

**Charakterisierung
des Replikationsenzym ORF904 aus
*Sulfolobus islandicus***

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
- Doktor der Naturwissenschaften -
der Fakultät für Biologie, Chemie
und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von
Diplom-Biologe

Martin Sanchez

Bayreuth 2009

Die vorliegende Arbeit wurde von September 2005 bis September 2009 am Lehrstuhl für Biochemie der Universität Bayreuth unter Anleitung von Prof. Dr. Georg Lipps angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Promotionsgesuch eingereicht am: 22.09.2009

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 18.01.2010

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Georg Lipps	(Erstgutachter)
Prof. Dr. Wolfgang Schumann	(Zweitgutachter)
Prof. Dr. Carlo Unverzagt	(Vorsitzender)
Prof. Dr. Birgitta Wöhrl	

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Replikationsinitiation	1
1.2	AAA ⁺ -ATPasen.....	4
1.3	Helikasen	7
1.4	SF3-Helikasen.....	9
1.5	Archaeale Plasmide	12
1.6	Das archaeale Plasmid pRN1	12
1.7	Die Replikationsinitiation von pRN1	14
1.8	Problemstellung	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Materialien.....	16
2.2	Puffer, Lösungen und Medien.....	24
2.2.1	Bakteriennährmedien	24
2.2.1.1	Medienzusätze	24
2.2.1.1.1	Agar	24
2.2.1.1.2	Antibiotika	24
2.2.2	Puffer für die Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	25
2.2.3	Lösung für die Gewinnung einzelsträngiger DNA aus Phagen.....	25
2.2.4	Puffer für die Phenol/Chloroformextraktion.....	25
2.2.5	Puffer für die Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i> , PCR).....	25
2.2.6	Puffer für enzymatische Reaktionen mit DNA.....	26
2.2.7	Puffer für die Agarosegelelektrophorese	26
2.2.8	Puffer für die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	26
2.2.8.1	Denaturierende PAGE	26
2.2.8.2	Native PAGE	26
2.2.8.3	Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Schagger und von Jagow.....	27
2.2.9	Puffer für den Westernblot	27
2.2.10	Puffer für die Chromatographie.....	27
2.2.10.1	Talon	27
2.2.10.2	EMD SO ₃ ⁻ /EMD DEAE/EMD TMAE	28
2.2.10.3	Hydroxylapatit	28
2.2.10.4	EMD Propyl	28
2.2.10.5	Gelfiltration (TSK-gel G3000SW).....	28
2.2.11	Puffer für die Dialyse von Proteinen	28
2.2.12	Puffer für die Untersuchung der Proteinaktivitäten	29
2.2.12.1	ATPase-, Translokations- und Entwindungsaktivität	29
2.2.12.2	Triple-Helix-Entwindung.....	29
2.2.12.3	dsPlasmid-Entwindung.....	29
2.2.12.4	Fluoreszenzanisotropie	29

2.2.12.5 CD-Spektroskopie	29
2.2.12.6 Limitierende Proteolyse.....	30
2.2.12.7 Glyceringradientenzentrifugation	30
2.2.12.8 DNase-I-Nuklease- <i>Footprint</i>	30
2.2.12.9 KMnO ₄ - <i>Footprint</i>	30
2.2.13 Größenstandards für die Gelelektrophorese.....	31
2.2.13.1 DNA-Standards	31
2.2.13.2 Proteinstandards	31
2.3 Methoden	32
2.3.1 Anzucht von Bakterien	32
2.3.2 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> und Transformation.....	32
2.3.2.1 Rubidiumchloridmethode zur Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	32
2.3.2.2 Transformation von <i>E. coli</i>	32
2.3.3 Präparation und Nachweis von Nukleinsäuren.....	32
2.3.3.1 Schnellpräparation von Plasmid-DNA.....	32
2.3.3.2 Mini- und Midipräparation von Plasmid-DNA.....	33
2.3.3.3 Präparation einzelsträngiger Plasmid-DNA	33
2.3.3.4 Phenol/Chloroformextraktion	34
2.3.3.5 Ethanolpräzipitation.....	34
2.3.3.6 Bestimmung der Konzentration von DNA	34
2.3.4 Klonierung von DNA-Fragmenten.....	34
2.3.4.1 PCR.....	34
2.3.4.2 Verwendung von Klonierungsvektoren	35
2.3.4.2.1 pGEMT	35
2.3.4.2.2 pJET1.2/blunt	36
2.3.4.3 <i>Quickchange</i> -Mutagenese	36
2.3.4.4 Sequenzierung von DNA-Fragmenten.....	36
2.3.5 Enzymatische Reaktionen mit DNA	36
2.3.5.1 Restriktionsanalysen	36
2.3.5.2 Enzymatische Phosphorylierung.....	37
2.3.5.2.1 Hybridisierung.....	37
2.3.5.3 Enzymatische Dephosphorylierung	37
2.3.5.4 Ligation.....	38
2.3.5.5 Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Standards	38
2.3.6 Gelelektrophorese.....	38
2.3.6.1 Agarosegelelektrophorese	38
2.3.6.2 Denaturierende PAGE	38
2.3.6.3 Native PAGE	39
2.3.6.4 Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Schagger und von Jagow.....	39
2.3.7 Westernblot	40
2.3.7.1 Transfer mittels <i>semi-dry blotting</i>	40

2.3.7.2 Antikörperreaktion	40
2.3.8 Expression von Proteinen	40
2.3.8.1 Test auf Überexpression	40
2.3.8.2 Fermentation und Aufschluss von Zellen.....	41
2.3.9 Aufreinigung und Nachweis von Proteinen	41
2.3.9.1 Analytische Chromatographie	41
2.3.9.2 Affinitätschromatographie (Talon).....	42
2.3.9.3 FPLC-gestützte Kationenaustauschchromatographie	42
2.3.9.4 Dialyse von Proteinen	42
2.3.9.5 Ultrafiltration zur Konzentrierung von Proteinen	42
2.3.9.6 Proteinkonzentrationsbestimmung.....	43
2.3.9.7 Bradford-Test mittels Plattenlesegerät.....	43
2.3.9.8 HPLC-gestützte Gelfiltration	43
2.3.10 Untersuchung der Proteinaktivität.....	44
2.3.10.1 ATPase-Aktivität.....	44
2.3.10.1.1 Bestimmung von K_M und k_{cat}	44
2.3.10.2 Translokationsaktivität.....	44
2.3.10.2.1 Bestimmung der Translokationsgeschwindigkeit	45
2.3.10.3 Entwindungsaktivität	45
2.3.10.3.1 Bestimmung der Entwindungsgeschwindigkeit für die Helikasesubstrate .	45
2.3.10.4 Triple-Helix-Aktivität	46
2.3.10.4.1 Bestimmung der Entwindungsgeschwindigkeit für die Triple-Helix.....	46
2.3.10.5 Verwertbarkeit von rNTPs und dNTPs.....	46
2.3.10.6 Entwindungsaktivität für dsPlasmid-DNA.....	47
2.3.10.7 EMSA (<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>)	47
2.3.10.8 Fluoreszenzanisotropietitration zur Bestimmung von $K_{0,5}$	47
2.3.10.9 CD (<i>Circular Dichroism</i>)-Spektroskopie	50
2.3.10.10 Glyceringradientenzentrifugation	50
2.3.10.11 Glutaraldehyd-Crosslink.....	51
2.3.10.12 Limitierende Proteolyse.....	51
2.3.10.13 Cryo-TEM (<i>Cryo-TransmissionsElektronenMikroskopie</i>).....	51
2.3.10.14 TEM (<i>TransmissionsElektronenMikroskopie</i>)	52
2.3.11 Bestimmung des Replikationsursprungs von pRN1	52
2.3.11.1 DNase-I-Nuklease- <i>Footprint</i>	52
2.3.11.2 $KMnO_4$ - <i>Footprint</i>	53
3 Ergebnisse und Diskussion.....	54
3.1 Strukturinformationen zur Helikase von ORF904	54
3.1.1 Identifikation relevanter Domänen und Aminosäurereste.....	54
3.1.1.1 Die Helikasedomäne	54
3.1.1.1.1 Sequenzstudie und Homologiemodell.....	54
3.1.1.1.2 Deletions- und Punktmutanten	57

3.1.1.2 Die Winged-Helix-DNA-Bindedomäne	59
3.1.2 Die Sekundärstruktur	61
3.1.2.1 CD-Spektren	61
3.1.2.1.1 Abschätzung des α -helikalen Anteils	63
3.1.2.2 Thermische Denaturierung.....	64
3.1.3 Die Quartärstruktur.....	65
3.1.3.1 Sedimentationsanalysen.....	65
3.1.3.2 <i>Crosslink</i>	66
3.1.3.3 Elektronenmikroskopie.....	67
3.2 Enzymatische Aktivitäten der Helikasedomäne	69
3.2.1 Die ATPase-Aktivität	69
3.2.1.1 ATPase-Aktivität für unterschiedliche DNA-Substrate.....	69
3.2.1.2 Bestimmung von K_M und k_{cat} für ATP und DNA	70
3.2.1.3 ATPase-Aktivität der Deletionsmutanten	72
3.2.1.4 ATPase-Aktivität der Punktmutanten	74
3.2.1.4.1 Komplementationsanalyse der Punktmutante R690A mit ORF904	75
3.2.2 Die Translokationsaktivität	76
3.2.2.1 Translokationsaktivität von ORF904 und den Deletionsmutanten.....	76
3.2.2.2 Translokationsaktivität der Punktmutanten.....	78
3.2.2.3 Bestimmung der Translokationsgeschwindigkeit.....	79
3.2.3 Die Entwindungsaktivität.....	81
3.2.3.1 Entwindungsaktivität für unterschiedliche DNA-Substrate.....	81
3.2.3.1.1 Entwindungsaktivität für dsPlasmid-DNA.....	81
3.2.3.1.2 Entwindungsaktivität für kurze lineare DNA-Substrate	82
3.2.3.2 Bestimmung der Entwindungsgeschwindigkeiten für die Helikasesubstrate.....	84
3.2.3.2.1 Das Substrat mit 3'- und 5'-Überhang	84
3.2.3.2.2 Die Holliday-Struktur	86
3.2.3.2.3 Die DNA-Triple-Helix	89
3.2.3.2.4 Vergleich der Entwindungsgeschwindigkeiten von ORF904 und N371.....	90
3.2.3.3 Verwertbarkeit von rNTPs und dNTPs.....	92
3.2.4 DNA-Bindung	93
3.2.4.1 EMSA-Experimente.....	93
3.2.4.2 Anisotropie	95
3.2.4.2.1 Bestimmung von $K_{0,5}$ für die Helikasedomäne N371	95
3.2.4.2.2 Bestimmung von $K_{0,5}$ für ORF904 und seine Deletionsmutanten	98
3.3 Bestimmung des Replikationsursprungs von pRN1.....	103
3.3.1 DNase-I-Nuklease- <i>Footprint</i>	103
3.3.2 $KMnO_4$ - <i>Footprint</i>	106
4. Zusammenfassende Diskussion	109
4.1 Strukturinformationen zur Helikase von ORF904	109
4.2 Charakterisierung der enzymatischen Aktivitäten der Helikasedomäne.....	111

4.2.1 ATPase-Aktivität.....	111
4.2.2 Translokationsaktivität.....	113
4.2.3 Entwindungsaktivität.....	114
4.2.4 DNA-Bindung	117
4.3 Bestimmung des Replikationsursprungs von pRN1.....	119
4.4 Möglicher Mechanismus der Replikationsinitiation durch ORF904	120
5. Zusammenfassung.....	122
6. Summary	125
7. Abkürzungsverzeichnis	127
8. Literaturverzeichnis	131

1 Einleitung

1.1 Die Replikationsinitiation

Die Reproduktion aller Organismen schließt eine Verdopplung der Erbinformation mit möglichst hoher Genauigkeit mit ein. Diesen fundamentalen Prozess bezeichnet man als Replikation. Die grundlegenden Prinzipien der chromosomalen Replikation sind bei Bakterien, Eukaryoten und Archaea sehr ähnlich. Die Replikation lässt sich in drei Phasen gliedern: Initiations-, Elongations- und Terminationsphase. Dabei kann man die Replikationsinitiation nochmals in drei Schritte unterteilen (Abbildung 1-1).

Im ersten Schritt erkennen und binden eines oder mehrere Proteine den Replikationsursprung und schmelzen die DNA lokal, an in der Regel AT-reichen Sequenzen, auf. Bakterien besitzen nur einen, aber genau definierten, Replikationsursprung (*oriC*), der sich durch eine AT-reiche Region mit mehreren DnaA-Boxen auszeichnet (Marians, 1992). Diese DnaA-Boxen werden spezifisch durch DnaA erkannt und gebunden (Erzberger *et al.*, 2002; Skarstad & Boye, 1994). Eukaryotische Chromosomen haben mehrere Replikationsursprünge und diese sind auch nicht so genau definiert wie bei Bakterien. Eine wichtige Ausnahme bildet *S. cerevisiae*. Hier findet man sogenannte ARS (autonom replizierende Sequenzen), die ähnlich wie *oriC* konservierte Sequenzmotive tragen (Newlon & Theis, 1993). Bei Eukaryoten bindet in allen Fällen der ORC (OriRigin Recognition Complex) aus den Proteinen Orc1-6 an den Replikationsursprung (Bell, 2002). Bei den Archaea findet man eine ähnliche Situation wie bei den Eukaryoten vor. Auch hier können mehrere Replikationsursprünge auf den Chromosomen gefunden werden, wobei auch diese nicht einheitlich strukturiert sind (Lundgren *et al.*, 2004; Robinson *et al.*, 2004). Die Bindung erfolgt hier über das Orc1/Cdc6-Protein (Matsunaga *et al.*, 2001). Für dieses Protein ist jedoch noch nicht endgültig geklärt, ob es sich um ein funktionell homologes von Orc1 oder Cdc6 handelt (Myllykallio & Forterre, 2000).

Im zweiten Schritt wird der Replikationsursprung mit der replikativen Helikase beladen und eine sogenannte Replikationsblase ausgebildet. Bei den Bakterien belädt das Helikaseladeprotein DnaC den DnaA-Replikationsursprungskomplex mit der Helikase DnaB (Davey *et al.*, 2002b; Davey *et al.*, 2002a). Erst durch die Hydrolyse von ATP löst sich DnaC von DnaB ab (Davey *et al.*, 2002a) und ermöglicht die Bindung der Primase DnaG an DnaB. Diese stimuliert letztlich die ATP-abhängige Entwindung der Stränge am Replikationsursprung durch DnaB (Bird *et al.*, 2000). Um eine Rehybridisierung der freiwerdenden Einzelstränge zu verhindern, bindet das Einzelstrangbindeprotein SSB. Bei den Eukaryoten belädt das Helikaseladeprotein Cdc6 den ORC-Replikationsursprungskomplex mit dem MCM-Komplex (Mini Chromosome Maintenance), der aus den Proteinen MCM2-7 besteht. Es wird angenommen, dass es sich bei dem Komplex aus MCM4,6,7 um die replikative Helikase handelt, die möglicherweise auch am Aufschmelzen des Replikationsursprungs beteiligt ist (Costa & Onesti, 2008), während MCM2, 3 und 5 vermutlich regulative Funktionen erfüllen (Tye & Sawyer, 2000). Erst nachdem Cdc6 ATP hydrolysiert hat, löst sich dieses aus dem Komplex und ermöglicht der MCM-Helikase die Entwindung der DNA. Die Reassoziierung der Einzelstränge wird hier durch das Replikationsprotein A (RPA) verhindert. In allen heute sequenzierten archaealen Genomen findet man mindestens ein MCM-Homolog (Barry & Bell, 2006). Jedoch haben viele Archaea nur ein MCM-Gen und das Protein bildet im Gegensatz zum

eukaryotischen heterohexameren MCM Homohexamere aus. Man weiß nur wenig über die Beladung des Replikationsursprungs mit dem MCM-Komplex. Es wurden jedoch sowohl Modelle vorgeschlagen, bei denen die Beladung durch andere Proteine erfolgt (z.B. Cdc6 mit Homologie zu DnaC), als auch Modelle, bei denen das MCM selbständig an den Replikationsursprung bindet (Sakakibara *et al.*, 2009). Damit das archaeale MCM die DNA entwinden kann, muss sich aber vermutlich Cdc6/Orc1 unter ATP-Hydrolyse aus dem Komplex lösen (Kelman & Kelman, 2003). Wie bei den Eukaryoten verhindert ein RPA-Homolog die Rehybridisierung der freiwerdenden Einzelstränge.

Im dritten Schritt wird die Replikationsblase mit der replikativen Polymerase beladen und für die Elongationsphase vorbereitet. Bei den Bakterien bindet das Polymerase-III-Holoenzym (Kelman & O'Donnell, 1995b) über seine β -Untereinheit an die DNA am aufgeschmolzenen Replikationsursprung, während bei den Eukaryoten die Bindung der Polymerasen δ und ϵ über das ringförmige Protein PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) (Kelman & O'Donnell, 1995a) erfolgt. Bei den Archaea vermittelt ein PCNA-Homolg den Kontakt einer B- oder D-Typ-Polymerase zur DNA (Hopfner *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2004). Da diese als Ringklemmen bezeichneten Proteine nicht selbständig die Bindung der Polymerase an die DNA vermitteln können, benötigen sie sogenannte *clamp loader*, die sie bei dieser Aufgabe unterstützen. Bei den Bakterien stellt der γ -Komplex des Polymerase-III-Holoenzym diesen *clamp loader* dar. Eukaryoten bzw. Archaea besitzen den RFC (*ReplikationsFaktor C*) bzw. ein RFC-Homolog, das diese Aufgabe übernimmt (Kelman & O'Donnell, 1994; Stillman, 1994).

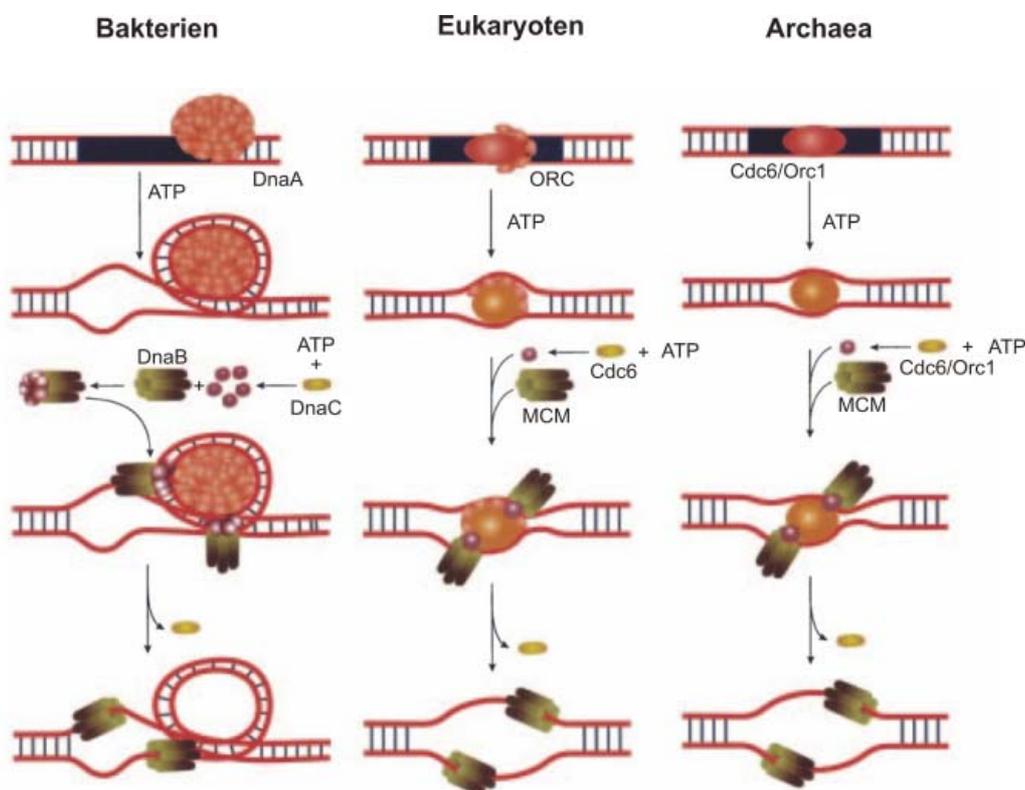


Abbildung 1-1: Vereinfachtes Modell für die Replikationsinitiation in den drei Reichen der Bakterien, Eukaryoten und Archaea (adaptiert von Kelman & Kelman, 2003).

Die Replikation der Bakterien wird heute bereits sehr gut verstanden, während bei der Replikation von Eukaryoten und Archaea noch vieles ungeklärt ist. In den letzten Jahren hat man verstärkt die Replikation archaealer Organismen untersucht, da diese mit derjenigen eukaryotischer Organismen viele Ähnlichkeiten aufweist und es eine große Zahl an Proteinen gibt, die einen gemeinsamen evolutiven Ursprung haben. Mit den Archaea als Modellorganismus ist man in der Lage, an Hand eines weniger komplexen Systems die eukaryotische Replikation nachzuvollziehen. Tabelle 1-1 zeigt einige homologe Replikationsproteine von Eukaryoten und Archaea. Zum Vergleich ist das entsprechende Funktionshomolog aus Bakterien ebenfalls aufgeführt.

In allen der hier beschriebenen Prozesse der Replikationsinitiation spielen NTP-hydrolysierende Proteine eine entscheidende Rolle. Bei diesen Proteinen handelt es sich um NTPasen, von denen die meisten der Gruppe der AAA⁺-ATPasen zuzurechnen sind.

Tabelle 1-1: Replikationsproteine in Bakterien (*E. coli*), Eukaryoten (Mensch und Hefe) und Archaea. Die Tabelle wurde nach (Kelman, 2000) abgewandelt.

