht. An der Spitze der „Arme“ interkaliert ein Prolinrest in die Basenpaarebene des DNA-Doppelstranges. An dieser Stelle bewirkt die

	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 2'$	$\beta 3'$	$\beta 3$	$\alpha 3$
<b>Spezifisch</b>								
EIHF $\alpha$	MALTKAEMSEYLFD-----	KLGLSKRDAKELVELFFEEIRRAL	ENGEQVKLSGFGNFDLRDKNQRP-GRN	PKTGEDI	PITARRVVTFRPGQKLKSRVE			
EIHF $\beta$	MTKSELIERLATQ-----	QSHIPAKTVEDAVKEMLEHM	MASTLAQGERIEIRGFGS	FSLHYRAPRT-GRN	PKTGDKVELEGKYVPHFKPGKELDRAN			
BHbb	PKVTKSDIVDQIALNIKN-NNLKLEK	KYIRLVIDAFFEELKSNLCS	NNVIEFRSFGTFEVRKRK	GRLNARNPQTGEYV	KVLDHVVAYFRPGKDLKERVW			
TF1	MNKTELIKAIAQ-----	DTELTQVSVSKMLASF	EKITTTETVAKGDVQLTG	FLNIKPVARQARK-GFN	PQTQEAL	EIAPSVGVSVKPGESL	KKAAE	
<b>Unspezifisch</b>								
AHU	MNKGELVDAVAE-----	KASVTKKQADAVLTA	ALETIEAVSSGDKVTLV	GFSGFESRERKARE-GRN	PKTNEKMEIPATRVPA	FSAGKLFREKVA		
<i>BstHU</i>	MNKTELINAVAE-----	ASELSKKDATKAVDS	VFDTILDALKN	GDKIQILIGFGNF	FEVREERSARK-GRN	PQTGEEIEIPASKVP	PAFKPGKALKDAVA	
<i>BsuHU</i>	MANKQDLIAKVAE-----	ATELTKKDSAAAVD	AVFASIEEFLAAGEK	VQLIGFGNF	FEVRERAARQ-GRN	PQTGETISIAASKVP	PAFKAGKALKDAVK	
THU	MNKKELIDRVAK-----	KAGAKKDVKLILD	TILETITEALAKGEK	VQIVGFGSFEVR	KAAARK-GVNPQTRK	PITIPERKVPKFKPGK	KALKEKVK	
EHU	MNKSQLIDKIAA-----	GADISKAAAGRAL	DAI IASVTE	SLKEGDDVALV	GFGTFAVKERAART-GRN	PQTGKEITIAAAK	VPSFRAGKALKDAVN	
EHU	MNKTELIDVIAE-----	KAELSKTQAKAA	ESTLAAIT	ESLKEGDAVQLV	GFGTFFKNHTAERT-GRN	PQTGKEIKIAAAN	VPAFVSGKALKDAVK	

**Abb. 2.3 Sequenzhomologien.** Sequenzen der DNABII (HU/IHF) Familie, die sequenzspezifisch bzw unspezifisch an DNA binden. Die ausgebildeten Sekundärstrukturen sind angedeutet. Interkalierende Proline sind grau unterlegt. Die Faltblattstränge sind wegen einer Störung im Wasserstoffbrückenmuster in zwei Bereiche geteilt. Erläuterungen zu den Abkürzungen in Tab. 2.1. Die Sequenzen sind C-terminal z. T. nicht vollständig.

## 2. Natürliche DNA-biegende Proteine

---

Interkalation eine Störung der Stapelungswechselwirkungen der Nukleobasen, was zu einem signifikanten Abknicken des Doppelstranges führt. [7,19,25] Durch diesen Knick wird der DNA-Doppelstrang in Position gebracht für stabilisierende Wechselwirkungen mit Aminosäureseitenketten auf der Oberfläche des zentralen Teils der Proteine. Die Bedeutung dieser Aminosäuren wird in einem Mutanten-Experiment deutlich, bei dem Lys<sup>86</sup> von *BsuHU* durch unpolares Alanin ersetzt ist. Die Bindungsaktivität des mutierten *BsuHU* wird dadurch um ca. 20% vermindert. Ein deutlicher Hinweis auf den Einfluss des positiv geladenen Lysins im globulären Teil von *BsuHU*, in Bezug auf eine Wechselwirkung mit dem negativ geladenen DNA-Rückgrat. [26]