Proteinfunktion	Bakterien	Eukaryoten	Archaea
Erkennung des Replikationsursprungs	DnaA (1 UE)	ORC-Komplex (6 UE, ORC1-6)	ORC1-Homolog (nicht in allen Archaea)
Ladung der Helikase	DnaC (1 UE)	Cdc6 (1 UE)	Cdc6-Homolog (0 bis mehrere Homologe)
Replikative Helikase	DnaB (1 UE)	MCM (6 UE) ¹	MCM-Homolog (1 bis 4 Homologe)
Topoisomerase	Typ I und II Reverse Gyrase ²	Typ I und II	Typ I und II Reverse Gyrase ²
Einzelstrang-DNA-Bindeprotein	SSB (1 UE)	RPA (3 UE)	RPA-Homolog (1UE)
Primase	DnaG (1 UE)	Pol α /Primase-Komplex (4 UE)	Primase-Homolog
Polymerase/ Exonuklease	Pol III Kernbereich (3 UE, α , ϵ , θ)	Pol δ (3 oder 4 UE) ³ Pol ϵ (mind. 5 UE) ⁵	Familie B DNA-Polymerase DP2-ähnliche Polymerase ⁴
Ladung der <i>sliding clamp</i>	γ -Komplex (5 UE γ , δ , δ' , χ , ψ)	RFC (5 UE, RFC1-5)	RFC-Homolog (2 UE, RFC1, RFC3)
<i>Sliding clamp</i>	β	PCNA	PCNA-Homolog
Primerentfernung	Pol I RNase H	FEN-1 RNase H	FEN-1-Homolog RNase H-Homolog
Reifung des Gegenstrangs	DNA-Ligase I (NAD-abhängig)	DNA-Ligase I (ATP-abhängig)	DNA-Ligase I-Homolog (ATP-abhängig)

¹ Es ist noch nicht endgültig geklärt, ob es sich beim MCM um die replikative Polymerase handelt.

² Nur bei thermophilen Organismen.

³ Im Menschen und *S. cerevisiae* besteht pol δ aus 3 UE, in *S. pombe* aus 4 UE.

⁴ Es ist noch nicht bewiesen, dass DP2-ähnliche Polymerasen replikative Polymerasen sind.

⁵ Es wurden noch nicht alle UE von Pol ϵ identifiziert.

1.2 AAA⁺-ATPasen

Unter den Proteinen, die Nucleosidtriphosphate binden und diese als Substrate für unterschiedlichste Reaktionen nutzen, zählen die Walker-*type*-NTPasen mit 10-18% zu den stärksten Vertretern (Iyer *et al.*, 2004). Die meisten Mitglieder der Walker-*type*-NTPasen hydrolysieren die γ - β -Phosphatbindung eines Nucleosidtriphosphats, meist ATP oder GTP, um mit der freien Energie aus der Hydrolyse chemische Arbeit zu leisten. In der Regel werden dabei Konformationsänderungen in anderen Proteinen induziert. Die Walker-*type*-NTPasen sind durch ihr konserviertes Walker A Motiv, welches auch als *P-Loop* bezeichnet wird, und das Walker B Motiv charakterisiert (Ogura & Wilkinson, 2001). Hierbei binden das Walker A Motiv mit der konservierten Sequenz GXXXXGK[ST] (X kann jede beliebige AS sein) das β - und γ -Phosphat des NTPs und das typische Walker B Motiv mit der Sequenz hhhh[DE][DE] (h sollte eine hydrophobe AS sein) ein Mg^{2+} -Kation (Vetter & Wittinghofer, 1999).

Prinzipiell unterscheidet man bei den Walker-*type*-NTPasen zwei Klassen (Abbildung 1-2). Bei der ersten handelt es sich um die sogenannte KG-Klasse (*Kinase-GTPase*), bei der die beiden charakteristischen Motive nebeneinander liegen. Bei der zweiten, der ASCE-Klasse (*Additional Strand, Catalytic E*), sind die beiden Motive in der β -Faltblattkernstruktur durch einen zusätzlichen β -Strang getrennt (Leipe *et al.*, 2002; Leipe *et al.*, 2003). In der ASCE-Klasse stellt die AAA⁺ (*ATPasen Associated With Diverse Cellular Activities*)-Familie eine besonders interessante Gruppe dar.

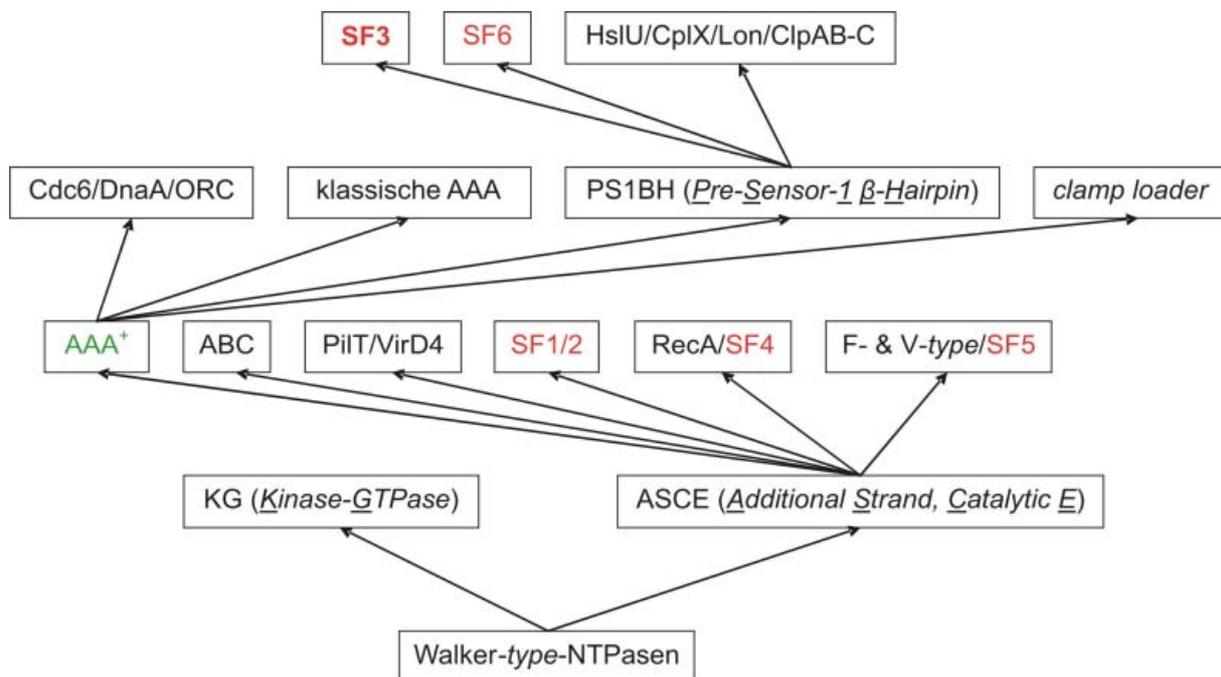


Abbildung 1-2: Phylogenetische Klassifizierung der Walker-*type*-NTPasen auf der Basis von Sequenz- und Strukturähnlichkeiten. Die AAA⁺-Familie ist grün, die Helikasesuperfamilien sind rot gekennzeichnet. Die Grafik wurde nach Iyer *et al.* (2004) und Lupas & Martin (2002) abgewandelt.

Proteine, die der AAA⁺-Familie angehören, findet man in allen drei Reichen der Bakterien, Eukaryoten und Archaea. Sie sind an einer Vielzahl zellulärer Aktivitäten beteiligt, zu denen Membranfusion, Proteolyse, Assemblierung und Abbau von Proteinkomplexen, transkriptionale Regulation, Rekombination und DNA-Replikation gehören (Neuwald *et al.*, 1999; Ogura & Wilkinson, 2001). Die Mehrheit der AAA⁺-ATPasen bilden oligomere Ringstrukturen, die symmetrische bzw. quasi-symmetrische Oberflächen für die Interaktion mit anderen Molekülen bieten oder deren Transport durch ihre zentrale Pore ermöglichen (Neuwald *et al.*, 1999; Neuwald, 1999).

Sie besitzen sowohl Ähnlichkeiten in ihren Sequenzen wie auch ihren dreidimensionalen Strukturen (Ogura *et al.*, 2004). Generell lassen sich die AAA⁺-Proteine einem von sechs Stämmen zuordnen (Iyer *et al.*, 2004). Abbildung 1-3 verdeutlicht nochmals die strukturellen Gemeinsamkeiten und Unterschiede der sechs AAA⁺-Stämme. Bei Betrachtung der Kernstruktur von AAA⁺-ATPasen fällt auf, dass es sich bei ihren ATPase-Domänen um eine parallel angeordnete Faltblattstruktur handelt. Diese nimmt eine 51432-Topologie ein, wobei Strang 1 das Walker A Motiv und Strang 3 das Walker B Motiv einschließt (Guenther *et al.*, 1997; Lenzen *et al.*, 1998; Neuwald *et al.*, 1999). Der Kernbereich der AAA⁺-ATPasen unterscheidet sich stark von den meisten anderen Proteinen der ASCE-Klasse durch das Vorhandensein einer α -Helix, N-terminal zum Walker A Motiv, das Fehlen von β -Strängen „rechts“ von Strang 2, und das Vorliegen eines weiteren Motivs in Strang 4. Dieses als Sensor-1 oder Motiv C bezeichnete Motiv beinhaltet einen konservierten polaren Aminosäurerest, von dem angenommen wird, dass er weniger für die ATP-Bindung als vielmehr für die ATP-Hydrolyse eine wichtige Rolle spielt (Guenther *et al.*, 1997; Putnam *et al.*, 2001). Darüber hinaus ist C-terminal von Strang 5 ein Bündel aus vier Helices gelegen, welches das Sensor-2 Motiv mit einem konservierten Argininrest trägt. Dieser ist in den klassischen AAA-Proteinen oft durch ein Alanin ersetzt. Das Sensor-2 Motiv scheint für die Übertragung der freien Energie der ATP-Hydrolyse auf das entsprechende Substrat des AAA⁺-Proteins verantwortlich zu sein (Ogura & Wilkinson, 2001). Schließlich ist der sogenannte Argininfinger als letztes wichtiges Element zu nennen. Dieser ist am C-Terminus der Helix stromaufwärts von Strang 5 gelegen und wirkt bei der ATP-Hydrolyse in einer benachbarten Untereinheit mit (Putnam *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002).

Für diese Arbeit war besonders der PS1BH-Superstamm (*Pre-Sensor-1 β -Hairpin*) von Interesse, da dieser Superstamm sowohl die Superfamilie 3- als auch die Superfamilie 6-Helikasen mit einschließt. Der Unterschied zu den anderen AAA⁺-Stämmen liegt in einer Insertion zwischen dem Strang 4 (Sensor-1) und der vorangehenden Helix. Diese Insertion bildet einen sogenannten *β -Hairpin*, der aus der AAA⁺-Kernstruktur herausragt (Bochtler *et al.*, 2000; Fodje *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003; Putnam *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2002).

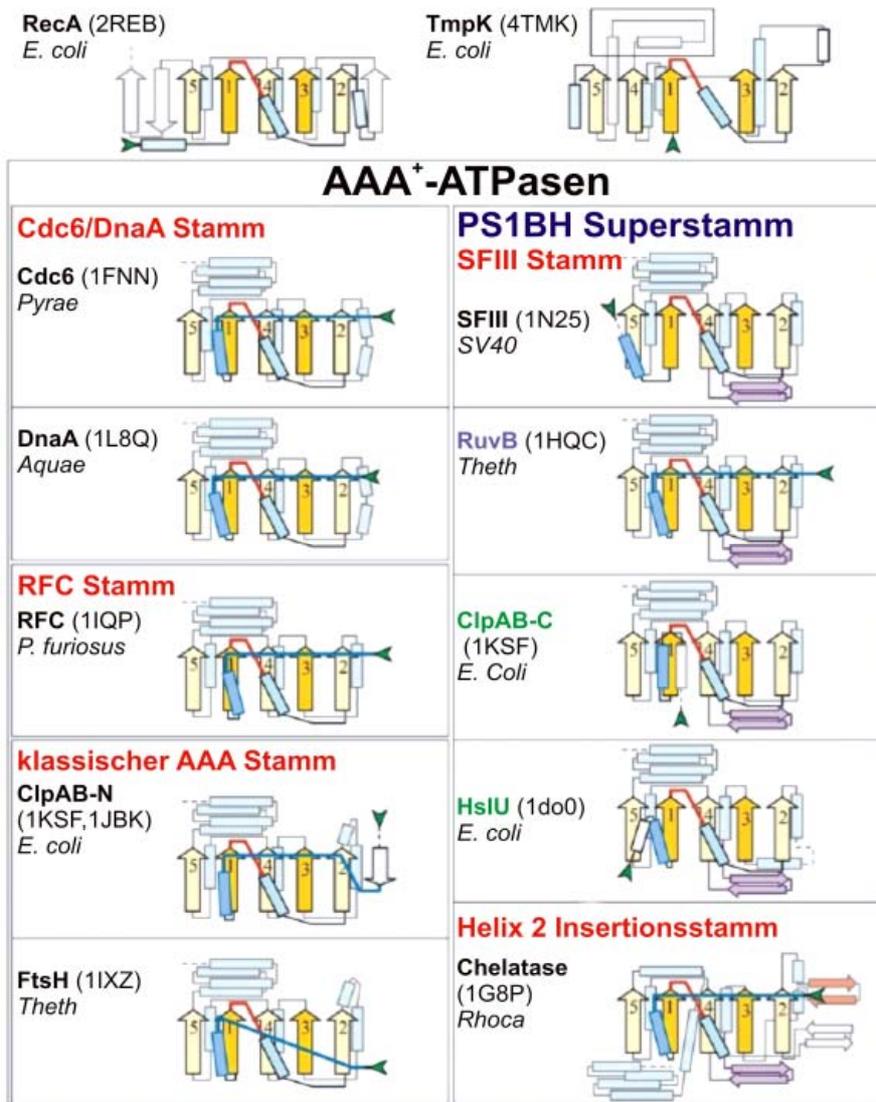


Abbildung 1-3: Topologiediagramme von ausgewählten AAA⁺-ATPasen und anderen Walker-type-NTPasen. Angegeben ist jeweils der Proteinname, der PDB-Kode in Klammern, sowie der zugehörige Organismusname. In Blau sind die AAA⁺-Superstämme, in Rot die AAA⁺-Stämme und in Grün HslU und ClpAB-C markiert, die mit weiteren Proteinen den Stamm HslU/ClpX/Lon/ClpAB-C bilden. In Lila ist RuvB gekennzeichnet, da es sich innerhalb des PS1BH-Superstamms keinem Stamm zuordnen lässt. Die Stränge sind als Pfeile dargestellt, mit der Pfeilspitze als C-Terminus und von 1 bis 5 durchnummeriert. Strang 1 mit dem konservierten Walker A Motiv (GXXXXGK[ST]) und Strang 3 mit dem typischen Walker B Motiv (hhhh[DE][DE]) sind in Orange markiert. Die anderen Stränge (2, 4, 5) des Kernbereichs sind in Gelb dargestellt. Nicht konservierte Stränge sind grau. Helices, die oberhalb der Ebene der β -Faltblattstruktur verlaufen, sind als blaue Rechtecke gekennzeichnet. Wenn sie unterhalb der Ebene verlaufen, sind sie hellblau markiert. Der P-Loop (Walker A Motiv) ist als rote Linie zu erkennen. Eine grüne Pfeilspitze markiert den N-Terminus der ATPase-Domäne. Der Loop, der über den Kernbereich der β -Faltblattstruktur verläuft und sich vor der Helix von Strang 1 befindet, also das charakteristische Merkmal der AAA⁺-ATPasen, ist in Dunkelblau gekennzeichnet. Der β -Hairpin, der das Hauptmerkmal der Mitglieder des PS1BH-Superstamms darstellt, ist lila markiert. Unterbrochene Linien stellen Sekundärstrukturen dar, die entweder nicht in den PDB-Dateien enthalten waren oder aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen wurden. Über der Tabelle sind zum Vergleich zwei Strukturen von Walker-type-NTPasen (RecA, ASCE Klasse und TMP Kinase, KG Klasse) angegeben die nicht zu den AAA⁺-ATPasen gehören. Die Grafik wurde nach Iyer *et al.* (2004) abgewandelt.

1.3 Helikasen

Helikasen sind nukleinsäureabhängige ATPasen, die in der Lage sind, DNA-, RNA- oder DNA/RNA-Doppelstränge zu entwinden (Shin & Kelman, 2006b). Sie spielen in nahezu allen Prozessen, an denen Nukleinsäuren beteiligt sind, eine Rolle. So sind sie an der DNA-Replikation (Kaplan *et al.*, 2003), DNA-Reparatur (Donaldson *et al.*, 2006), Transkription (Timmins & McSweeney, 2006), Translation (Hartman *et al.*, 2006), Ribosomensynthese (Daugeron *et al.*, 2001), RNA-Reifung (Jain, 2008), RNA-Spleißen (Molnar *et al.*, 1997) und Kernexportprozessen (Ishaq *et al.*, 2008) beteiligt.

Auf der Basis von Sequenzvergleichen wurden die Helikasen in sechs Superfamilien gegliedert (Ilyina *et al.*, 1992; Gorbalenya & Koonin, 1993). Superfamilie 1 (SF1), mit *E. coli* PcrA als renommiertestem Vertreter (Velankar *et al.*, 1999), und Superfamilie 2 (SF2), mit z.B. HCV NS3 (Kim *et al.*, 1998), sind weit verbreitete Helikasen, die generell ihre Funktion als Monomer oder Dimer ausführen. Die Helikasen der Superfamilie 3 (SF3), z.B. BPV E1 (Auster & Joshua-Tor, 2004; Enemark *et al.*, 2000; Enemark *et al.*, 2002; Singleton *et al.*, 2007; Abbate *et al.*, 2004), Superfamilie 4 (SF4), z.B. T7gp4 (Sawaya *et al.*, 1999; Singleton *et al.*, 2000; Toth *et al.*, 2003), Superfamilie 5 (SF5), z.B. *E. coli* Rho (Allison *et al.*, 1998), und Superfamilie 6 (SF6), z.B. *S. solfataricus* MCM (Brewster *et al.*, 2008) hingegen bilden hexamere Ringstrukturen aus und sind oft an der Replikationsgabel vorzufinden (Donmez & Patel, 2006).

Allen Helikasen gemein ist, dass sie mehrere RecA-ähnliche Tertiärstrukturen innerhalb einer Polypeptidkette (SF1 und SF2) oder zwischen Untereinheiten (SF3-6) einnehmen (Abbildungen 1-4 (a) und (b)). Diese wandeln in einem NTP-Hydrolyse-abhängigen Prozess chemische in mechanische Energie um, was letztlich in Konformationsänderungen resultiert (Ye *et al.*, 2004). Außerdem besitzen sie alle ein Walker A Motiv und ein Walker B Motiv (Walker *et al.*, 1982), die an der NTP-Bindung und Hydrolyse beteiligt sind, sowie einen Argininfinger, der die ATP-Hydrolyse mit Konformationsänderungen im Protein koppelt (Scheffzek *et al.*, 1997). Die meisten Helikasen benötigen eine Nukleinsäureeinzelstrangregion, um an die DNA zu binden und die Entwindung des Doppelstrangs einzuleiten.

Für die Polarität der Helikasen gilt, dass sie grundsätzlich 3'-5' oder 5'-3' sein kann, abhängig davon, in welcher Richtung sich die Helikase auf dem Nukleinsäurestrang bewegt. Für diesen als Translokation bezeichneten Prozess wird die Energie aus der NTP-Hydrolyse benötigt (Gaur, 2007). Man hat festgestellt, dass bei den SF1-, SF2- und SF6-Helikasen beide Polaritäten vorzufinden sind, während man für SF4- und SF5-Helikasen nur 5'-3'-Polarität und für SF3-Helikasen ausschließlich 3'-5'-Polarität findet (Singleton *et al.*, 2007). Interessanterweise sind die einzigen beiden Helikasesuperfamilien, die den AAA⁺-ATPasen zuzurechnen sind, die Superfamilie-3- und Superfamilie-6-Helikasen (Neuwald *et al.*, 1999).

Abbildung 1-4 (c) gibt einen Überblick über die Anordnung genereller sowie superfamilienpezifischer Helikasemotive.

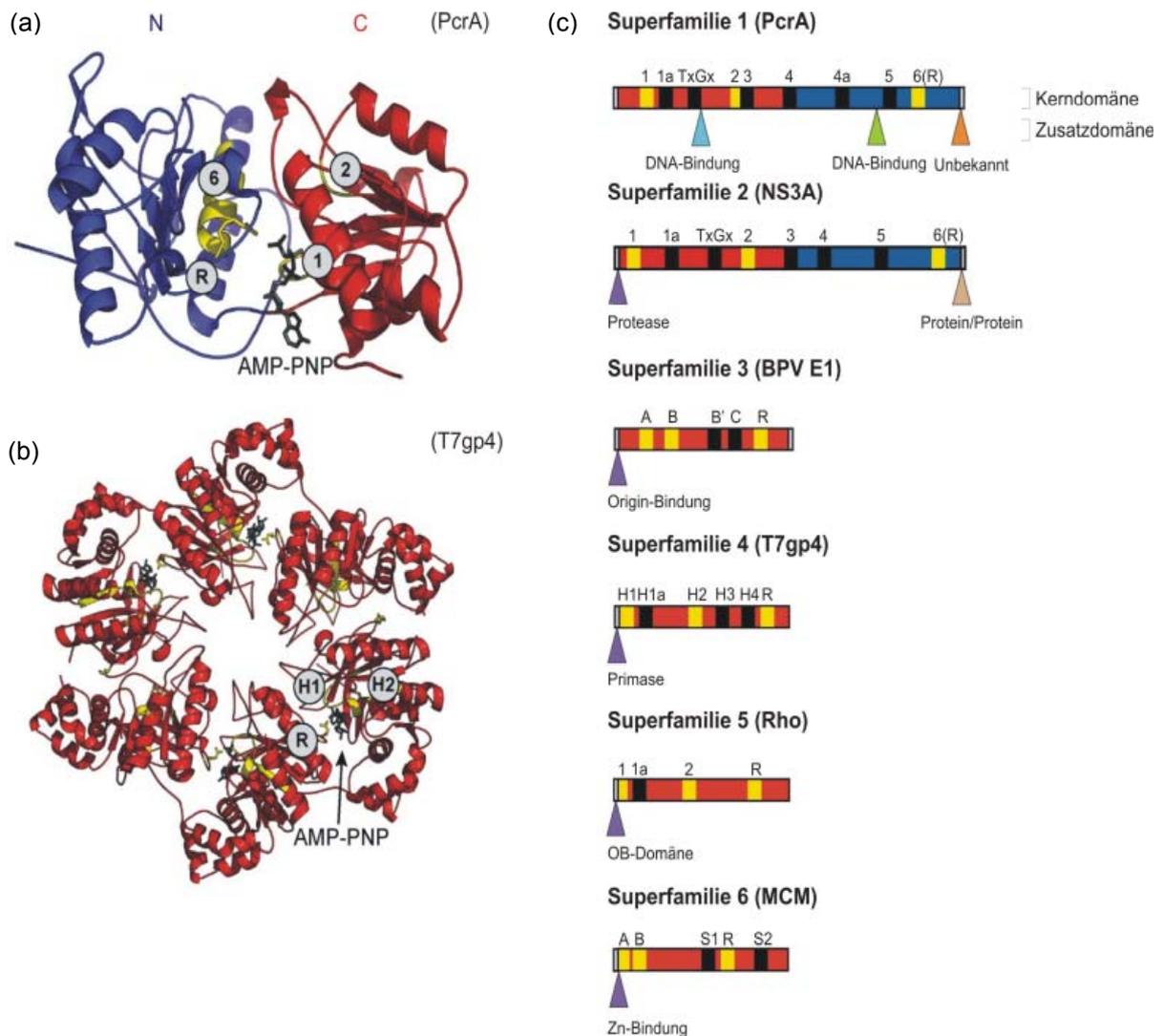


Abbildung 1-4: (a,b) RecA-ähnliche Tertiärstrukturen der Helikasen. (a) Repräsentative Struktur von PcrA für SF1- und SF2-Helikasen. Diese besitzen einen monomeren Kernbereich, der sich aus einem *Tandem-Repeat* einer RecA-ähnlichen Tertiärstruktur ableitet. Die N- bzw. C-terminalen RecA-ähnlichen Domänen sind blau bzw. rot markiert. Darüber hinaus sind das Walker A Motiv (1), das Walker B Motiv (2) und das Motiv 6 (6), welches den Argininfinger mit einschließt, gekennzeichnet. Die abgebildete Struktur stellt den minimalen Translokationsmotor dar. (b) Repräsentative Struktur von T7gp4 für SF3, 4, 5 und 6-Helikasen. Diese besitzen einen Kernbereich, der sich aus sechs individuellen RecA-ähnlichen bzw. AAA⁺-ähnlichen Domänen (rot) zusammensetzt, welche einen hexameren Ring bilden. Es sind sechs Nukleotidbindetaschen an den Grenzflächen der Untereinheiten zu erkennen. Vier davon sind mit dem ATP-Analogen AMP-PnP (schwarz) besetzt. Zu sehen sind auch das Walker A Motiv (H1), das Walker B Motiv (H2) und der Argininfinger (R). (c) Domänenorganisation der Helikasesuperfamilien. Der Name des Proteins von jeder der sechs Helikasesuperfamilien, der als Beispiel für die Charakterisierung herangezogen wurde, ist in Klammern angegeben. Dargestellt sind der Kernbereich und die Signaturmotive jeder Helikasesuperfamilie. Die genaue Lage der Motive ist von dem Protein abhängig, das als Beispiel gewählt wurde, ist aber für die entsprechende Familie repräsentativ. In Gelb sind die in allen Helikasen universell vorkommenden strukturellen Motive markiert. Die Position und Funktion zusätzlicher Domänen sind auch angegeben. Diese sind jedoch selbst für Proteine derselben Familie verschieden. 1, A oder H1 steht für das Walker A Motiv (GXXXXGK[ST]); 2, B oder H2 steht für das Walker B Motiv (hhhh[DE][DE]); R oder (R) steht für das Motiv, welches den Argininfinger mit einschließt. Bei den anderen Motiven handelt es sich um für jede Helikasesuperfamilie spezifische Signaturen (Hall & Matson, 1999). Die Grafik wurde nach Singleton *et al.* (2007) abgewandelt.

1.4 SF3-Helikasen

Ursprünglich wurden die SF3-Helikasen in kleinen RNA-Viren wie z.B. den Picornaviren, DNA-Viren wie z.B. den Baculoviren und Phagen wie z.B. P4 entdeckt (Gorbalenya *et al.*, 1990; Koonin, 1993). Bemerkenswerterweise findet man SF3-Helikasen außer als Überreste von Prophagen innerhalb zellulärer Genome nicht. Es scheint so, als ob sich die SF3-Helikasen in kleinen primitiven Replikons entwickelt haben, die jetzt nur noch in Viren zu finden sind. Das Aufkommen komplexerer DNA-Replikationssysteme innerhalb des archaealen-eukaryotischen und des bakteriellen Zweigs haben wahrscheinlich diese einfacheren Helikasen in zellulären Systemen verdrängt (Iyer *et al.*, 2004).

Trotz ihrer Gemeinsamkeiten mit den Helikasen anderer Superfamilien sind sie ebenso wie die Helikasen der Superfamilie 6 strukturell näher mit den AAA⁺-Proteinen als mit RecA verwandt. Sie weisen somit alle AAA⁺-spezifischen Sequenzmotive und Strukturelemente sowie den für Mitglieder des PS1BH-Superstamms typischen β -Hairpin auf (siehe Abbildung 1-3).

Die Anordnung der für SF3-Helikasen spezifischen Sequenzmotive ist in Abbildung 1-4 (c) dargestellt. Zu ihnen zählen das Walker A Motiv (GXXXXGK[ST]), das Walker B Motiv (hhhh[DE][DE]), das B' Motiv (SV40 L Tag; RDYLDGSKVNLEKK (Yoon-Robarts *et al.*, 2004)) und das Motiv C (xxxx[TS][TS]N) (Gorbalenya *et al.*, 1989). SF3-Helikasen bilden generell hexamere Ringstrukturen aus. Dabei ragen die β -Hairpins der 6 Untereinheiten der SF3-Helikasen in die zentrale Pore des Hexamers. Positive Aminosäuren an der Spitze der β -Hairpins sind für die Bindung und den Transport der DNA durch die zentrale Pore verantwortlich (Enemark & Joshua-Tor, 2006). Dabei bewegt sich die Helikase ausschließlich in 3'-5'-Richtung. Außerdem besitzen alle SF3-Helikasen eine α -helikale Domäne, die N-terminal zur Helikasedomäne gelegen ist. Diese scheint eine entscheidende Rolle bei der Hexamerisierung zu spielen, da die isolierten AAA⁺-Domänen nicht mehr in der Lage sind, zu multimerisieren (Li *et al.*, 2003).

Alle bis heute bekannten SF3-Helikasen stellen Domänen von größeren Replikationsursprungsbinde- oder Initiatorproteinen dar. Abbildung 1-5 zeigt die Domänenorganisation der SF3-Helikasen SV40 L Tag (Li *et al.*, 2003; Stewart *et al.*, 1996), HBV18 E1 (Abbate *et al.*, 2004; Titolo *et al.*, 2003a) und AAV2 Rep (James *et al.*, 2003; James *et al.*, 2004) für die bereits Kristallstrukturen vorliegen.

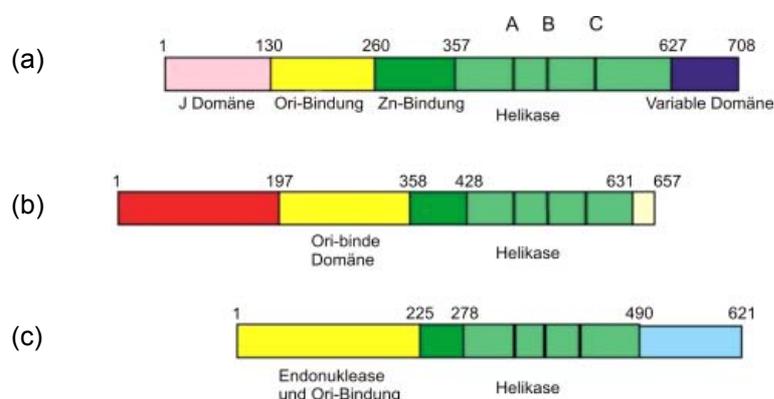


Abbildung 1-5: Domänenorganisation von (a) SV40 L Tag, (b) HPV18 E1 und (c) AAV2 Rep. Die Angabe der Aminosäurepositionen ist nur ungefähr. Die SF3-Helikase ist grün dargestellt, die dazugehörige AAA⁺-Domäne in Dunkelgrün und die α -helikale Domäne in Hellgrün. Die drei dunklen Balken innerhalb der AAA⁺-Domäne stellen das Walker A Motiv (A), das Walker B Motiv (B) und das Motiv C (C) dar. Die Grafik wurde nach Hickman & Dyda (2005) abgewandelt.

Die Assoziation mit Replikationsursprungsbindedomänen erklärt die Funktion der Helikasen bei der Replikation die DNA am Replikationsursprung aufzuschmelzen, bevor sich die Replikationsgabel ausbilden kann. An der Replikationsgabel übernehmen sie dann die Rolle von replikativen Helikasen. Das Aufschmelzen der DNA am Replikationsursprung bzw. die Translokation und Entwindung von DNA oder RNA setzt die NTP-Hydrolyse voraus.

Für hexamere Helikasen wie die SF3-Helikasen wurden unterschiedliche Mechanismen der NTP-Hydrolyse skizziert (Abbildung 1-6). In den drei Modellen zeigen alle Untereinheiten katalytische Aktivität und durchlaufen die NTP- (N), NDP- (D) und E-Zustände (*Empty/Leer*).

Im *all sequential model* wird die NTP-Hydrolyse zwischen benachbarten Untereinheiten koordiniert und die N-, D- und E-Zustände liegen in drei aufeinanderfolgenden Untereinheiten.

Eine Variation dieses Modells stellt das *sequential block model* dar. Hier bilden mehrere nebeneinanderliegende Untereinheiten, die sich im selben Hydrolysezustand befinden, Blöcke, die in einem tretmühlenartigen Mechanismus rotieren. Dieser Mechanismus wird unter anderem für BPV E1 (SF3) und T7gp4 (SF4) angenommen (Crampton *et al.*, 2006; Dillingham, 2006; Enemark & Joshua-Tor, 2006).

Im *concerted model* befinden sich alle Untereinheiten im selben Zustand und wechseln gleichzeitig in den nächsten. Dieses Modell wird unter anderem für SV40 L Tag angenommen (Gai *et al.*, 2004). Welcher dieser Mechanismen für welche der SF3-Helikasen gilt, ist noch offen und Modifikationen dieser Mechanismen sind vorstellbar.

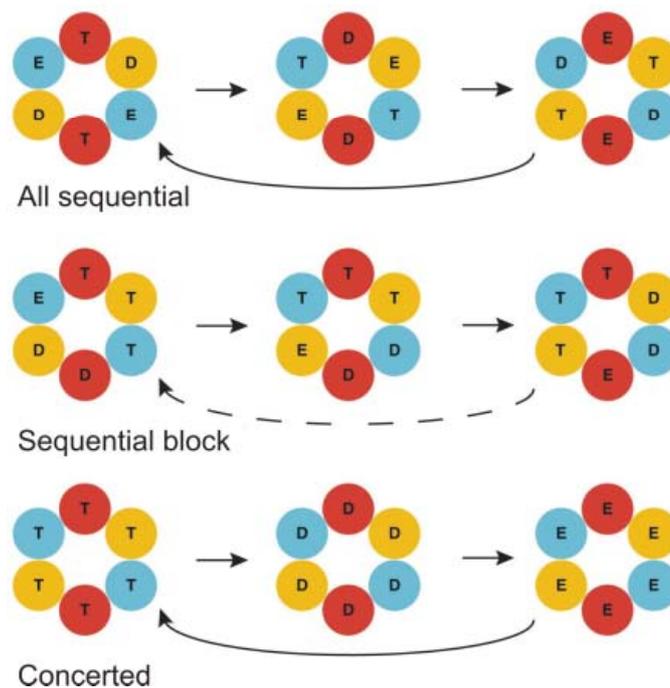


Abbildung 1-6: Modelle für die NTP-Hydrolyse. Die unterschiedlichen Farben kennzeichnen die verschiedenen Untereinheiten. Die verschiedenen NTP-Zustände sind durch die entsprechenden Buchstaben abgekürzt: T (NTP), D (NDP) und E (*Empty/Leer*). Bei den Mechanismen, bei welchen nur 3 Schritte zu erwarten sind, markiert der durchgängig schwarze Pfeil den Start eines neuen Zyklus. Der gestrichelte Pfeil deutet an, dass mehr als drei Schritte pro Zyklus zu erwarten sind. Die Grafik wurde nach Singleton *et al.* (2007) abgewandelt.

Um eine Strangentwindung einzuleiten, bevorzugen hexamere Ringhelikasen wie die SF3-Helikasen, DNA-Doppelstrangsubstrate mit 3'- und 5'-Überhang (Jezewska *et al.*, 1998; Venkatesan & Nossal, 1982). Diese sind unter anderem an der Replikationsgabel zu finden. Es wurden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen, um einen DNA-Doppelstrang zu entwenden (Abbildung 1-7).

Bei dem sogenannten *strand exclusion model* transloziert die Ringhelikase auf dem einen Strang, während der andere sterisch ausgeschlossen wird. Dieses Modell bietet den Vorteil, dass eine Reassoziaton der entwundenen Stränge verhindert wird. Man unterscheidet hierbei drei Typen des *strand exclusion model*, wobei es bei allen drei Typen zu einer Wechselwirkung zwischen Helikase und dem in der zentralen Pore befindlichen Strang kommt. Beim *wegde type* kommt es kaum oder gar nicht zu spezifischen Wechselwirkungen zwischen der Helikase und dem ausgeschlossenen Strang. Im *torsional type* hingegen gibt es noch zusätzliche Wechselwirkungen zwischen der äußeren Oberfläche der Helikase und dem ausgeschlossenen Strang. Im *helix destabilizing type* kommt es zusätzlich zu Interaktionen zwischen der äußeren Helikaseoberfläche und dem DNA-Doppelstrang (Patel & Picha, 2000). Das *strand exclusion model* wird unter anderem für AAV2 Rep angenommen (Meinke *et al.*, 2007) und konnte für BPV E1 weitestgehend bestätigt werden (Enemark & Joshua-Tor, 2006).

Im *DNA pump model*, wie es z.B. für MCM (SF6) vorgeschlagen wird, (Takahashi *et al.*, 2005), liegen zwei hexamere Helikasen Kopf an Kopf und bilden ein Doppelhexamer aus. Der DNA-Doppelstrang wird hierbei von beiden Seiten an die Grenzfläche der beiden Hexamere gepumpt, wo die Entwindung des Dopplestrangs erfolgt. Für SV40 L Tag wurde ein Mechanismus vorgeschlagen, bei dem die Helikase den DNA-Doppelstrang bindet und die Stränge trennt, indem sie diese durch separate Seitenkanäle zwingt.

Beim *ploughshare model* hingegen transloziert die Helikase auf dem DNA-Doppelstrang und entwindet diesen, ähnlich einem Pflug, durch das Platzieren eines Elements zwischen den beiden Strängen. Modelle, bei denen der DNA-Doppelstrang gebunden wird, haben den Nachteil, dass es zu einer Reassoziaton der Einzelstränge kommen kann. Deswegen muss für diese Mechanismen das Vorhandensein von weiteren Proteinen angenommen werden, die ein unverzügliches Reassoziieren der Einzelstränge verhindern.

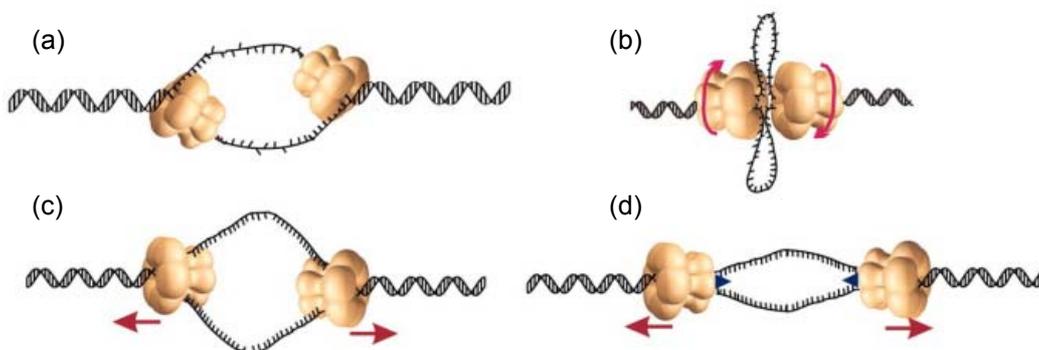


Abbildung 1-7: Mechanismen für die DNA-Doppelstrang-Entwindung. (a) *Strand exclusion model*; (b) *DNA pump model*; (c) *SV40 L Tag model*; (d) *ploughshare model*. Die Grafik wurde nach Patel & Donmez (2006) abgewandelt.

1.5 Archaeale Plasmide

Plasmide und andere mobile genetische Elemente wie Bakteriophagen und Viren haben sich als exzellente Modellsysteme, zur Untersuchung der fundamentalen Informationsprozesse wie der Replikation in Bakterien und Eukaryoten, herausgestellt. So wurden anhand des temperenten Phagen λ grundlegende Konzepte für die Genregulation entwickelt. Überwiegend wurde die eukaryotische und bakterielle Replikation mit Hilfe von Bakteriophagen (z.B. T7), Plasmiden (z.B. ColE1) und Viren (z.B. SV40) aufgeklärt (Kornberg & Baker, 1992).

Im Gegensatz hierzu sind archaeale Plasmide und Viren vergleichsweise wenig untersucht (Garrett *et al.*, 2005). Die Sequenzierung der Plasmidgenome erlaubte es dennoch, Vorhersagen über die Regulation und Replikation einiger dieser Plasmide zu treffen. Sequenziert wurden unter anderem aus den drei großen Zweigen der Euryarchaeoten die archaealen Plasmide pC2A aus *Methanosarcina acetivorans* (Metcalf *et al.*, 1997), pNRC100 aus *Halobacterium sp.* NRC-1 (Ng *et al.*, 1998) und pGT5 aus *Pyrococcus abyssi* (Erauso *et al.*, 1996). Unter den Crenarchaeota sind für die Gattungen *Sulfolobus* (Keeling *et al.*, 1996), *Acidianus* (Kletzin *et al.*, 1999) und *Thermofilum* Plasmide sequenziert worden. Die Gattung *Sulfolobus* schließt zwei Gruppen von Plasmiden ein (Lipps, 2006), nämlich konjugative Plasmide mit einer Genomgröße zwischen 25 und 42 kb, die ein Cluster konservierter Gene zu kodieren scheinen, welche möglicherweise für den konjugativen DNA-Transport verantwortlich sind (Greve *et al.*, 2004), und kleinere kryptische Plasmide mit einer Genomgröße zwischen 5 und 14 kb. Einige der kryptischen Plasmide wurden aus Isolaten von Island gewonnen und gehören der Plasmidfamilie pRN an. Bei Plasmiden, die aus Isolaten aus Italien und Neuseeland stammen (Greve *et al.*, 2005), ist noch nicht geklärt, ob sie auch der pRN-Familie angehören, da sie nicht alle offenen Leseraster der pRN-Familie teilen. Die biochemisch am besten untersuchten archaealen Plasmide sind das Plasmid pGT5 aus *Pyrococcus abyssi* und pRN1 aus *Sulfolobus islandicus*. Das Plasmid pGT5 (3444 bp) kodiert für ein Protein mit Sequenzähnlichkeit zum bakteriellen Initiationsprotein des *Rolling-Circle*-Replikationsmechanismus, von dem gezeigt werden konnte, dass es *Nicking*- und *Closing*-Aktivität am vorhergesagten doppelsträngigen Replikationsursprung besitzt (Marsin & Forterre, 1998). Das Plasmid pRN1 soll im folgenden Kapitel genauer beschrieben werden.

1.6 Das archaeale Plasmid pRN1

Das Plasmid pRN1 (Abbildung 1-8) ist ein 5320 bp langes zirkuläres Plasmid des Crenarchaeoten *Sulfolobus islandicus* (Keeling *et al.*, 1996) welches der pRN-Familie zuzuordnen ist (Peng *et al.*, 2000) und nach heutigem Stand zu keinem bekannten bakteriellen Plasmid in Verwandtschaft zu stehen scheint (Lipps, 2009). Das Plasmid pRN1 teilt mit den anderen Plasmiden der pRN-Familie drei hoch konservierte offene Leseraster, deren Genprodukte biochemisch genauer analysiert wurden.

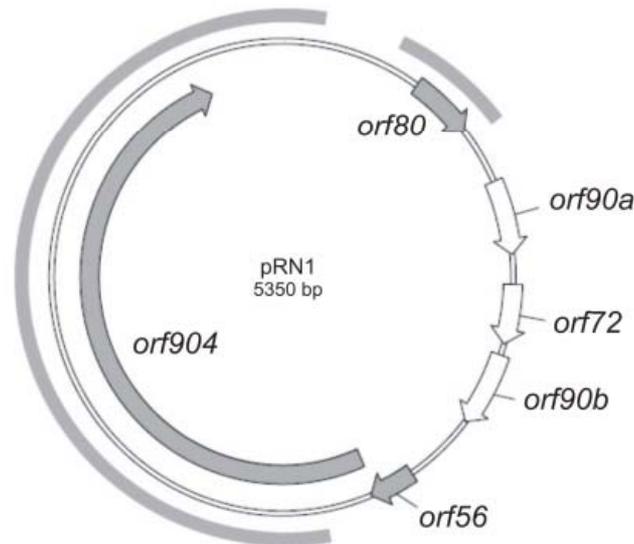


Abbildung 1-8: Plasmidkarte von pRN1. In der pRN-Familie konservierte offene Leseraster sind dunkelgrau markiert, der variable Anteil von pRN1 ist weiß dargestellt. In Grau sind die Bereiche, die in allen Plasmiden der pRN-Familie konserviert sind gekennzeichnet. Die Grafik wurde nach Berkner & Lipps (2007) abgewandelt.

Das erste, ORF56, ist ein 6,5 kDa großes, DNA-bindendes Protein, welches in Lösung als Dimer vorliegt. Die Bindung an die DNA erfolgt dabei als Tetramer stromaufwärts seines eigenen Gens an einen *inverted repeat*. Es scheint an der Regulation der Expression des Co-Transkripts *orf56/orf904* beteiligt zu sein. ORF56 scheint als Repressor zu agieren und so Einfluss auf die Kontrolle der Kopienzahl des Plasmids zu nehmen (Berkner & Lipps, 2007; Lipps *et al.*, 2001b).

Das zweite, ORF80, mit einem Molekulargewicht von 9,5 kDa, ist ebenfalls ein DNA-bindendes Protein, welches nicht nur auf die pRN-Familie beschränkt ist (Lipps *et al.*, 2001a). ORF80 bindet an zwei hoch symmetrische Bindestellen stromaufwärts seines eigenen Gens. Dabei bilden mehrere Proteine mit der DNA einen großen Komplex aus. Die genaue Funktion dieses Proteins ist nicht bekannt, es stand aber unter dem Verdacht, den Replikationsursprung zu erkennen (Lipps *et al.*, 2001a). Eine Unterbrechung des Gens verhindert nicht die Replikation (Berkner *et al.*, 2007). Ebenso wird der Verlust der Bindungsstellen und des kompletten Gens toleriert. Es scheint, dass ORF80 keine für die Replikation essentielle Rolle spielt. Auf der anderen Seite konnte aber gezeigt werden, dass bei Deletion von ORF80 das Plasmid unter nicht selektiven Bedingungen schneller verloren geht (Berkner *et al.*, 2007), was dafür spricht, dass ORF80 für die Stabilität von pRN1 eine wichtige Rolle zu spielen scheint.

Bei dem dritten Protein handelt es sich um das 106 kDa große Replikationsprotein ORF904. Sein Gen umfasst nahezu die Hälfte des Plasmids pRN1. Es weist ATPase-, Primase- und DNA-Polymeraseaktivität auf (Lipps *et al.*, 2003). Das Vorfinden dieser drei, für die Replikation essentiellen Aktivitäten in einem Protein machen es einzigartig. ORF904 besteht aus mindestens zwei Domänen. Bei der ersten handelt es sich um die N-terminale Prim/Pol-Domäne, die sowohl Primase- als auch Polymeraseaktivität aufweist (Lipps *et al.*, 2004). Die Primase erkennt spezifisch ein GTG-Motiv in der *Template*-DNA und synthetisiert daraufhin einen Primer, beginnend mit einem Ribonukleotid, auf das ausschließlich Desoxynukleotide folgen (Beck & Lipps, 2007). Bei dem durch die Primase von

ORF904 synthetisierten Primer handelt es sich womöglich um den ersten Primer der Plasmidreplikationsinitiation. Vor der Primersynthese muss jedoch die Doppelstrang-DNA am Replikationsursprung entwunden werden, um dem katalytischen Zentrum der Primase Einzelstrang-DNA zur Verfügung zu stellen.

Bei der zweiten Domäne handelt es sich um die C-terminale ATPase/SF3-Helikasedomäne. Diese soll in dieser Arbeit genauer charakterisiert werden, da sie möglicherweise an der Replikationsinitiation beteiligt und in der Lage ist, den Replikationsursprung zu erkennen und aufzuschmelzen.

1.7 Die Replikationsinitiation von pRN1

Generell ist der Replikationsursprung von pRN1 und anderer crenarchaealer Plasmide nicht bekannt. Es konnten bioinformatische Hinweise für die Existenz eines doppelsträngigen und einzelsträngigen Replikationsursprung gefunden werden, die eine Replikation von pRN1 nach dem *Rolling-Circle*-Mechanismus vermuten lassen (Kletzin *et al.*, 1999). Es gibt jedoch keinerlei experimentelle oder bioinformatische Informationen über die notwendige Existenz einer Endonuklease als Initiatorprotein für die *Rolling-Circle*-Replikation am doppelsträngigen Replikationsursprung (Kahn, 1997). Auch spricht die Tatsache, dass ORF904 einen Primer synthetisieren kann, gegen eine *Rolling-Circle*-Replikation (Lipps, 2004). AT-reiche Regionen und Iterons, die potentielle Bindungsstellen für an der Replikation beteiligte Proteine darstellen, sind gute Hinweise auf einen typischen Replikationsursprung (Del *et al.*, 1998). AT-reiche Regionen sind jedoch auf pRN1 mit einem GC-Gehalt von 37%, nahezu nicht zu identifizieren. So konnte auch der Replikationsursprung nicht alleine anhand von Sequenzanalysen bestimmt werden. Es gelang jedoch, durch die Deletion verschiedener Bereiche von pRN1 eine Region stromabwärts von *orf904* als für die Replikation notwendig zu identifizieren (Berkner & Lipps, unveröffentlicht). Dieser Bereich bildet eine ausgeprägte *Stemloop*-Struktur aus und war bereits bei der Sequenzierung des Plasmids aufgefallen (Keeling *et al.*, 1996). Möglicherweise dient dieser nicht codierende Bereich des Plasmids als Replikationsursprung. Das Vorliegen von Iterons in dieser Region konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Welches Protein bzw. welche Proteine letztendlich den Replikationsursprung erkennen und aufschmelzen, ist noch nicht bekannt.

Generell ist der Prozess des Aufschmelzens des Replikationsursprungs nicht einmal für chromosomale DNA richtig verstanden. Bei Bakterien wie auch für Archaea und Eukaryoten wird die Bildung großer Nukleoproteinkomplexe für die Destabilisierung der Doppelstrang-DNA verantwortlich gemacht, was letztlich zur Öffnung des Replikationsursprungs und zur Bildung des Replisoms führt (Clarey *et al.*, 2006; Dueber *et al.*, 2007; Mott & Berger, 2007). An diesem Prozess sind die bereits erwähnten AAA⁺-ATPasen wie z.B. Orc1, Cdc6 und DnaA beteiligt, aber auch die ebenfalls dazugehörigen Superfamilie-3-Helikasen, die für die DNA-Replikationsinitiation bei Viren und anderen genetischen Elementen verantwortlich sind. Die SF3-Helikasen stehen im Verdacht, den Replikationsursprung aufzuschmelzen und auch als replikative Helikasen zu fungieren. Zu den am besten untersuchten Superfamilie-3-Helikasen zählen das *Large T Antigen* des Simianvirus 40 und die homologen Proteine des Adeno-assoziierten Virus 2 und des Papillomavirus. Die Kristallstrukturen dieser Proteine zeigen, dass die Helikasen hexamere Ringe um die DNA bilden. Durch ATP-Hydrolyse hervorgerufene Konformationsänderungen der in der zentralen Pore befindlichen *β -Hairpins* führen zu

einem gerichteten Transport der DNA durch die zentrale Pore (Enemark & Joshua-Tor, 2006; Gai *et al.*, 2004). Der molekulare Öffnungsmechanismus der Doppelstrang-DNA am Replikationsursprung durch Superfamilie-3-Helikasen ist bis heute noch nicht geklärt.

Sequenzstudien und Strukturmodelle des Helikasekernbereichs von ORF904 deuten darauf hin, dass es sich bei dem Protein ebenfalls um eine SF3-Helikase handeln könnte. Für diese würde möglicherweise ein ähnlicher Mechanismus bei der Replikationsinitiation wie für andere SF3-Helikasen gelten.

1.8 Problemstellung

Da die Funktion der Primase/Polymerasedomäne von ORF904 bereits eingehend biochemisch und strukturell untersucht worden ist, war es von Interesse, auch die ATPase/Helikasedomäne genauer zu charakterisieren und ihre Rolle für die Replikation aufzuklären.

Es war bereits bekannt, dass die ATPase-Aktivität von ORF904 durch RNA gar nicht, durch Einzelstrang-DNA nur schwach und durch Doppelstrang-DNA sehr stark stimuliert wird. Eine spezifische Zunahme der ATPase-Aktivität in Gegenwart von pRN1 konnte genausowenig beobachtet werden wie die Entwindung von komplett doppelsträngigen Helikasesubstraten oder Substraten mit 5'- oder 3'-Überhang auf der Basis von M13-DNA.

Daher wurden für weitere Untersuchungen kurze Helikasesubstrate auf der Basis von Oligodesoxynukleotiden verwendet. Mit diesen Substraten sollte es dann möglich sein, die Anforderungen von ORF904 an das Substrat sowie die ATPase-, DNA-Bindungs-, Translokations- und Entwindungsaktivität eingehend zu untersuchen.

Um letztlich Aufschluss über den Replikationsursprung von pRN1 zu erhalten, sollten *Footprint*-Analysen durchgeführt werden. Zusammen mit den Ergebnissen aus der Charakterisierung von ORF904 sollte es so möglich sein, ein Modell für die Replikationsinitiation von pRN1 aufzustellen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Häufig verwendete Chemikalien sind in Tabelle 2-1 aufgeführt. Alle weiteren hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden in *per analysis* Qualität von Merck (Darmstadt) bezogen und Oligodesoxynukleotide ausschließlich von Metabion (Planegg-Martinsried). In den folgenden Tabellen sind verwendete Chromatographiematerialien (Tabelle 2-2), Hilfsmittel (Tabelle 2-3), Geräte (Tabelle 2-4), verwendete Computerprogramme (Tabelle 2-5), kommerziell erhältliche Systeme (Tabelle 2-6), Enzyme und Proteine (Tabelle 2-7), Längenstandards (Tabelle 2-8), Antikörper (Tabelle 2-9), Oligodesoxynukleotide (Tabelle 2-10), Bakterien- und Phagenstämme (Tabelle 2-11) und Plasmide (Tabelle 2-12) aufgelistet.

Tabelle 2-1: Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
2-Mercaptoethanol	Fluka BioChemika, Neu Ulm
α -[³² P]-ATP (3000 Ci/mmol)	Hartmann Analytic, Braunschweig
γ -[³² P]-ATP (3000 Ci/mmol)	Hartmann Analytic, Braunschweig
γ -S-ATP	Sigma-Aldrich, München
Acrylamid: Bisacrylamid (19:1), 25 %	Roth, Karlsruhe
Acrylamid: Bisacrylamid (29:1), 40 %	Roth, Karlsruhe
ADP	Sigma-Aldrich, München
Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose (NEEO, GTQ)	Roth, Karlsruhe
AMP	Sigma-Aldrich, München
Ampicillin	Gerbu, Gaiberg
AMP-PnP	Sigma-Aldrich, München
APS (Ammonium-Peroxodisulfat)	Roth, Karlsruhe
Biotin	Gerbu, Gaiberg
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Gerbu, Gaiberg
Complete EDTA-free Protease Inhibitor Mix	Roche, Mannheim
DTT (Dithiothreitol)	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Gerbu, Gaiberg
IPTG	Gerbu, Gaiberg
Kanamycin	Gerbu, Gaiberg
Phenol (TE-gesättigt)	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid	Roth, Karlsruhe

Pepton	Gerbu, Gaiberg
Ribonukleotide	Roth, Karlsruhe
Roti [®] Nanoquant	Roth, Karlsruhe
Sequenziergel Puffer Konzentrat	Roth, Karlsruhe
Sequenziergel Verdünner	Roth, Karlsruhe
Temed (N,N,N',N', Tetramethylethyldiamin)	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Tricin	Roth, Karlsruhe

Tabelle 2-2: Chromatographiematerialien

Chromatographiematerial	Bezugsquelle
Talon™	Clontech, Saint-Germain-en-Laye (F)
Fractogel EMD SO ₃ ⁻	Merck, Darmstadt
Fractogel EMD DEAE	Merck, Darmstadt
Fractogel EMD TMAE	Merck, Darmstadt
Fractogel EMD Propyl	Merck, Darmstadt
TSK-gel G3000SW	Tosoh Bioscience, Stuttgart
Hydroxylapatit	Merck, Darmstadt

Tabelle 2-3: Hilfsmittel

Hilfsmittel	Bezugsquelle
Chromatographiesäulchen Mobicols	Mo Bi Tec GmbH, Göttingen
DC-Platten Cellulose MN 300 PEI	Machery Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Einmalspritzen (2,5/20 ml)	Dispomed, Geinhausen
Eppendorfgefäße (1,5/2,0 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht
Glaspipetten	Brand, Wertheim
Kunststoffpetrischalen	Sarstedt, Nürmbrecht
Küvetten (10x4x45 mm)	Sarstedt, Nürmbrecht
Mikroliterpipetten (10/100/1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Nitrocellulosemembran (0,2 µm)	Kisker Biotech, Steinfurt
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht
Pipettenspitzen, Kunststoff	Sarstedt, Nürmbrecht
Platte F. Suspensionskultur, 48 Well, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Polyethylenröhrchen (10/50 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht
Quarzküvetten (0,1/1 cm Schichtdicke)	Hellma, Müllheim
Spritzenfilter steril (Porengröße 0,22 µm)	Roth, Karlsruhe
Ultrafiltrationsäule Vivaspin 500	Sartorius Stedim Biotech, Aubagne (F)
Ultrazentrifugationsröhrchen (12 ml)	Herolab, Wiesloch
UV-Star. Platte, 96 Well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Tabelle 2-4: Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Autoklav	Webeco, Selmsdorf
<i>Blot</i> -Apparatur Panther™ Semidry Electrobloetter HEP-1	Thermo Scientific Owl Separation Systems, Rochester NY (USA)
Brutschrank	Memmert, Schwabach
Elektrophoreseapparaturen für Agarose- und PAA-Gele	Technik, Universität Bayreuth
Elektrophoreseapparaturen <i>mighty small</i>	Hoefer, Holliston MA (USA)
Eismaschine	ZIEGRA, Isernhagen
Feinwaage 1201 MP2	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenz-Spektrometer LS-50B	Perkin Elmer, Waltham MA (USA)
FPLC LKB Gradient Pump 2249/LKB 2238 Uvicord SII/LKB 2210 Recorder	GE Healthcare, München (ehem. Pharmacia)
Geldokumentation UV-Transilluminator	Intas, Göttingen
Geltrockenapparatur Minidry D61	Biometra, Göttingen
Geltrockenapparatur Dual Temperature SLAB Gel Dryer Modul SE 1125 B	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
HPLC System Gold 125P Solvent Module/168 detector	Beckman, Krefeld
InstantImager 2024	Perkin Elmer, Waltham MA (USA) (ehem. Canberra Packard, Schwadorf, Österreich)
Kontaminationsmonitor LB 122	Berthold GmbH & Co. KG, Bad Wildbad
Kontaminationsmonitor LB 145	Berthold GmbH & Co. KG, Bad Wildbad
Magnet-Heizrührer RETbasic	IKA Laborbedarf, Staufen
Peristaltikpumpe Pump P-1	GE Healthcare, München (ehem. Pharmacia)
pH-Meter MP220	Mettler Toledo, Greifensee (CH)
Plattenlesegerät (Universal Microplate Spectralphotometer)	MWG-Biotech, Ebersberg
Röntgenfilme Kodak® BioMax MR Film	Sigma-Aldrich, München
Spannungsquelle EV 243	Consort, Turnhout (B)
Speed-Vac-Konzentrator BA-VC-300H	H. Saur Laborbedarf, Reutlingen
Spektralphotometer DU640	Beckman, Krefeld
Spektropolarimeter Jasco J-600	JASCO GmbH, Groß-Umstadt
Thermocycler Tpersonal	Biometra, Göttingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermoschüttler Thermoshake	Gerhardt, Königswinter
Tischzentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad Sonorex Super RK106	Bandelin, Berlin
Ultraschallstab Sonifier B15	Branson, Danbury CT (USA)

Ultrazentrifuge Centrikon T-1055	KontronInstruments, Neufahrn
Vortexer REAX 2000	Heidolph, Schwabach
Waage TE 1502 S	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Zentrifuge Sorvall RC6 Plus	Thermo, Waltham MA (USA)

Tabelle 2-5: Computerprogramme

Programm	Bezugsquelle
Chimera	http://www.cgl.ucsf.edu/chimera
Expasy Proteomic Server	http://www.expasy.ch/
KC4	BioTek, Bad Friedrichshall
Mfold	http://mfold.bioinfo.rpi.edu/
MS Office	Microsoft GmbH (D), Unterschleißheim
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Origin 7.5	Originlab, Northampton MA (USA)
VectorNTI Suite7	InforMax, Bethesda MD (USA)

Tabelle 2-6: Kommerziell erhältliche Systeme (Kits)

Reagenziensatz	Bezugsquelle	Anwendung
GeneJET™ PCR Cloning Kit	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	Klonierung
peqGold Plasmid MidiprepKit I	peqlab, Erlangen	Plasmidpräparation
peqGold Plasmid MiniprepKit I	peqlab, Erlangen	Plasmidpräparation
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden	DNA-Elution aus Agarose, Aufreinigung von PCR-Produkten
Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit	USB Europe GmbH, Staufen	Sequenzierung von DNA

Tabelle 2-7: Enzyme und Proteine

Enzym / Protein	Hersteller
Antarctic Phosphatase (AP)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Chymotrypsin	Sigma-Aldrich, München
DNase I	GE Healthcare, München
Mung Bean Nuclease	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Pfu DNA-Polymerase	Promega GmbH, Mannheim
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Rinderserumalbumin (BSA)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
RNase A	New England Biolabs, Frankfurt am Main
RNase-free-DNase (DNase I)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
S1 Nuklease	Promega GmbH, Mannheim

Streptavidin	Iba, Göttingen
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
T4 Polynukleotidkinase (PNK)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Taq DNA-Polymerase	peqlab, Erlangen
Trypsin	Sigma-Aldrich, München

Tabelle 2-8: Längenstandards

Längenstandard	Bezugsquelle
10 bp Ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Peggold Protein Marker I	peqlab, Erlangen
Protein Molecular Weight Marker	Jena Bioscience, Jena
SmartLadder DNA Standard	Eurogentec, Köln

Tabelle 2-9: Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
α -His6-Antikörper aus Maus	Sigma-Aldrich, München
Kaninchen- α -Maus-alkalische Phosphatase Konjugat	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Suffolk (UK)

Tabelle 2-10: Oligodesoxynukleotide**Oligodesoxynukleotide zur Klonierung der Punkt- und Deletionsmutanten von ORF904**

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Klonierung von
K574A_for	GTACATCTTTAATGCGGCTATACTTCTCAC CGGTGCTGGGGCAAACGGG	pET28c_H6_ORF04_K574A
K574A_rev	CCCGTTTGCCCCAGCACCGGTGAGAAGTA TAGCCGCATTAAGATGTAC	
K656A_for	GGAAGACTACATAGAGGGACAGGCGAAGT TCAGGGATCCCATATAC	pET28c_H6_ORF04_K656A
K656A_rev	GTATATGGGATCCCTGAACTTCGCCTGTCC CTCTATGTAGTCTTCC	
K657A_for	GGAAGACTACATAGAGGGACAGAAGGCGT TCAGGGATCCCATATAC	pET28c_H6_ORF04_K657A
K657A_rev	GTATATGGGATCCCTGAACGCCTTCTGTCC CTCTATGTAGTCTTCC	
K656/57_for	GGAAGACTACATAGAGGGACAGGCGGCGT TCAGGGATCCCATATAC	pET28c_H6_ORF04_K656/57A
K656/57A_rev	GTATATGGGATCCCTGAACGCCGCTGTCC CCTCTATGTAGTCTTCC	
R659A_for	GGAAGACTACATAGAGGGACAGAAGAAGT TCGCGGATCCCATATAC	pET28c_H6_ORF04_R659A

R659A_rev	GTATATGGGATCCGCGAACTTCTTCTGTCC CTCTATGTAGTCTTCC	
R689A_for	GGATTCTGGGCAAGATGGATTGTGATAGAA TTCCCACACCAATTCC	
R689A_rev	GGAATTGGTGTGGGAATTCTATCACAATCC ATCTTGCCCAGAATCC	pET28c_H6_ORF04_R689A
R690A_for	GGATTCTGGAGAGCATGGATTGTGATAGAA TTCCCACACCAATTCC	
R690A_rev	GGAATTGGTGTGGGAATTCTATCACAATCC ATGCTCTCCAGAATCC	pET28c_H6_ORF04_R690A
R689/90A_for	GGATTCTGGGCAGCATGGATTGTGATAGA ATTCCCACACCAATTCC	
R689/90A_rev	GGAATTGGTGTGGGAATTCTATCACAATCC ATGCTGCCCAGAATCC	pET28c_H6_ORF04_R689/90A
N371_for	TATATACCATGGGCAAAAGGAAAGCACAAA AAGAC	pET28c_N371 pET28c_N371_H6 pET22b_N371_H6
T7_term	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	
N527_for	TATATACCATGGGCATAACAGTTGAAGATA TAGAG	
T7_term	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	pET28c_N527 pET28c_N527_H6
N475_for	GCCATGGGCTCACTTAGAATTGCGTTTCG	
T7_term	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	pET28c_N475_H6
N450_for	GCCATGGGTTCTGATAAATCACGTGTG	
T7_term	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	pET28c_N450_H6
D737_for	CCATGGACTTTGAGGATAGCAGTGCTAATG TC	
T7_term	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	pET28c_D737
D737_for	CCATGGACTTTGAGGATAGCAGTGCTAATG TC	
G844_rev	CTCGAGTTACCCCGTACTTATATTGTTATTC TTCAATC	pET28c_D737G844
K752_for	CCATGGGCAAAAACAGACAGTGTTCACGCA TTCGTG	
T7_term	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	pET28c_K752

80profor_f	AAACAGTATTAATAAAGCGTTAATCCTACCT-Fluo
80prorev	AGGTAGGATTAACGCTTTATTAATACTGTTT

Oligodesoxynukleotide für die Herstellung der *Stemloop*-Region

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
stem_for	CAAGTTTTCAATTTTTTAAATTGAATTTTTTC
stem_rev	GAAAACGCCATTACTATACAAATATTATC
ORF56_for (Kontrolle)	GGAATCCATATGGCCATGGGTAGACCATAC
ORF56_rev (Kontrolle)	CGGGATCCCTCGAGTTACTTCTTTTGTTCATC
stem100_rev	TGTATCAAATAATAGAAAAAAGTTGG
stem55/100	TTGAGTCCTTCAAGTTTTCAATTTTTTAAATTGAATTTTTTCATC TGTAATGACCA
stem55_rev	TGGTCATTACAGATGAAAAATTCAATTTAAAAAATTGAAAAC TGAAGGACTCAA

Oligodesoxynukleotide, die als Einzel- und Doppelstrangsubstrat verwendet wurden

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
K574A_for	GTACATCTTTAATGCGGCTATACTTCTCACCGGTGCTGGGG CAAACGGG
K574A_rev	CCCGTTTGCCCCAGCACCGGTGAGAAGTATAGCCGCATTAA AGATGTAC

Tabelle 2-11: Bakterien- und Phagenstämme

Stamm	Genetische Marker	Referenz
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus (DE3)-RIL strain	<i>E. coli</i> B F ⁻ ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) dcm ⁺ Tet ^r gal λ(DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam ^r]	Stratagene, La Jolla CA (USA)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^q Z.M15 Tn10 (Tet^r)</i>]	Stratagene, La Jolla CA (USA)
R408	<i>helper phage</i>	Promega, Madison WI (USA)

Tabelle 2-12: Plasmide

Plasmid	Referenz
pBluescript II (SK+)	Stratagene, La Jolla CA (USA)
pET22b	Novagen, Darmstadt
pET28c	Novagen, Darmstadt
pGEM-T	Promega GmbH, Mannheim
pJET1.2/blunt	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
pMJ5	Prof. Dr. Hopfner, LMU München
pUC_pRN1	(Keeling <i>et al.</i> , 1996)

2.2 Puffer, Lösungen und Medien

Puffer und Medien wurden mit VE-Wasser (voll entsalzt; Hausanlage) angesetzt und autoklaviert. Komponenten, welche thermolabil waren, wurden mit Sterilfiltern der Porengröße 0,22 µm sterilfiltriert und nachträglich zugegeben. Die Einstellung des pH-Werts erfolgte mit dem pH-Meter (Mettler Toledo, Greifensee (CH)).

2.2.1 Bakteriennährmedien

2x YT-Medium

5 g/l NaCl
16 g/l Trypton
10 g/l Hefeextrakt
pH 7,0

LB-Medium

10 g/l NaCl
10 g/l Trypton
5 g/l Hefeextrakt
pH 7,0

Psi-Medium

5 g/l MgCl₂
20 g/l Trypton
5 g/l Hefeextrakt
pH 7,6 mit NaOH eingestellt

5x M9 Minimal Salts

33,9 g/l Na₂HPO₄
15 g/l KH₂PO₄
2,5 g/l NaCl
5 g/l NH₄Cl
sterilfiltriert

M9-Medium

200 ml/l 5x minimal Salts
20 ml/l 1 M Glucose (steril filtriert)
20 ml/l 1 M MgSO₄ (steril filtriert)
1 ml/l 1 M CaCl₂ (steril filtriert)
sterilfiltriert

Alle Medien wurden, soweit nicht anders angegeben, vor dem Gebrauch autoklaviert.

2.2.1.1 Medienzusätze

2.2.1.1.1 Agar

Die Herstellung von Festmedien erfolgte durch Zugabe von 1,2% (w/v) Agar zu den jeweiligen Medien. Im Anschluss daran wurden die Medien autoklaviert.

2.2.1.1.2 Antibiotika

Zur Herstellung einer Stammlösung mit der Konzentration 100 mg/ml wurde das Antibiotikum in 70%-igem Ethanol (Chloramphenicol) bzw. H₂O (Ampicillin, Kanamycin) gelöst, sterilfiltriert und bei -20°C gelagert. Die Zugabe des Antibiotikums erfolgte nach dem Abkühlen der autoklavierten Medien auf ca. 50°C. Die Medien wurden auf eine Ampicillin-Endkonzentration von 100 µg/ml, Chloramphenicol-Endkonzentration von 34 µg/ml und Kanamycin-Endkonzentration von 50 µg/ml eingestellt.

2.2.2 Puffer für die Herstellung chemisch kompetenter *E.coli*-Zellen

1x Tfb I

30 mM KOAc
50 mM MnCl₂
100 mM RbCl
10 mM CaCl₂
15% (v/v) Glycerin
pH 5,8 mit HAc eingestellt

1x Tfb II

10 mM NaMOPS
75 mM CaCl₂
10 mM RbCl
15% (v/v) Glycerin
pH 6,5 mit NaOH eingestellt

2.2.3 Lösung für die Gewinnung einzelsträngiger DNA aus Phagen

1x Präzipitationspuffer

20% (v/v) PEG8000
2,5 M NaCl

2.2.4 Puffer für die Phenol/Chloroformextraktion

1x TE-Puffer mit RNase A

10 mM Tris-Base
0,1 mM EDTA
10 µg/ml RNase A
pH 8,0 mit HCl eingestellt

2.2.5 Puffer für die Polymerasekettenreaktion (PCR)

1x PCR-Reaktionspuffer

20 mM Tris-Base
10 mM KCl
10 mM (NH₄)₂SO₄
2 mM MgSO₄
0,1% Triton X-100
0,1 mg/ml BSA
pH 8,8 mit HCl eingestellt

2.2.6 Puffer für enzymatische Reaktionen mit DNA

1x Ligase-Puffer

50 mM Tris-Base
 10 mM MgCl₂
 10 mM DTT
 1 mM ATP
 pH 7,5 mit HCl eingestellt

1x T4 PNK-Puffer

70 mM Tris-Base
 10 mM MgCl₂
 5 mM DTT
 pH 7,6 mit HCl eingestellt

1x AP-Puffer

50 mM Bis-Tris-Propan
 1 mM MgCl₂
 0,1 mM ZnCl₂
 pH 6,0 mit HCl eingestellt

2.2.7 Puffer für die Agarosegelelektrophorese

Agarosegel (0,7-2,0%)

0,7-2,0% Agarose (w/v) in 0,5 x TBE

DD (Denaturierender DNA)-Puffer

0,1% (w/v) Bromphenolblau
 0,1% (w/v) Xylencyanol
 80% (v/v) Formamid
 10 mM EDTA

ND (Nativer DNA)-Puffer

0,1% (w/v) Bromphenolblau
 0,1% (w/v) Xylencyanol
 75% (v/v) Glycerin
 0,1 mM EDTA

1x TBE (Tris/Borat/EDTA)

90 mM Tris-Base
 1 mM EDTA
 pH 8,3 mit H₃BO₃ eingestellt

2.2.8 Puffer für die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

2.2.8.1 Denaturierende PAGE

Denaturierendes PAA-Gel

6-10% (v/v) Acrylamid:Bisacrylamid (19:1)
 0,56% (v/v) 10% APS
 0,1% (v/v) TEMED
 0,83 M Urea
 1x TBE

2.2.8.2 Native PAGE

PAA-Gel (6-15%)

6-15% (v/v) Acrylamid:Bisacrylamid (29:1) in 0,5 x TBE

2.2.8.3 Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Schagger und von Jagow

Trenngel 9-17% (v/v) Acrylamid:Bisacrylamid (29:1) in 1x Gelpuffer und 15% Glycerin

Sammelgel 6% (v/v) Acrylamid:Bisacrylamid (29:1) in 1x Gelpuffer

1x SDS-Probenauftragspuffer

0,05 M Tris-Base

4% (w/v) SDS

12% (v/v) Glycerin

2% (v/v) 2-Mercaptoethanol

0,025% (v/v) Coomassie 250 G

pH 6,8 mit HCl eingestellt

1x Kathodenpuffer

0,1 M Tris

0,1 M Tricin

0,1% (w/v) SDS

pH 8,25 mit HCl eingestellt

1x Gelpuffer

1 M Tris-Base

0,1% SDS

pH 8,45 mit HCl eingestellt

Färbelösung

10% Essigsäure

30% Ethanol

0,2% Coomassie 250 G

Entfärbelösung

10% Essigsäure

30% Ethanol

1x Anodenpuffer

0,2 M Tris

pH 8,9 mit HCl eingestellt

2.2.9 Puffer für den Westernblot

1x PBS-T

138 mM NaCl

2,7 mM KCl

4,7 mM Na₂HPO₄

1,4 mM KH₂PO₄

0,02% Tween 20

pH 7,5

1x AP-Puffer

100 mM Tris-Base

100 mM NaCl

5 mM MgCl₂

pH 9,5 mit HCl eingestellt

1x Transferpuffer

25 mM Tris-Base

192 mM Glycin

pH 8,6 mit HCl eingestellt

1x Blocking-Puffer

5% (w/v) Milchpulver in 1x PBS-T

2.2.10 Puffer für die Chromatographie

2.2.10.1 Talon

1x Puffer A

25 mM Na-Phosphat

300 mM NaCl

2 M Urea

6 mM Imidazol

pH 5-9 mit H₃PO₄ bzw. NaOH eingestellt

1x Puffer B

25 mM Na-Phosphat

300 mM NaCl

2 M Urea

150 mM Imidazol

pH 5-9 mit H₃PO₄ bzw. NaOH eingestellt

2.2.10.2 EMD SO₃⁻/EMD DEAE/EMD TMAE**1x Puffer A**

25 mM Na-Phosphat
pH 5-9 mit H₃PO₄ bzw. NaOH eingestellt

1x Puffer B

25 mM Na-Phosphat
1 M NaCl
pH 5-9 mit H₃PO₄ bzw. NaOH eingestellt

2.2.10.3 Hydroxylapatit**1x Puffer A**

10 mM Na-Phosphat
pH 5-9 mit H₃PO₄ bzw. NaOH eingestellt

1x Puffer B

300 mM Na-Phosphat
pH 5-9 mit H₃PO₄ bzw. NaOH eingestellt

2.2.10.4 EMD Propyl**1x Puffer A**

20 mM Na-Phosphat
4,1 M NH₄SO₄
pH 5-9 mit H₃PO₄ bzw. NaOH eingestellt

1x Puffer B

H₂O

2.2.10.5 Gelfiltration (TSK-gel G3000SW)**1x Puffer A**

25 mM K-Phosphat
150 mM KCl
pH 7,0

GF6-Standard

0,1 mg/ml Thyreoglobulin (670 kDa)
0,1 mg/ml Amylase (200 kDa)
0,1 mg/ml Ovalbumin (43 kDa)
0,1 mg/ml Ribonuklease (13,7 kDa)
0,1 mg/ml Aprotinin (6,5 kDa)
0,01 mg/ml PABA

2.2.11 Puffer für die Dialyse von Proteinen**1x Dialysepuffer 1**

25 mM Na-Phosphat
100 mM NaCl
40% (v/v) Glycerin
0,01% (v/v) 2-Mercaptoethanol
pH 7,0

1x Dialysepuffer 2

25 mM Na-Phosphat
100 mM NaCl
pH 7,0

2.2.12 Puffer für die Untersuchung der Proteinaktivitäten

2.2.12.1 ATPase-, Translokations- und Entwindungsaktivität

1x Reaktionspuffer

25 mM Tris-Base
 1 mM DTT
 10 mM MgCl₂
 pH 7,5 mit HCl eingestellt

2.2.12.2 Triple-Helix-Entwindung

1x Triple-Helix-Stoppuffer

75% (w/v) Glucose
 15% (w/v) SDS
 250 mM MOPS
 2 mg/ml Bromphenolbla
 1 mg/ml Proteinase K

5x Triple-Helix-Laufpuffer

200 mM Tris-Base
 25 mM NaOAc
 5 mM MgCl₂
 pH 5,5 mit HAc eingestellt

5x MM-Puffer

125 mM MES
 50 mM MgCl₂
 pH 5,5

2.2.12.3 dsPlasmid-Entwindung

10x S1 Nukleasereaktionspuffer

500 mM NaAc
 2,8 M NaCl
 45 mM ZnSO₄
 pH 4,5

2.2.12.4 Fluoreszenzanisotropie

5x Fluoreszenzanisotropiepuffer

100 mM Tris-Base
 500 mM KCl
 50 mM MgCl₂
 0,05% Tween 20
 pH 7,5 mit HCl eingestellt

2.2.12.5 CD-Spektroskopie

1x PBS

138 mM NaCl
 2,7 mM KCl
 4,7 mM Na₂HPO₄
 1,4 mM KH₂PO₄

2.2.12.6 Limitierende Proteolyse

1x Proteolysepuffer

25 mM	Tris-Base
1 mM	DTT
10 mM	MgCl ₂
10 mM	CaCl ₂

pH 7,5 mit HCl eingestellt

2.2.12.7 Glyceringradientenzentrifugation

1x Puffer A

17% (v/v)	Glycerin
2 mM	MgCl ₂
1x	PBS-Puffer

1x Puffer B

34% (v/v)	Glycerin
2 mM	MgCl ₂
1x	PBS-Puffer
0,15% (v/v)	Glutaraldehyd

2.2.12.8 DNase-I-Nuklease-Footprint

10x DNase-I-Nukleasereaktionspuffer

100 mM	Tris-Base
25 mM	MgCl ₂
5 mM	CaCl ₂

pH 7,6 mit HCl eingestellt

2.2.12.9 KMnO₄-Footprint

10x Footprint-Stoppuffer

500 µg/ml	Proteinase K
100 mM	EDTA
10 %	SDS
10 mM	2-Mercaptoethanol

2.2.13 Größenstandards für die Gelelektrophorese

Bei Gelelektrophoresen wurde zur Größenbestimmung doppelsträngiger DNA-Fragmente sowie von Proteinen ein Molekulargewichtsstandard aufgetragen.

2.2.13.1 DNA-Standards

Eurogentec SmartLadder DNA Standard

Fragmentgrößen: 200/400/600/800/1000/1500/2000/2500/3000/4000/5000/6000/8000/10000 bp

Invitrogen 10 bp DNA Ladder

Fragmentgrößen: 10-330 bp in 10 bp Schritten

2.2.13.2 Proteinstandards

Fermentas PageRuler™ Prestained Protein Ladder

Markergrößen: 11/17/26/34/43/56/72/95/130/170 kDa

Fermentas PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus

Markergrößen: 11/17/28/36/55/72/95/130/250 kDa

Jena Bioscience Protein Molecular Weight Marker

Markergrößen: 14,0/18,4/28,5/37,6/66,2/97,4/116,0 kDa

Laborstandard

Markergrößen: 14,4/ 20/ 30/ 43/ 67/ 116/ 170/ 212

peqlab Peggold Protein Marker I

Markergrößen: 14,4/18,4/25,0/35,0/45,0/66,2/116,0 kDa

2.3 Methoden

Bei allen Konzentrationsangaben handelt es sich um die Endkonzentration im entsprechenden Ansatz.

2.3.1 Anzucht von Bakterien

Es wurden Volumina von 1 ml bis 4000 ml Medium (LB, 2x YT, Psi, M9) in Schikanekolben bzw. Glasfermentern mit *E. coli* XL1-Blue bzw. *E. coli* BL21-CodonPlus beimpft, welche von frischen Vereinzlungsplatten oder Übernachtskulturen (ÜNK) stammten. Die Bakterien wurden bei RT bzw. 37°C auf einem Rundschtüttler (160 rpm) bzw. in einem Glasfermenter bei ausreichender Luftzufuhr entweder bis zur gewünschten Zelldichte (OD_{600}) angezogen oder, falls es sich um ÜNK handelte, 12 bis 18 h inkubiert.

2.3.2 Herstellung kompetenter *E. coli* und Transformation

2.3.2.1 Rubidiumchloridmethode zur Herstellung kompetenter *E. coli*

Es wurden 100 ml Psi-Medium (37°C) mit entsprechendem Antibiotikum in einem Schikanekolben mit 1 ml einer ÜNK beimpft und auf einem Rundschtüttler (160 rpm) bei 37°C inkubiert. Nachdem die Kultur eine OD_{600} von 0,5 erreicht hatte, wurde die Kultur 15 min auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend für 5 min bei 4°C mit 5000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 40 ml (2/5 des Originalvolumens) kaltem Tfb I resuspendiert. Es folgte eine Inkubation von 15 min auf Eis. Im Anschluss daran wurde die Suspension für 5 min bei 4°C mit 5000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 4 ml (1/25 des Originalvolumens) kaltem Tfb II resuspendiert. Es folgte eine Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurden 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Aliquots wurden bei -70°C gelagert.

2.3.2.2 Transformation von *E. coli*

Kompetente *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut. 100 µl kompetente Bakterien wurden mit 50-100 ng der zu transformierenden DNA bzw. 15 µl Ligationsansatz gemischt. Nachdem der Ansatz 15 min auf Eis inkubiert wurde, erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45 s. Im Anschluss daran wurde der Ansatz weitere 2 min auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 1 ml LB-Medium (RT) 1 h bei 37°C unter Schütteln im Heizblock inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min mit 2000 g wurde der Transformationsansatz dekantiert, das Zellpellet im Rücklauf (ca. 100 µl) resuspendiert und auf LB-Selektivplatten (mit dem entsprechendem Antibiotikum) ausplattiert.

Auf diesen Platten wachsen spezifisch nur die Klone, welche das Plasmid aufgenommen haben.

2.3.3 Präparation und Nachweis von Nukleinsäuren

2.3.3.1 Schnellpräparation von Plasmid-DNA

Nach der Transformation von *E. coli* XL1-Blue mit dem gewünschten Plasmid, wurden jeweils 750 µl LB-Medium (mit dem entsprechenden Antibiotikum) mit jeweils einer Kolonie beimpft und über Nacht

(ü.N.) bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 500 µl der Kultur entnommen und mit 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) 1 min auf dem Vortexer gemischt. Zur Phasentrennung wurden die Proben dann für 5 min mit 13000 g zentrifugiert.

Die obere, wässrige Phase, welche die DNA enthält, wurde abgenommen und mit 500 µl Isopropanol gefällt. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 13000 g wurden die Pellets mit 200 µl 70%-igem (v/v) Ethanol zwei Mal gewaschen und anschließend getrocknet. Danach wurden sie in 20 µl TE-Puffer mit 10 µg/ml RNase A resuspendiert und mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten.

2.3.3.2 Mini- und Midipräparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde entweder mittels Mini- oder Midipräparation in Abhängigkeit von der gewünschten Ausbeute von Plasmid-DNA isoliert. Die Isolierung der niedermolekularen DNA erfolgte mittels alkalischer Lyse, bei welcher sowohl die chromosomale als auch die Plasmid-DNA sowie bakterielle Proteine aufgrund des stark alkalischen pH-Werts denaturiert werden. Nach der alkalischen Lyse erfolgte eine Neutralisierung der Reaktion mit saurem Puffer.

Die Plasmidmoleküle wurden mittels Zentrifugation gewonnen, da die bakteriellen Proteine, Membranen sowie die chromosomale DNA denaturiert vorlagen und abzentrifugiert wurden, während die Plasmidmoleküle gelöst im Überstand erhalten blieben. Die Plasmid-DNA wurde aus diesem dann mit Hilfe kommerzieller Silica-basierter Säulchen nach Anleitung des Herstellers (peqlab bzw. Qiagen) isoliert und aufgereinigt.

Während der Lyse war darauf zu achten, dass diese nicht zu lange gewählt wurde, weil einerseits die Gefahr bestand, dass ebenfalls chromosomale DNA geschert und freigesetzt und andererseits die Plasmid-DNA irreversibel denaturiert werden könnte.

2.3.3.3 Präparation einzelsträngiger Plasmid-DNA

Um einzelsträngige Plasmid-DNA zu gewinnen, wurde der pBluescript II (SK+) Vektor (Stratagene, La Jolla CA (USA)) verwendet. Die gewünschte DNA-Sequenz kann in die *multiple cloning site* dieses Vektors kloniert werden. Nach Infektion der *E. coli*-Kultur mit einem Helferphagen wird verpackte einzelsträngige DNA sekretiert. Zuerst wurden kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen mit dem gewünschten Plasmid transformiert. Anschließend wurden 100 ml LB-Medium mit einem entsprechendem Klon sowie 10^8 pfu/ml (MOI \approx 10) des Helferphagen R408 (Promega, Madison WI (USA)) angeimpft. Daraufhin erfolgte eine ca. 20-stündige Inkubation bei 37°C, bis die Kultur die stationäre Phase erreicht hatte. Im Anschluss wurden die Zellen durch Zentrifugation für 20 min bei 4°C mit 4000 g abgetrennt und die einzelsträngige pBluescript-DNA aus dem Überstand mittels Präzipitationspuffer (1/6,5 des Originalvolumens) gewonnen.

Zur Erhöhung der Ausbeute erfolgte die Fällung der DNA über Nacht bei 4°C. Danach wurde die DNA für 20 min bei 21500 g zentrifugiert und in 0,3 M NaOAc, pH 6.0 gelöst. Abschließend erfolgte eine Phenol/Chloroformextraktion und eine Ethanol-fällung, um vorhandene Verunreinigungen zu entfernen. Danach konnte die DNA in 500 µl TE-Puffer gelöst und verwendet werden.

2.3.3.4 Phenol/Chloroformextraktion

Die Nukleinsäurelösung wurde im ersten Schritt mit 1 Volumen Phenol (pH 8,0) und im zweiten Schritt mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (25:1, v/v) versetzt. Nach jedem der Schritte wurde der Ansatz für 1 min gevortext und für 10 min bei 4°C mit 15000 g zentrifugiert, um die Phasentrennung der wässrigen und organischen Phase zu beschleunigen. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgezogen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

Der Phenol-Chloroformextraktion schloss sich eine Ethanolpräzipitation an. Das Nukleinsäuresediment wurde im gewünschten Volumen VE-Wasser resuspendiert.

2.3.3.5 Ethanolpräzipitation

Zur Präzipitation der DNA wurde der Ansatz mit 1/10 Volumen 3 M NaAc versetzt, da Nukleinsäuren in Gegenwart monovalenter Kationen in Ethanol einen unlöslichen Niederschlag bilden, welcher abzentrifugiert werden kann. Zur wässrigen Nukleinsäurelösung wurde das 2,5- bis 3-fache Volumen Ethanol (99,8 Vol-% p.a.) zugegeben. Der Ansatz wurde für mindestens 1 h bzw. über Nacht bei -20°C oder in flüssigem Stickstoff für 10 min inkubiert. Die Präzipitation der Nukleinsäuren erfolgte durch anschließende Zentrifugation für 25 min bei 4°C mit 13000 rpm. Zur Beseitigung mitgefällter Salze wurde das Sediment mit 70%-igem Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in VE-Wasser aufgenommen.

2.3.3.6 Bestimmung der Konzentration von DNA

Die Konzentration c der DNA wurde spektrophotometrisch bestimmt. Dazu wurde die DNA entsprechend verdünnt. Mit einem Beckman DU640-Spektrophotometer wurde die UV-Absorption bei 260 und 280 nm gemessen. Die Messung erfolgte in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm. Als Referenz diente der entsprechende Puffer. Die Konzentration wurde aus der OD_{260} nach folgenden Formeln für einzelsträngige (Gleichung 2-1) und doppelsträngige (Gleichung 2-2) DNA berechnet:

$$c [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 33 \mu\text{g/ml} \quad \text{Gleichung 2-1}$$

$$c [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \mu\text{g/ml} \quad \text{Gleichung 2-2}$$

Zusätzlich wurde das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} berechnet, welches idealerweise einen Wert von 2,0 annehmen sollte.

2.3.4 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.3.4.1 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Die PCR wurde im Jahr 1986 von dem Kalifornier Kary B. Mullis entwickelt (Mullis *et al.*, 1986). Die PCR ist ein Verfahren, bei welchem Nukleinsäureabschnitte exponentiell bzw. linear amplifiziert, aber auch mutagenisiert werden können. Bei diesem Verfahren wurde eine dreistufige, zyklische Reaktion angewandt, die in folgende Schritte unterteilt ist: Denaturierung, Oligodesoxynukleotidanlagerung und Verlängerung.

Für die PCR wurden eine Ausgangs-DNA (Matrize), Oligodesoxynukleotide, Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphate (dNTPs), Puffer und zumindest eine thermostabile DNA-Polymerase benötigt. Bei den

durchgeführten PCR-Reaktionen wurde unter anderem ein Gemisch aus *Taq* und *Pfu* DNA-Polymerase (25 U:1 U) verwendet, da die 3'-5' Exonucleaseaktivität der *Pfu* Polymerase zu einer verminderten Fehleranzahl gegenüber der *Taq* Polymerase alleine führt.

10 µl PCR-Reaktionsansatz:

ca. 2 ng	Matrizen-DNA
1 µM	Vorwärts-Oligodesoxynukleotid
1 µM	Rückwärts-Oligodesoxynukleotid
0.6 U	Thermostabile DNA-Polymerasen
1x	Polymerasepuffer
200 µM	dNTPs

Die Reaktionen im Thermocycler wurden nach folgendem Temperatur-Zeit-Profil durchgeführt:

Bedingungen:

Denaturierung	95°C	30 s	} 30 Zyklen
Anlagerung	40-60°C	30 s	
Verlängerung	72°C	30 s	
Abschließende Verlängerung	72°C	2,5 min	

Die Anlagerungstemperatur sollte 5°C unter der Schmelztemperatur (T_m) desjenigen Oligodesoxynukleotids liegen, welches die geringere T_m besitzt. Die T_m eines Oligodesoxynukleotids lässt sich nach folgender Gleichung abschätzen:

$$T_m = 4 \cdot (\text{Anzahl G bzw. C}) + 2 \cdot (\text{Anzahl A bzw. T})$$

Gleichung 2-3

Bei G, C, A sowie T handelt es sich um die entsprechenden Nukleotide.

Alle mit PCR generierten DNA-Fragmente wurden durch die Firma MWG (Ebersberg) mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

2.3.4.2 Verwendung von Klonierungsvektoren

2.3.4.2.1 pGEMT

Der lineare Klonierungsvektor pGEM-T (Promega GmbH, Mannheim) besitzt an beiden Enden einen einfachen T-Überhang. Da durch die PCR-Reaktion mit *Taq* und *Pfu* Polymerase PCR-Fragmente mit A-Überhängen resultieren, können diese mit dem Klonierungsvektor direkt ligiert werden. Es wurde dabei nach den Vorschriften des Herstellers verfahren. Allerdings wurde nur 1/5 der angegebenen Plasmidmenge (10 ng) eingesetzt.

Die Plasmide wurden durch die Firma MWG (Ebersberg) mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft und dann für die weitere Klonierung verwendet.

2.3.4.2.2 pJET1.2/blunt

Nach der PCR-Reaktion mit der *Pfu* Polymerase wurden die PCR-Fragmente mit dem *Blunting Enzyme* (GeneJET™ PCR Kit, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) behandelt und anschließend mit dem linearen Klonierungsvektor pJET1.2/blunt, welcher ebenfalls glatte Enden besitzt, mittels T4 Ligase ligiert. Es wurde dabei nach den Vorschriften des Herstellers verfahren.

Auch hier wurden die Plasmide durch die Firma MWG (Ebersberg) mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft und dann für die weitere Klonierung verwendet.

2.3.4.3 Quickchange-Mutagenese

Die *Quickchange*-Mutagenese wurde nach Vorgabe des Herstellers Stratagene (La Jolla, USA) durchgeführt. Um spezifische Mutationen in das Gen von ORF904 einzuführen, wurden 2 komplementäre Primer eingesetzt, welche beide die gewünschte Modifikation der Sequenz enthielten (siehe 2.1, Tabelle 2-10). Zur Verlängerung der Primer wurde *Pfu* Polymerase in PCR-Reaktionspuffer mit ca. 25 ng Matrizen-DNA eingesetzt. Es wurden 16 Zyklen durchgeführt, was zusammen mit der Verwendung der *Pfu* Polymerase zu einer Verringerung von Fehlern bei der PCR führte. Anschließend wurde die Matrizen-DNA mittels *DpnI* verdaut, welches seine Erkennungssequenz GATC nur schneidet, wenn das Adenosin methyliert vorliegt. Die verbleibende neu synthetisierte DNA wurde in *E. coli* XL1Blue transformiert, anschließend präpariert und sequenziert.

2.3.4.4 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die Sequenzierung von DNA wurde von MWG (Ebersberg) nach der Didesoxykettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Bei dem hier angewandten PCR-Verfahren, der zyklischen Sequenzierung, werden die Nucleinsäuren nicht exponentiell, sondern linear amplifiziert, da nur ein Oligodesoxynucleotid zur Komplementierung des DNA-Stranges eingesetzt wird.

Dieses PCR-Verfahren wird verwendet, um die Sequenz eines PCR-Produktes direkt analysieren zu können. Die Sequenzierung erfolgt während des Amplifikationsschritts und wird durch fluoreszenzmarkierte 2',3'-Didesoxynucleotide (ddNTPs) terminiert. Bei den ddNTPs handelt es sich um Nucleotidanaloga, die zwar von der DNA-Polymerase akzeptiert und in den Strang eingebaut werden, aber keine 3'-Hydroxylgruppe besitzen, was zum Strangabbruch führt.

Hierzu wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 0,6 µg der zu sequenzierenden DNA mit 15 pmol Sequenzierprimer in einem Gesamtvolumen von 15 µl an das Sequenzierlabor verschickt.

2.3.5 Enzymatische Reaktionen mit DNA

2.3.5.1 Restriktionsanalysen

Restriktionsanalysen von DNA-Molekülen wurden mit Restriktionsendonukleasen (NEB, Frankfurt am Main) durchgeführt. Diese sind bakteriellen Ursprungs und spalten die Phosphodiesterbindungen an den Erkennungsstellen der doppelsträngigen Nucleinsäuren hydrolytisch.

Restriktionsenzyme wurden eingesetzt, um DNA-Fragmente für Klonierungen zu isolieren und um die gespaltenen DNA-Moleküle mit Hilfe elektrophoretischer Auftrennung charakterisieren zu können.

Definition von Unit (U):

1 U Enzym entspricht der Menge eines Restriktionsenzym, mit welcher 1 µg Referenz-DNA in 1 h vollständig gespalten wird.

Der für die Restriktion verwendete Reaktionsansatz enthielt die entsprechenden Restriktionsendonukleasen, die zu spaltende Nukleinsäure, 1x NEB-Puffer und wenn nötig BSA (*Bovine Serum Albumin*). Nach der Restriktion wurden die Enzyme, wenn möglich, für 20 min bei 65°C hitzeinaktiviert und die DNA anschließend aufgereinigt.

Ein analytischer Restriktionsansatz (8µl) setzte sich wie folgt zusammen:

0,4 µg DNA, 2 U Restriktionsenzym, 1x BSA (falls nötig), 1x NEB-Puffer (enzymspezifisch) und H₂O.

Ein präparativer Restriktionsansatz (50 µl) setzte sich wie folgt zusammen:

3 µg DNA, 7 U Restriktionsenzym, 1x BSA (falls nötig), 1x NEB-Puffer (enzymspezifisch) und H₂O.

2.3.5.2 Enzymatische Phosphorylierung

Um DNA zu phosphorylieren, wurde mittels der T4 Polynukleotidkinase das γ-Phosphat von ATP auf das 5'-Ende der DNA übertragen. Die für die Helikaseaktivitätsexperimente verwendeten Oligodesoxynukleotide wurden mit γ-[³²P]-ATP radioaktiv markiert. In einem 10 µl Ansatz wurden 1µM Oligodesoxynukleotide, 1x PNK-Puffer, 200 nM γ-[³²P]-ATP und 5 U T4 Polynukleotidkinase für 1,5 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die T4 Polynukleotidkinase für 20 min bei 65°C hitzeinaktiviert.

2.3.5.2.1 Hybridisierung

Die Hybridisierung komplementärer Oligodesoxynukleotide erfolgte im Heizblock. Ein äquimolares Gemisch der zu hybridisierenden Oligodesoxynukleotide wurde zunächst 5 min auf 95°C erhitzt, um alle Sekundärstrukturen zu lösen. Anschließend wurde der Heizblock ausgeschaltet, um die Probe langsam auf RT abkühlen zu lassen. Dies gewährleistete eine vollständige Hybridisierung der komplementären Oligodesoxynukleotide.

2.3.5.3 Enzymatische Dephosphorylierung

Der 5'-Terminus von DNA-Molekülen wurde mit der antarktischen Phosphatase (AP, New England Biolabs) dephosphoryliert. Dabei wurde nach Vorschrift des Herstellers verfahren. Nach der Dephosphorylierung wurde das Enzym für 15 min bei 60°C hitzeinaktiviert.

Vor dem Einsatz in Ligationen wurden Plasmide stets dephosphoryliert, um die Möglichkeit einer Rückligation zu verringern.

2.3.5.4 Ligation

Ligationen wurden mit der T4 DNA Ligase in 1x Ligasepuffer durchgeführt. Dabei erfolgt eine kovalente Verknüpfung zwischen Vektor-DNA und einzufügendem DNA-Fragment (Insert). Voraussetzung für die kovalente Verknüpfung sind kompatible Enden. Daher wurden in das Insert mittels PCR-Mutagenese die im Vektor enthaltenen Schnittstellen eingeführt, um kompatible Enden zu schaffen. Die Ligationsansätze wurden ü.N. bei 16°C inkubiert. Anschließend wurde *E. coli* XL1-Blue mit dem gesamten Ligationsansatz (15 µl) transformiert.

2.3.5.5 Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Standards

Zuerst wurde der 10bp-Standard (Invitrogen, Karlsruhe) dephosphoryliert. In einem 10 µl Ansatz wurden 5 µg Standard mit 1x AP-Puffer und 2,5 U Antarktischephosphatase für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Phosphatase für 15 min bei 60°C hitzeinaktiviert. Für die radioaktive Markierung wurden in einem 10 µl Ansatz 2 µl des dephosphorylierten Standards, 1x PNK-Puffer, 150 nM γ -[³²P]-ATP und 5 U T4 Polynukleotidkinase für 1,5 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 35 µl DD-Puffer (siehe 2.2.7) versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Auf einem Gel dienten dann 2-3 µl als Standard.

2.3.6 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese handelt es sich um eine Auftrennung von Nukleinsäuren oder Proteinen im elektrischen Feld innerhalb eines festen Trägermaterials. Bei diesem Trägermaterial kann es sich um Agarose oder Polyacrylamid handeln. Die Auftrennung der Nukleinsäuren und Proteine ermöglicht eine Konzentrations- und Größenbestimmung.

2.3.6.1 Agarosegelelektrophorese

Die Agarose wurde in 0,5x TBE (Tris/Borat/EDTA, pH 8,3) gelöst und in eine Gelgießapparatur (Technik, Universität Bayreuth) gegossen. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde ein Molekulargewichtsstandard (Eurogentec, Köln) mit den Proben aufgetragen. Als Elektrophoresepuffer wurden 0,5x TBE verwendet. Die angelegte Spannung lag zwischen 80 und 130 Volt. Zur Detektion der Nukleinsäuren erfolgte eine Färbung mit Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-Ethyl-6-Phenylphenanthridiniumbromid, EtBr). Die Gele wurden für ca. 10 min in Wasser mit 0,5 µg/ml EtBr gefärbt und anschließend in Wasser entfärbt, um den Kontrast zu verstärken.

Der Farbstoff EtBr interkaliert in die DNA und wird durch UV-Licht (254-366 nm) angeregt, wodurch die Nukleinsäuren sichtbar werden.

2.3.6.2 Denaturierende PAGE (PolyAcrylamidGelElektrophorese)

Zur Darstellung kurzer (2-200 bp), am 5'-Ende radioaktiv markierter DNA-Fragmente wurden Polyacrylamidgele (PAA-Gele), welche Harnstoff zur Denaturierung der DNA bzw. der DNA-Proteinkomplexe enthielten, verwendet.

Zur Herstellung der Gele wurde das Sequenziergelsystem von Roth (Karlsruhe) benutzt, welches zur Herstellung der Acrylamidlösungen in 1xTBE und 8,3 M Harnstoff diente. Es wurden 6%-ige Gele (0,3 mm Schichtdicke) horizontal zwischen zwei Glasplatten (33 x 40 cm) gegossen.

Der Lauf erfolgte in der Vertikalgellaufapparatur Modul S2 von Gibco. Nach der Polymerisation wurde eine Vorelektrophorese für 30 min bei 50 W durchgeführt.

Die Proben wurden mit 1/3 Volumen denaturierendem Auftragspuffer versetzt und 5 min bei 75°C erhitzt. Die Elektrophorese wurde für 1-2 h bei 50°C und mit 70 W in 1x TBE durchgeführt.

Zur Größenbestimmung diente ein mit ^{32}P am 5'-Ende markierter 10 bp Standard (Invitrogen, Karlsruhe).

Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 2 h bei 80°C mit Hilfe der Geltrockenapparatur Dual Temperature SLAB Gel Dryer (Bio-Rad, München) getrocknet und auf einem Röntgenfilm exponiert oder autoradiographisch im Instantmager analysiert. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Gerätesoftware.

2.3.6.3 Native PAGE

Mit nativen PAA-Gele lassen sich sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige DNA-Substrate darstellen. Für die Auftrennung kurzer (25-50 bp), am 5'-Ende radioaktiv markierter DNA-Substrate in einem Reaktionsansatz wurden 6-15%-ige PAA-Gele angefertigt. Hierzu wurde eine 40%-ige Acrylamid:Bisacrylamid (29:1)-Stammlösung (Roth, Karlsruhe) in 0,5x TBE verwendet. Die Gele (1,2 mm Schichtdicke) wurden zwischen einer Glasplatte und einer *notched silica* Platte horizontal in einer *mighty small* Apparatur (10 x 12 cm, Hoefer, Halliston MA (USA)) gegossen.

Der Lauf erfolgte in einer Vertikalgellaufapparatur (Technik, Universität Bayreuth). Nach der Polymerisation wurde eine Vorelektrophorese für 30 min bei 4°C und mit 10 W durchgeführt.

Die Proben wurden mit 1/3 Volumen des nativen Auftragspuffers versetzt und bis zur Beladung des Gels auf Eis gehalten. Die Elektrophorese wurde für 30 min bei 4°C und mit 10 W in 0,5x TBE durchgeführt. Zur Größenbestimmung dienten die entsprechenden mit ^{32}P am 5'-Ende markierten Oligodesoxynukleotide (Metabion, Planegg-Martinsried).

Nach der Elektrophorese wurden die Gele autoradiographisch im Instantmager analysiert. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Gerätesoftware.

2.3.6.4 Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Schagger und von Jagow

Die SDS-Gelelektrophorese nach Schagger und von Jagow (1987) dient der Analyse von Proteinen nach deren Aufreinigung und nach deren *Crosslinking*.

Die Auftrennung erfolgte mit Hilfe eines 6%-igen Sammelgels und 6-17%-igen Acrylamid/Bisacrylamid-Trenngelen (in Abhängigkeit von der erwarteten Proteingröße). Die Gele wurden in einer *mighty small* Apparatur (10 x 7,5 cm, Hoefer, Halliston MA (USA)) angefertigt.

Der Lauf erfolgte in einer Vertikalgellaufapparatur (Technik, Universität Bayreuth) für 45 min mit 15 W. Die Proben wurden mit 1 Volumen Probenauftragspuffer für 5 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurde das Gel mit den Proben beladen. Als Größenstandards dienten verschiedene Proteinmarker (2.2.13.2).

Die Gele wurden nach dem Lauf für 20 min in der Färbelösung angefärbt. Anschließend wurden sie in der Entfärbelösung unter mehrmaligem Austausch entfärbt, bis der Hintergrund fast farblos war. Zuletzt wurden sie mittels der Geltrockenapparatur *Minidry* D61 (Biometra, Göttingen) getrocknet.

2.3.7 Westernblot

Westernblots wurden durchgeführt, um das Vorhandensein von *Tags* an rekombinanten Proteinen nachzuweisen.

2.3.7.1 Transfer mittels *semi-dry blotting*

Proteine wurden mit verschiedenen *prestained* Markern (2.2.13.2) auf ein PAA-Gel aufgetragen und getrennt. Anschließend wurde auf das Gel eine mit Transferpuffer (siehe 2.2.9) getränkte Nitrozellulosemembran gelegt. Das Gel und die Membran (auf dem Gel) wurden zwischen je zwei mit Transferpuffer getränkten Filterpapieren angeordnet und auf einen Panther™ Semidry Electrobloetter HEP-1 (Thermo Scientific Owl Separation Systems, Rochester NY (USA)) aufgelegt. Das *Blotten* erfolgte bei 1-2 mA/cm² für mindestens 1,5 h.

2.3.7.2 Antikörperreaktion

Nach dem Transfer wurde die Membran aus der Apparatur entnommen und in 5%-igem (w/v) Milchpulver in 1x PBS-T inkubiert, um alle noch vorhandenen Proteinbindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Danach wurde die Membran dreimal für 10 min mit 1x PBS-T gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem α -His6-Antikörper aus Maus (1/3000 in PBS-T) für mindestens 2 h inkubiert. Nach der ersten Antikörperreaktion wurde die Membran dreimal für je 10 min mit PBS-T gewaschen.

Danach wurde die Membran mit dem Kaninchen- α -Maus-alkalischen Phosphatasekonjugat (1/3000 in PBS-T) für 1 h inkubiert. Nach der zweiten Antikörperreaktion wurde die Membran dreimal für je 10 min mit 1x PBS-T gewaschen. Anschließend wurde die Membran in 20 ml AP-Puffer transferiert.

Für die Farbreaktion wurden 100 μ l 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat (15 mg/ml in DMF) und Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (30 mg/ml in 70% (v/v) DMF) zugegeben. Unter Lichtausschluss wurde die Membran für mindestens 10 min inkubiert, bis deutliche Banden zu erkennen waren. Abschließend wurde die Farbreaktion durch Waschen mit H₂O gestoppt und die Membran bei RT getrocknet.

2.3.8 Expression von Proteinen

Für die Überexpression aller Proteine wurde der Stamm *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-Ril benutzt. Dieser Stamm wurde für die Expression heterologer Proteine entwickelt. Er enthält ein pACYC-basiertes, CoLE1-kompatibles Plasmid (pRARE, cam^r) welches tRNAs für folgende, in *E. coli* selten genutzte Codons kodiert: AUA (*ileY*), AGG, AGA (beide *argU*), CUA (*leuW*). Außerdem fehlen ihm die Lon und OmpT Proteasen, welche rekombinante Proteine lysieren könnten. Darüber hinaus ist er ein Lysogen des Phagen λ DE3 und enthält somit eine Kopie der T7 RNA-Polymerase unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors. Das ermöglicht eine Nutzung des pET-Systems (Studier & Moffatt, 1986) zur Überexpression von Proteinen nach Induktion mit IPTG.

2.3.8.1 Test auf Überexpression

Um die Überexpression der verschiedenen Proteine zu überprüfen, wurde *E. coli* CodonPlus(DE3)-Ril mit den entsprechenden Plasmiden transformiert. Anschließend wurden Kulturen von je 750 μ l angesetzt und bis zu einer OD₆₀₀ \approx 0,5 bei 37°C geschüttelt. Dann wurden 200 μ l der Kultur

abgenommen, mit 20 µl sterilem 80%-igem Glycerin versetzt und bei -70°C gelagert. Zu den restlichen 550 µl wurde 1 mM IPTG gegeben, um die Proteinexpression zu induzieren. Nach 4 h wurden 200 µl jeder Kultur für 1 min bei 4°C mit 15000 g abzentrifugiert und das Pellet in 20 µl H₂O resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch 10-minütige Inkubation bei 95°C und 10 min im Ultraschallbad (Sonorex Super RK 106, Bandelin). Daraufhin wurden die Proben mit 20 µl SDS-Probenauftragspuffer und 6 M Harnstoff versetzt und mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Als Kontrolle diente eine nicht induzierte Kultur, mit der ebenso verfahren wurde.

Die Überexpression ließ sich durch das Auftreten einer stärkeren Bande nach der Induktion auf Höhe des entsprechenden Molekulargewichts nachweisen. Die bei -70°C gelagerten Glycerinkulturen wurden als Ausgangskultur für die folgenden Fermentationen genutzt.

2.3.8.2 Fermentation und Aufschluss von Zellen

Die Fermentation der Zellen erfolgte für alle Proteinvarianten von ORF904 bei RT, da hier die Menge und die Qualität der exprimierten Proteine optimal waren. Die Fermentation erfolgte in 4 l LB-Medium, welches mit den notwendigen Antibiotika versetzt wurde. Zur Inokulation wurden 5 ml einer bei 37°C gewachsenen ÜNK verwendet. Nach ca. 8 h bei einer OD₆₀₀ ≈ 0,5 wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG die Proteinexpression induziert. Nach ca. 26 h bei RT wurden die Zellen durch Zentrifugation für 8 min bei 4°C mit 8000 g geerntet und bei -20°C gelagert.

Für die weitere Aufreinigung wurden die Zellen in 40 ml EMD-SO₃⁻-Puffer A aufgetaut und resuspendiert. Um einen möglichen proteolytischen Abbau des Proteins zu verhindern, wurde ½ Tablette Complete EDTA-free Protease Inhibitor Mix (Roche, Mannheim) zugesetzt und alle folgenden Schritte bei 4 °C durchgeführt.

Die Zellen wurden mittels Ultraschallstab (Sonifier B15, Branson) für 5 min bei Ultraschallstufe 4,5 mit 50% Leistung (*pulsed*) aufgeschlossen. Anschließend wurde der Zellaufschluss für 20 min bei 4°C mit 20000 g abzentrifugiert. Das Protein befand sich dann im Überstand.

2.3.9 Aufreinigung und Nachweis von Proteinen

2.3.9.1 Analytische Chromatographie

Um zu untersuchen, welches Säulenmaterial (Fractogel EMD SO₃, Fractogel EMD DEAE, Fractogel EMD TMAE, Fractogel EMD Propyl, Hydroxylapatit) für die Aufreinigung nach der Talonsäule am besten geeignet ist, wurden Mobicols mit 500 µl Säulenmaterial gepackt und mit 5 ml Puffer A äquilibriert. Anschließend wurden 500 µl der Peakfraktion nach der Talonaufreinigung 1:1 in H₂O verdünnt (bzw. 1:3 in 4,1 M (NH₄)₂SO₄-Lsg. für EMD Propyl) und mit einer Flussrate von ca. 1 ml/min auf die Säule aufgetragen.

Der Durchbruch wurde als Fraktion D (Durchbruch) aufgefangen. Danach wurde die Säule mit 1,5 ml Puffer A (2.2.10) gewaschen und der Durchfluss als Fraktion W (Waschschritt) gesammelt. Das Protein wurde zweimal mit 200 µl Puffer B (2.2.10) von der Säule eluiert und die Fraktionen als E1 bzw. E2 (Eluat 1 bzw. Eluat 2) gesammelt. Sämtliche Fraktionen wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und analysiert.

2.3.9.2 Affinitätschromatographie (Talon)

His-getaggte Varianten von ORF904 wurden in *E. coli* CodonPlus(DE3)-Ril exprimiert und mittels IMAC (*Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*) über eine Talonsäule aufgereinigt.

Der Rohextrakt wurde auf 450 mM NaCl, 6,25 mM Imidazol, 3 M Harnstoff und pH 7,0 eingestellt. Anschließend wurde für 20 min bei 4°C mit 20000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe eines Filters (0,22 µm) filtriert und auf eine mit Talon-Puffer A äquilibrierte Talontropfsäule (4 ml Säulenvolumen) mit einer Flussgeschwindigkeit von 1ml/min aufgetragen. Mit Hilfe eines Durchflussspektrometers (LKB 2238 Uvicord SII, Pharmacia) wurde die Absorption der aufgetragenen Probe bei 280 nm gemessen und aufgezeichnet.

Der Durchbruch wurde als Fraktion D (Durchbruch) gesammelt. Danach wurde die Säule mit ca. 5-10 Säulenvolumen Puffer A gewaschen, wobei der hier resultierende Durchfluss als Fraktion W (Waschschritt) gesammelt wurde. Die Elution erfolgte mit Talon-Puffer B. Es wurden 4 ml Fraktionen gesammelt. Sämtliche Fraktionen wurden auf einem Proteingel analysiert.

2.3.9.3 FPLC-gestützte Kationenaustauschchromatographie

Alle Varianten von ORF904 wurden nach der Affinitätschromatographie mittels EMD SO_3^- Kationenaustauschchromatographie gereinigt und aufkonzentriert. Dabei wurde der pH-Wert der Puffer für jede Proteinvariante auf 1 pH-Einheit unter dem theoretisch ermittelten pI (bestimmt mit VectorNTI) eingestellt, um die Bindung des Proteins an die Säulenmatrix aufgrund seiner positiven Ladung zu gewährleisten. Die Chromatographie wurde an einem FPLC-Gerät (Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Die proteinhaltigen Fraktionen nach der Talonsäule wurden vereinigt und mit H_2O 1:1 verdünnt. Die EMD SO_3^- Säule (Merck, Darmstadt) wurde mit 10% Puffer B äquilibriert. Das Protein wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min auf die Säule geladen. Mit Hilfe eines Durchflussspektrometers (LKB 2238 Uvicord SII, Pharmacia) wurde die Absorption der aufgetragenen Probe bei 280 nm gemessen und aufgezeichnet.

Der Durchbruch wurde als Fraktion D (Durchbruch) gesammelt. Anschließend wurde die Säule mit 5 Säulenvolumen Auftragspuffer gewaschen und der resultierende Durchfluss als Fraktion W (Waschschritt) gesammelt. Die Elution der Varianten von ORF904 erfolgte über einen Gradienten von 100 bis 1000 mM NaCl mit einer Flussgeschwindigkeit von 1ml/min. Es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt. Sämtliche Fraktionen wurden auf einem Proteingel analysiert.

2.3.9.4 Dialyse von Proteinen

Zur längeren Aufbewahrung wurden die Proteine nach der Aufreinigung gegen den Dialysepuffer dialysiert. Hierzu wurden Dialysemembranen mit einem MWCO (*Molecular Weight Cut Off*) von 6 bzw. 12 kDa verwendet. Danach wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt.

2.3.9.5 Ultrafiltration zur Konzentrierung von Proteinen

Zur Ultrafiltration der aufgereinigten und vereinigten proteinhaltigen Fraktionen wurden Ultrafiltrationssäulen (Vivaspin 500, Sartorius Stedim Biotech) mit einem MWCO von 3 bzw. 10 kDa verwendet. Dabei wurde nach Angabe des Herstellers verfahren.

2.3.9.6 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentrationen aller Proteine wurden spektrophotometrisch bestimmt. Dazu wurden die Proteinproben entsprechend verdünnt. Mit einem Beckman DU640-Spektrophotometer wurde das UV-Absorptionsspektrum von 220 bis 320 nm aufgenommen. Die Messung erfolgte in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm. Als Referenz diente der entsprechende Puffer.

Anhand des Lambert-Beerschen Gesetzes konnte die Proteinkonzentration berechnet werden. Die notwendigen molaren Extinktionskoeffizienten wurden für jedes Protein mit dem Programm VectorNTI ermittelt.

Da die Mehrheit der untersuchten Proteine mit DNA interagieren kann, wurde außerdem das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} bestimmt. Wenn dieses unterhalb von 0,6 lag, wurden die Proteine ohne weitere Aufreinigung verwendet.

2.3.9.7 Bradford-Test mittels Plattenlesegerät

Zum *Screening* der Proteinkonzentration in einer größeren Anzahl von Proben, z.B. Fraktionen einer Ultrazentrifugation, wurde die kolorimetrische Proteinbestimmung nach Bradford (Neuwald *et al.*, 1999) im Mikrotiterplattenformat eingesetzt.

Die Proben wurden mittels VIS-Spektroskopie auf einem Plattenlesegerät Universal Microplate Spectralphotometer (MWG-Biotech, Ebersberg) quantifiziert. Als *Blank* diente der Puffer, in dem die Proteinproben verdünnt wurden (in der Regel 1x PBS-Puffer). Als Referenz wurden BSA-Lösungen definierter Konzentration (0, 2, 5, 10, 15, 30, 50 ng/μl) verwendet. Es wurden zu jeweils 50 μl Standard bzw. Probe je 150 μl Roti[®]Nanoquant (Roth, Karlsruhe) in eine UV-Star Platte, 96 Well (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) pipettiert. Die Absorption der Proben wurde bei 590 nm und 450 nm gemessen.

Aus den ermittelten Absorptionswerten der Referenzlösungen wurde der Quotient aus A_{590} und A_{450} gebildet, der zur Erstellung einer Eichgeraden diente. Die Kalkulation der Proteinmenge in den Proben erfolgte mittels der geräteeigenen Software KC4 (Bio Tek Instruments, Neufahrn).

2.3.9.8 HPLC-gestützte Gelfiltration

Um das Vorhandensein des Dimers von K752G844 zu überprüfen, wurde das aufgereinigte Protein mittels Gelfiltration analysiert. Hierzu wurden 10 μg des Proteins in 100 μl Puffer A auf eine Bio-Sil TSK250 G3000SW Säule (~26,5 ml Gesamtvolumen) aufgetragen. Die Chromatographie wurde an einem HPLC System Gold (Beckman, Krefeld) mit einer Flussrate von 0,5 ml/min aufgezeichnet. Zur Größenbestimmung wurde der GF6-Standard (2.2.10.5) verwendet.

2.3.10 Untersuchung der Proteinaktivität

2.3.10.1 ATPase-Aktivität

Um die enzymatische ATP-Hydrolyse durch ORF904 und seine Mutanten zu untersuchen, wurden in einem 10 µl Reaktionsansatz 1x Reaktionspuffer, 0,2 mM ATP, 2,0 nM [γ - ^{32}P] ATP (3000 Ci/mmol) und 0,5 µM Protein für 20 min bei 80°C inkubiert. Um die Induzierbarkeit der ATPase-Aktivität durch DNA zu untersuchen, waren im Reaktionsansatz zusätzlich noch 0,001-0,04 g/l ss- bzw. dsPlasmid-DNA (pBLue_pRN1) oder Oligodesoxynukleotid-DNA (49 bp) enthalten. Danach wurden 2 µl des Reaktionsansatzes auf eine PEI Cellulose Dünnschichtchromatographieplatte (Machery Nagel GmbH & Co. KG, Düren) aufgetragen. Die Trennung von $^{32}\text{P}_i$ und γ - ^{32}P -ATP erfolgte für ca. 20 min mit 0,8 M LiCl in 1 M Formiat. Anschließend wurden die DC-Platten autoradiographisch im InstantImager analysiert. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Gerätesoftware.

2.3.10.1.1 Bestimmung von K_M und k_{cat}

Um die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) und die Wechselzahl (k_{cat}) der Reaktion für ATP im ATPase-Aktivitätsexperiment zu bestimmen, wurde bei konstanter DNA-Konzentration (1,2 µM) die ATP-Konzentration im Bereich von 0 bis 2 mM variiert.

Die apparente Michaelis-Menten-Konstante für das DNA-Substrat (49 bp) wurde bestimmt, indem bei konstanter ATP-Konzentration (0,16 mM) die DNA-Konzentration im Bereich von 0 bis 125 nM variiert wurde. Die Durchführung des Experiments erfolgte wie oben beschrieben. Anschließend konnte mit Hilfe der Gerätesoftware des InstantImagers das Verhältnis von freiem $^{32}\text{P}_i$ zu γ - ^{32}P -ATP bestimmt werden, woraus die Geschwindigkeit der ATPase-Reaktion berechnet wurde. Für jeden Parameter der ATPase-Reaktion wurde die Bestimmung dreimal vorgenommen.

K_M und k_{cat} wurden mit Hilfe von Origin (OriginLab, Northampton, USA) berechnet, indem die Werte mittels nichtlinearer Regression an die Michaelis-Menten-Gleichung angepasst wurden.

2.3.10.2 Translokationsaktivität

Um die Translokation von ORF904 und seinen Mutanten auf ss- bzw. dsDNA zu untersuchen, wurden biotinylierte Oligodesoxynukleotide am 5'-Ende mit γ - ^{32}P -ATP und T4 Polynukleotidkinase radioaktiv markiert. Die Sequenzen der als Substrate verwendeten Oligodesoxynukleotide sind in Tabelle 2-10 aufgeführt. Die Hybridisierung von Oligodesoxynukleotiden zu doppelsträngigen Substraten erfolgte wie unter 2.3.5.2.1 beschrieben.

Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 10 µl durchgeführt. 10 nM des ss- bzw. dsSubstrats wurden mit 180 nM Streptavidin (Tetramer) in 1x Reaktionspuffer für 30 min bei 50°C inkubiert. Dies sollte sicherstellen, dass an das gesamte DNA-Substrat Streptavidin gebunden war. Anschließend wurden 6,5 µM freies Biotin, 0,5 µM Protein und 2 mM ATP zugegeben. Es folgte eine weitere Inkubation für 30 min bei 50°C. Danach wurden zu jedem Ansatz 3 µl ND-Puffer gegeben. Die Proben wurden dann auf ein 8%-iges natives PAA-Gel in 0,5x TBE aufgetragen.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele autoradiographisch im InstantImager analysiert. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Gerätesoftware.

2.3.10.2.1 Bestimmung der Translokationsgeschwindigkeit

Um die Translokationsgeschwindigkeit zu bestimmen, wurden mit dem am 5'-Ende biotinylierten Substrat mindestens drei Kinetiken gemessen. Hierzu wurden die Ansätze wie unter 2.3.10.2 beschrieben vorbereitet und anschließend für 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25 und 30 min bei 50°C in Gegenwart bzw. Abwesenheit von ATP inkubiert, um den zeitlichen Verlauf der Reaktion zu dokumentieren. Die Proben wurden auf Eis inkubiert, bis sie auf das PAA-Gel aufgetragen wurden.

Nach dem Gellauf konnte mit Hilfe der Gerätesoftware des InstantImagers das Verhältnis von radioaktiv markiertem Oligodesoxynukleotid, an das Streptavidin gebunden war, zu radioaktiv markiertem Oligodesoxynukleotid, an das kein Streptavidin gebunden war, bestimmt werden.

Im Graphen wurde der Prozentsatz an freiem Oligodesoxynukleotid gegen die Zeit aufgetragen. Die Translokation (in Prozent min^{-1}) wurde mit Hilfe von Origin (OriginLab, Northampton, USA) durch lineare Regression im linearen Bereich des Graphen ermittelt. Die ermittelten Werte wurden bezüglich der Hintergrundaktivität korrigiert.

Die Nettotranslokation ergibt sich aus der Differenz der ermittelten Werte für die Translokation mit und ohne ATP, stellt also die ATP-abhängige Translokation dar. Unter Berücksichtigung der Protein- und DNA-Substratkonzentrationen sowie der Länge des DNA-Substrats kann aus der Nettotranslokation die Translokationsgeschwindigkeit berechnet werden (siehe Gleichung 2-4).

$$V = \frac{[T] \cdot [S] \cdot [L]}{100 \cdot 60 \cdot [P]} \quad \text{Gleichung 2-4}$$

V=Translokationsgeschwindigkeit (in Basen s^{-1}); [T]= Translokation (in Prozent min^{-1}); [S]= DNA-Substratkonzentration (in nM); [P]= Proteinkonzentration (in nM); [L]= Länge des DNA-Substrats (in Basen)

2.3.10.3 Entwindungsaktivität

Das Potential von ORF904 und seinen Mutanten unterschiedliche DNA Substrate zu entwinden, wurde anhand von Helikasesubstraten analysiert. Hierbei erfolgte die radioaktive Markierung und Hybridisierung der verwendeten Oligodesoxynukleotide analog zur Bestimmung der Translokationsaktivität. Die Sequenzen der als Substrate verwendeten Oligodesoxynukleotide sind in Tabelle 2-10 aufgeführt. Ein 10 μl Reaktionsansatz enthielt 1x Helikasereaktionspuffer, 2 mM ATP, 10 nM ^{32}P -markiertes Substrat, 0,5 μM Protein und 100 nM unmarkiertes Oligodesoxynukleotid, um eine Rehybridisierung des verdrängten und radioaktiv markierten DNA-Strangs zu verhindern. Die Reaktionsansätze wurden für 30 min bei 60°C inkubiert und nach Zugabe von 3 μl nativem Auftragspuffer unverzüglich auf ein 8%-iges natives PAA-Gel in 0,5x TBE aufgetragen.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele autoradiographisch im InstantImager analysiert. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Gerätesoftware.

2.3.10.3.1 Bestimmung der Entwindungsgeschwindigkeit für die Helikasesubstrate

Um die Entwindungsgeschwindigkeit zu bestimmen, wurden mit jedem Substrat mindestens drei Kinetiken gemessen. Hierzu wurden die Ansätze wie unter 2.3.10.3 beschrieben vorbereitet und anschließend für 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25 und 30 min bei 60°C in Gegenwart bzw. Abwesenheit von ATP

inkubiert, um den zeitlichen Verlauf der Reaktion zu dokumentieren. Die Proben wurden auf Eis inkubiert, bis sie auf das PAA-Gel aufgetragen wurden.

Nach dem Gellauf konnte mit Hilfe der Gerätesoftware des InstantImagers das Verhältnis von radioaktiv markiertem hybridisiertem Oligodesoxynukleotid zu radioaktiv markiertem freiem Oligodesoxynukleotid bestimmt werden. Die Bestimmung der Entwindungsgeschwindigkeiten für die DNA-Substrate wurde analog zur Bestimmung der Translokationsgeschwindigkeit durchgeführt (2.3.10.2.1).

2.3.10.4 Triple-Helix-Aktivität

Das Experiment diente als weiterer Nachweis für die Translokations- und Helikaseaktivität von ORF904 und seinen Mutanten auf doppelsträngiger DNA.

Die radioaktive Markierung des hier verwendeten Oligodesoxynukleotids TFO erfolgte analog zur Bestimmung der Translokationsaktivität. Um das Triple-Helix-Substrat zu gewinnen, wurde ein äquimolares Gemisch aus radioaktiv markiertem Oligodesoxynukleotid TFO und *Sspl* linearisiertem Plasmid pMJ5 (Prof. Dr. Hopfner, LMU München) für 15 min bei 57°C in 1x MM-Puffer inkubiert. Anschließend erfolgte ein langsames abkühlen auf RT im Heizblock. Ein 10 µl Reaktionsansatz enthielt 1x Reaktionspuffer, 2 mM ATP, 5 nM ³²P-markiertes Triple-Helix-Substrat und 0,5 µM Protein. Die Reaktionsansätze wurden für 30 min bei 45°C inkubiert und nach Zugabe von 3 µl 1x Triple-Helix-Stoppuffer unverzüglich auf ein 8%-iges natives PAA-Gel in 1x Triple-Helix-DNA-Puffer aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele autoradiographisch im InstantImager analysiert. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Gerätesoftware.

2.3.10.4.1 Bestimmung der Entwindungsgeschwindigkeit für die Triple-Helix

Um die Entwindungsgeschwindigkeit zu bestimmen, wurden mit dem Triple-Helix-Substrat mindestens drei Kinetiken gemessen. Hierfür wurden die Ansätze wie unter 2.3.10.4 beschrieben vorbereitet. Anstelle von 0,5 µM wurden jedoch nur 50 nM Protein eingesetzt. Anschließend wurden die Proben für 1, 5, 10, 15, 30, 60, 90 und 120 min bei 45°C in Gegenwart bzw. Abwesenheit von ATP inkubiert. Die Proben wurden auf Eis inkubiert, bis sie auf das PAA-Gel aufgetragen wurden.

Nach dem Gellauf konnte mit Hilfe der Gerätesoftware des InstantImagers das Verhältnis von radioaktiv markiertem hybridisiertem TFO zu radioaktiv markiertem freiem TFO bestimmt werden. Die Bestimmung der Entwindungsgeschwindigkeit für die DNA-Triple-Helix wurde analog zur Bestimmung der Translokationsgeschwindigkeit durchgeführt (2.3.10.2.1).

2.3.10.5 Verwertbarkeit von rNTPs und dNTPs

Um zu überprüfen, welche rNTPs bzw. dNTPs von ORF904 und seinen Mutanten für die Translokations- und Helikaseaktivität genutzt werden können, wurden die Bestimmung der Translokationsaktivität und die Entwindung des Triple-Helix-Substrats auch in Gegenwart von 2 mM UTP, GTP, CTP bzw. dATP, dTTP, dCTP und dGTP durchgeführt.

2.3.10.6 Entwindungsaktivität für dsPlasmid-DNA

Um das Entwindungspotential doppelsträngiger Plasmid-DNA von ORF904 zu untersuchen, wurde dsPlasmid-DNA in Gegenwart von ORF904 inkubiert. Bei ausreichender Helikaseaktivität würden freiliegende ss-Bereiche durch Zugabe von S1 Nuklease bzw. Mung Bean Nuklease geschnitten, was zu einer Verschiebung von ccc (*c*ovalently *c*losed *c*ircle) zu oc (*o*pen *c*ircle) bzw. linearisierter Plasmid-DNA führen würde.

Der Reaktionsansatz enthielt 1x NEB-Puffer 1, 2 mM ATP, 10, 100 bzw. 500 nM Protein, 10 nM pUC_pRN1 und wurde für 5 bzw. 10 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze nach Zugabe von 1, 0,5, 0,04, 0,004 U/μl Mung Bean Nuklease bzw. 0,5, 0,04, 0,02, 0,004, 0,002 U/μl S1 Nuklease für 5, 10, 30 oder 60 min bei 60°C inkubiert. Die Ansätze wurden mit 2 μl ND-Puffer auf ein 1%-iges Agarosegel geladen und anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt.

2.3.10.7 EMSA (*E*lectrophoretic *M*obility *S*hift *A*ssay)

Um die Bindung von ORF904 und seinen Mutanten an doppelsträngige DNA zu untersuchen, wurde ein Gel-*Shift*-Experiment durchgeführt.

In einem 4 μl Reaktionsansatz wurden 2 μl PCR-Produkt (200 bp) bzw. 55 nM *Rsa*I verdautes Plasmid pUC_pRN1 (8036 bp) in 1x Reaktionspuffer mit 2 μM Protein für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 2 μl Nativen-DNA-Puffer auf ein 1%-iges Agarosegel in 0,5x TBE aufgetragen und für 0,06 kWh mit 10 W laufen gelassen.

Nach dem Anfärben des Gels mit Ethidiumbromid konnte der *Shift* des PCR-Produkts bzw. der *Shift* der DNA-Fragmente (2x 100-200bp, 4x 200-300bp, 1x 300-400 bp, 2x 400-500bp, 2x 600-700bp, 1x700-800bp, 1x 1400-1500bp 1x 1900-2000bp) sichtbar gemacht werden.

2.3.10.8 Fluoreszenzanisotropietitration zur Bestimmung von $K_{0,5}$

Fluoreszenzanisotropiemessungen wurden genutzt, um die Affinität eines Proteins für ein einzel- bzw. doppelsträngiges Oligodesoxynukleotid zu bestimmen (Heyduk *et al.*, 1996).

Regt man einen Fluoreszenzfarbstoff mit polarisiertem Licht an, so emittiert er meist Licht der gleichen Polarisationsebene. Da kleine Moleküle aber während der Lebensdauer des angeregten Zustands schnelle Rotations- und Translationsbewegungen vollführen, erfolgt eine Depolarisation des emittierten Lichts. Wird jedoch die Mobilität des Fluorophors eingeschränkt, indem man es z.B. an ein Oligodesoxynukleotid koppelt, nimmt der Anteil des emittierten Lichts, welches in der gleichen Polarisationsebene wie das Anregungslicht schwingt, wieder zu. Die Fluoreszenz des Moleküls wird anisotrop. Erfolgt noch zusätzlich die Bindung eines Makromoleküls, z.B. eines Proteins, an das fluoreszenzmarkierte Oligodesoxynukleotid, verursacht dies einen weiteren Anstieg der Anisotropie. Man kann also den Anstieg der Anisotropie nutzen, um einen DNA-Protein-Komplex zu charakterisieren.

Die Anisotropie (r) wurde bestimmt, indem die emittierte Fluoreszenz parallel (I_{\parallel}) und senkrecht (I_{\perp}) zu Polarisationssebene des eingestrahlten Lichts gemessen wurde.

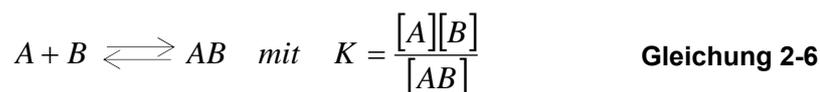
$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad \text{Gleichung 2-5}$$

Die Fluoreszenzanisotropiemessungen wurden mit einem Fluoreszenzspektrometer LS-50B (Perkin Elmer, Waltham MA USA) in einer 1 ml Quarzküvette (Hellma, Müllheim) bei 25°C durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 120 μ l. Als Substrate dienten 20 nM der in Tabelle 2-10 aufgeführten Fluorescein markierten Oligodesoxynukleotide. Als Pufferzusatz wurden unter anderem 1 mM ATP, ADP, AMP-PnP, γ -S-ATP und 10 mM $MgCl_2$ verwendet. Die Proteinkonzentration (zu Beginn max. 10 μ M) wurde mittels reverser Titration graduell um jeweils 30% auf eine Endkonzentration von bis zu 13 nM verdünnt, indem Aliquots der Protein/DNA/Fluoreszenz-anisotropiepufferlösung in der Küvette durch 20 nM DNA in 1x Fluoreszenz-anisotropiepuffer ersetzt wurden.

Die Probe wurde mit 495 nm angeregt. Die vertikale und horizontale Emission wurde bei 526 nm gemessen. Emissionsstrahlung unter 515 nm wurde mittels eines Filters blockiert. Außerdem wurde noch ein gerätespezifischer Korrekturfaktor (*grating factor*) eingerechnet, der durch den Abgleich der Anisotropie des freien Fluorophors im entsprechenden Messpuffer auf den Wert 0 erhalten wurde.

Für jeden Titrationspunkt wurden mindestens drei Messpunkte aufgenommen. Die Integrationszeit für jeden Messpunkt betrug 10 s.

Zur Auswertung wurden die Anisotropiewerte gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Zur Charakterisierung der Bildung des Protein-DNA-Komplexes wurde ein einfaches 1:1 Bindungsmodell angenommen, wobei [A] und [B] die Konzentrationen des freien Proteins und der freien DNA sind und [AB] die Konzentration des Protein-DNA-Komplexes ist.



Setzt man nun $[A_0]$ und $[B_0]$, die Ausgangskonzentrationen von Protein und DNA ein und formt um, so erhält man die Konzentration des Komplexes [AB].

$$[AB] = \frac{[A_0] + [B_0] + K}{2} - \frac{\sqrt{([A_0] + [B_0] + K)^2 - 4[A][B]}}{2} \quad \text{Gleichung 2-7}$$

Die Konzentration des Komplexes [AB] ist mit der Anisotropie (r) über eine lineare Beziehung verknüpft, wobei r_B und r_{AB} die Anisotropiewerte der freien DNA und des Protein-DNA-Komplexes darstellen.

$$r = \frac{[AB]}{[B_0]} r_{AB} + \frac{[B_0] - [AB]}{[B_0]} r_B \quad \text{Gleichung 2-8}$$

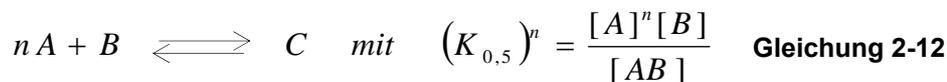
Unterscheiden sich freier und gebundener Zustand des Fluorophors jedoch in ihrer Fluoreszenzgesamtintensität, müssen die fraktionales Fluoreszenzintensitäten der freien DNA (f_B) und des DNA-Proteinkomplexes (f_{AB}) berücksichtigt werden. Unter Berücksichtigung der Intensitätsänderung s , welche das Verhältnis der Intensität der freien gegenüber der gebundenen DNA ist, berechnet sich die Anisotropie dann wie folgt:

$$r = f_{AB} r_{AB} + f_B r_B \quad \text{Gleichung 2-9}$$

$$f_B = \frac{[B_0] - [AB]}{[B_0] - [AB] + [AB]s} \quad \text{Gleichung 2-10}$$

$$f_{AB} = \frac{[AB]s}{[B_0] - [AB] + [AB]s} \quad \text{Gleichung 2-11}$$

Unter Annahme kooperativer Bindung gilt für die Bestimmung der Proteinkonzentration $K_{0,5}$, die für halbmaximale Bindung erforderlich ist, folgendes Reaktionsgleichgewicht:



Dabei ist [A] die Protein-, [B] die DNA- und [AB] die Konzentration des Komplexes. n stellt den Hill-Koeffizienten dar.

Für die Anisotropie ergibt sich hier unter Berücksichtigung der Proteinkonzentration [A]:

$$r = \frac{(r_{AB} - r_B)[A]^n}{K_{0,5}^n + [A]^n} + r_B \quad \text{Gleichung 2-13}$$

Die aus den Messungen erhaltenen Datenpunkte wurden mit Origin (Originlab) durch nicht lineare Regression an die Gleichungen 2-8, 2-9 und 2-13 angepasst.

2.3.10.9 CD (Circular Dichroism)-Spektroskopie

Um die native Faltung der Proteine ORF904, N371, N371K752, K752G844 und N40C370 zu überprüfen und um den α -helikalen Sekundärstrukturanteil zu bestimmen, wurden CD-Spektren im fernen UV-Bereich (200-260 nm) in einem Temperaturbereich von 20-105°C mit einem Jasco J-600 Spektropolarimeter (JASCO GmbH, Groß-Umstadt) aufgezeichnet.

Die Messungen wurden in einer 0,1 cm Quarzküvette (Hellma, Müllheim) mit 1,5, 3, 4, 16 bzw. 5 μ M Protein in CD-Puffer ohne bzw. mit ss- oder dsDNA in einem Volumen von 300 μ l durchgeführt. Die Scangeschwindigkeit betrug 100 nm/min, die Bandbreite 1,0 nm, die Auflösung 0,2 nm, die Sensitivität 20 mdeg und die Dämpfung 1 s. Die Temperatur betrug 20°C bzw. der Temperaturanstieg bei den thermischen Übergängen 60°C/h. Es wurden 5 Messwiederholungen durchgeführt.

Die Spektren wurden bezüglich des Pufferhintergrundsignals korrigiert und die Werte in MRW (Mean Residue Weight) Elliptizitätseinheiten ($\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) umgerechnet (siehe Gleichung 2-14).

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{\Theta \cdot 100}{c \cdot d \cdot N_{AS}} \quad \text{Gleichung 2-14}$$

$[\Theta]_{MRW}$: molare Elliptizität pro Aminosäurerest (in $\text{Grad}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$); Θ : gemessene Elliptizität (in Grad); c: Konzentration des Proteins (in M); d: Schichtdicke (in cm); N_{AS} : Anzahl der Aminosäurereste des Proteins

2.3.10.10 Glyceringradientenzentrifugation

Über die Ultrazentrifugation im Glyceringradienten wurde versucht, die Multimerisierung des Proteins nachzuweisen. Der Gradient (34-17% Glycerin/max. 0,15% Glutaraldehyd) mit einem Volumen von 11 ml wurde mit einer FPLC LKB Gradient Pump 2249 (Pharmacia) unter Verwendung der Puffer A und B in Ultrazentrifugationsröhrchen (Herolab, Wiesloch) angesetzt. Das Reaktionsvolumen betrug 150 μ l. Im Ansatz waren 11 μ M Protein, 1x PBS-Puffer und 10 mM MgCl_2 . Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 60°C inkubiert.

Bevor er auf den Glyceringradienten geladen wurde, fungierten 0,15% (v/v) Glutaraldehyd als *Crosslinker*. Der *Crosslink* wurde 5 min bei RT, auch in Gegenwart von 2 μ M ss- bzw. dsOligodesoxynukleotid (49 bp) sowie 2 mM ATP durchgeführt. Als Referenz diente ein Ansatz mit je 50 μ g BSA, β -Amylase und Thyreoglobulin ohne Glutaraldehyd.

Die Zentrifugation wurde in der Ultrazentrifuge Centrikon T-1055 (KontronInstruments, Neufahrn) mit einem TST 41.14 Rotor für 16 h bei 10°C mit 40000 Umdrehungen pro Minute durchgeführt. Anschließend wurden 500 μ l Fraktionen gesammelt.

Die *Crosslink*-Reaktion wurde durch Zugabe von 140 mM Glycin gestoppt. Die Fraktionen wurden mittels Bradford-Test im Plattenlesegerät Universal Microplate Spectralphotometer (MWG-Biotech, Ebersberg) auf ihren Proteingehalt untersucht. Die Auswertung erfolgte mittels der geräteeigenen Software KC4 (BioTek, Bad Friedrichshall). Der Vergleich mit dem Standard erlaubte eine Aussage über die Molekülmasse in den einzelnen Fraktionen.

2.3.10.11 Glutaraldehyd-Crosslink

In diesem Experiment wurde die Eigenschaft des Monomers von N371H6 untersucht, in Gegenwart eines *Crosslinkers* stabile Multimere zu bilden.

Als chemischer *Crosslinker* diente Glutaraldehyd, welches in limitierenden Konzentrationen eingesetzt wurde. Dies gewährleistete eine kovalente Verknüpfung zwischen räumlich nahe gelegen Untereinheiten. Hierbei wurden die beiden reaktiven Aldehydgruppen spezifisch mit je einer primären Aminogruppe des Enzyms verknüpft.

Im 20 µl Reaktionsansatz waren 12 µM Protein, 1x PBS-Puffer und 2 mM MgCl₂ enthalten. In manchen Proben wurden als Zusatz 2 µM ss- bzw. dsOligodesoxynukleotid (49bp) und 1 mM ATP verwendet. Die Proben wurden für 30 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wurden 0,2% (v/v) frisches Glutaraldehyd in 1x PBS-Puffer zugegeben. Danach wurde für weitere 5 min bei RT inkubiert. Die *Crosslink*-Reaktion wurde durch Zugabe von 140 mM Glycin gestoppt. Sämtliche Proben wurden auf ein 6%-iges SDS-Gel geladen und analysiert.

2.3.10.12 Limitierende Proteolyse

10 µM Protein ORF904 wurden in 1x Proteolysepuffer in Abwesenheit bzw. Gegenwart von 5µM dsDNA (49 bp) und 5 mM ATP für 30 min bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit Trypsin in einem Verhältnis von 50:1 [Protein:Trypsin (w/w)] bzw. mit Chymotrypsin in einem Verhältnis von 500:1 [Protein:Chymotrypsin (w/w)] für 30 min bei 50°C bzw. 37°C verdaut. Die Proben wurden mit 1x SDS-Probenauftragspuffer versetzt, auf ein 9%-iges SDS-Gel geladen und analysiert.

2.3.10.13 Cryo-TEM (Cryo-TransmissionsElektronenMikroskopie)

Um die Multimerisierung nachzuweisen wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von ORF904 und den Deletionsmutanten N371 und N527 angefertigt. In den Proben waren 0,5 µM Protein, 0,5 µM ss- bzw. dsOligodesoxynukleotid (49 bp), 1 mM AMP-PnP, 10 mM MgCl₂ 25 mM K-Phosphat und 150 mM KCl enthalten. Für die Cryo-TEM Untersuchung wurden je 2µl der Proben auf ein hydrophilisiertes, mit Kohlenstoff spitzenartig überzogenes Kupfer-TEM-Gitternetz (200 mesh, Science Services, München), aufgebracht. Der größte Teil der Flüssigkeit wurde mit Filterpapier entfernt, wobei ein dünner Film auf dem Kohlenstoffgerüst zurückblieb.

Die Proben wurden durch schnelles Eintauchen in flüssiges Ethan (mit Hilfe von flüssigem Stickstoff) auf etwa 90 Grad Kelvin in einer Kühlapparatur (Zeiss Cryobox, Zeiss NTS GmbH, Oberkochen) heruntergekühlt. Nachdem die Proben eingefroren waren, wurde das restliche Ethan mittels Filterpapier entfernt. Die Proben wurden dann über einen *Cryo-transfer holder* (CT3500, Gatan, München), in ein Zeiss EM922 EFTEM Instrument überführt.

Die TEM wurde bei ca. 90 Grad Kelvin mit einer Beschleunigungsspannung von 200 kV durchgeführt. Um den Qualitätsverlust der Bilder zu reduzieren ($\Delta E = 0$ eV) wurden diese mit einer Elektronendosis von 100-1000 e/nm² aufgenommen. Alle Bilder wurden mit einem digitalen CCD-Kamerasystem (Ultrascan 1000, Gatan, München) aufgenommen und mit einem digitalen Bildverarbeitungssystem (Gatan Digital Micrograph 3.10 for GMS 1.5) bearbeitet.

2.3.10.14 TEM (TransmissionsElektronenMikroskopie)

Der Komplex aus Protein und DNA für die Elektronenmikroskopie wurde mittels der GraFix Methode, die eine Gradientenzentrifugation mit einem milden chemischen *Crosslink* (Glutaraldehyd, ~0,1%) kombiniert (Kastner *et al.*, 2008), vorbereitet. Nach der Fraktionierung wurde die Probe auf einem dünnen Kohlenstofffilm adsorbiert, mit Uranylformiat (2% w/v) kontrastiert (Golas *et al.*, 2003) und luftgetrocknet.

Die Bilder wurden mit einer F415 *slow-scan* CCD Kamera (TVIPS GmbH, Gauting, Germany) mit einer 90000fachen Vergrößerung in einem Philips CM200 FEG mit einer Beschleunigungsspannung von 160 kV aufgenommen. Davon wurden 2351 Einzelbilder ausgesucht, die zur Deckung gebracht und einer statistischen Analyse (van Heel & Frank, 1981) und Klassifikation (van Heel & Stoffler-Meilicke, 1985) unterzogen wurden. Die Symmetrie der *eigenimages* wurde anhand mehrfacher Multireferenz-*Alignments* (Sander *et al.*, 2003), MSA-basierter Klassifikation und subsequenter Mittelwertbildung errechnet. Die Bildbearbeitung wurde mit dem IMAGIC-V Software Package (IMAGE Science GmbH, Berlin) (van Heel *et al.*, 1996) durchgeführt.

2.3.11 Bestimmung des Replikationsursprungs von pRN1

Footprint-Experimente ermöglichen es, die Bereiche einer DNA-Sequenz zu bestimmen, mit denen ein Protein Wechselwirkungen eingeht. Die DNA wird hierzu in An- und Abwesenheit des Proteins mit einem Spaltungsreagenz (enzymatisch oder chemisch) limitierend hydrolysiert. Der Vergleich der beiden Reaktionen erlaubt es, die Regionen auf der DNA zu identifizieren, welche durch die Komplexbildung mit dem Protein für das Spaltungsreagenz leichter oder schwerer zugänglich sind.

2.3.11.1 DNase-I-Nuklease-Footprint

Über PCR wurden mit pUC_pRN1 als DNA-Matrize und den in Tabelle 2-10 aufgeführten Oligodesoxynukleotiden die PCR-Produkte stem (191 bp) bzw. stem100 (100 bp) als Substrate für die *Footprint*-Experimente synthetisiert. Hierzu wurde der *forward Primer* am 5'-Ende radioaktiv markiert. Aus früheren Experimenten war ein Bereich mit einem *Stemloop* direkt stromabwärts von *orf904* als für die Replikation essenziell identifiziert worden (Berkner & Lipps, unveröffentlicht).

Das resultierende PCR-Produkt stem100 repräsentiert die Sequenz direkt stromabwärts von *orf904*, während das PCR-Produkt stem die Sequenz mit dem kompletten *Stemloop* stromabwärts von *orf904* repräsentiert. Die *Stemloop*-Sekundärstruktur des PCR-Produkts wurde mit Hilfe des Programms Mfold (<http://www.mfold.burnet.edu.au/>) bestätigt, welches anhand von Energieminima die wahrscheinlichsten und stabilsten Sekundärstrukturen berechnet.

Ein 20 µl Reaktionsansatz enthielt 1 µl radioaktiv markiertes PCR-Produkt, 1x Helikasereaktionspuffer und 2; 1; 0,5; 0,25; 0,1 bzw. 0,05 µM Protein (ORF904, N371 bzw. K752G844). Manche der Ansätze enthielten zusätzlich noch 1 mM ATP, ADP, AMP-PnP bzw. γ-S-ATP. Die Ansätze wurden für 5 bis 10 min bei RT bzw. 60°C inkubiert. Dann wurden 1, 0,2, 0,1 bzw. 0,01 U DNase I und 1x DNase-I-Puffer zugegeben und für 1 bis 2 min bei RT inkubiert. Die Spaltungsreaktion wurde durch Zugabe von 5 µl DD-Puffer gestoppt. Die Proben wurden anschließend für 10 min bei 75°C inkubiert und auf ein 6%-iges denaturierendes PAA-Gel geladen. Nach dem Lauf wurde das Gel getrocknet und ein Röntgenfilm aufgelegt, der für mehrere Tage exponiert wurde.

2.3.11.2 KMnO_4 -Footprint

Mit Hilfe des Oxidationsmittels KMnO_4 ist es möglich, Thymidinreste in der DNA in Thyminglykol zu überführen. Die DNA ist dann nach der Modifikation an dieser Stelle mit Piperidin spaltbar. Voraussetzung für eine effiziente Oxidationsreaktion ist allerdings eine gute Zugänglichkeit der Thyminbasen. Dies ist der Fall, wenn z.B. einzelsträngige Bereiche in der DNA vorliegen.

Die Ansätze wurden analog zu 2.3.11.1 vorbereitet. Nach der Inkubation für 5 bis 10 min bei RT erfolgte die Zugabe von 1 μl einer 120 mM KMnO_4 -Lösung (6 mM Endkonzentration) und eine weitere Inkubation für 30 bis 120 s bei RT. Die Oxidationsreaktion wurde durch Zugabe von 2 μl 2-Mercaptoethanol gestoppt und das Protein durch Zugabe von 25 mM EDTA, 1% SDS und 50 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K für 20 min bei 30°C verdaut. Der Ansatz wurde anschließend mit Phenol extrahiert (2.3.3.4) und mit Ethanol (2.3.3.5) gefällt.

Das getrocknete Pellet wurde in 70 μl einer frisch verdünnten 1 M Piperidinlösung resuspendiert. Für die Spaltungsreaktion an der DNA wurde für 25 min bei 90°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz in flüssigem N_2 tiefgefroren und durch Lyophilisieren im Speed-Vac-Konzentrator BA-VC-300H (H. Saur Laborbedarf, Reutlingen) zum Pellet getrocknet. Das Pellet wurde anschließend in 5 μl DD-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden dann für 10 min bei 75°C inkubiert und auf ein 6%-iges denaturierendes PAA-Gel geladen.

Nach dem Lauf wurde das Gel getrocknet und ein Röntgenfilm aufgelegt, der für mehrere Tage exponiert wurde.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Strukturinformationen zur Helikase von ORF904

3.1.1 Identifikation relevanter Domänen und Aminosäurereste

3.1.1.1 Die Helikasedomäne

3.1.1.1.1 Sequenzstudie und Homologiemodell

Die Sequenzanalyse der Aminosäuren von ORF904 offenbarte zwei konservierte Domänen: Eine N-terminale Prim/Pol-Domäne (Aminosäuren 47 bis 247, pfam09250) und eine C-terminale ATPase-Domäne (Aminosäuren 408 bis 827, COG3378) (Lipps *et al.*, 2003). Dazwischen befindet sich ein Bereich von ca. 160 Aminosäuren, dessen Funktion nicht bekannt war. Die Prim/Pol-Domäne wurde biochemisch eingehend untersucht (Beck & Lipps, 2007) und auch kristallisiert (Lipps *et al.*, 2004) (Beck, unveröffentlicht). Die ATPase-Domäne schließt die konservierte Domäne D5_N (Aminosäuren 417 bis 509, pfam08706) ein. Die Sequenzanalyse mit ClustalW ergab, dass der zentrale Bereich der ATPase-Domäne (Aminosäuren ~550 bis ~800) mit einigen Superfamilie-3- (SF3)-Helikasen, so z.B. dem Bakteriophagen P4 α -Protein (Aminosäuren 411-708) und dem Poxvirus D5-Protein (22-280) verwandt ist (Abbildung 3-1).

ORF904	481	RNGTLEWDSKGVTTWYDVKERTPKVYSFNVDWNLKIEEIEKFNMKIEITVEDIENLARRVC	540
P4 α -Protein	411	·····RRLIGFRNGVLDTQNG···TFHPSHSPSHWMTLCDVDFTFPVDGETLETHAP···AF	461
D5-Protein	22	·····IKFYTPSPNFYSIFTG·····YKYEQVEWKENIIEAWLDHVKEIICNGNE·····	66
		<u>Walker A</u>	
ORF904	541	FRSLETFKQWVDDKQVLLFEVIGYTFYPKYIFNKAILLTCAGANCKSTFLNLLKILGQ··	599
P4 α -Protein	462	WRWLDRAAGGRAEKRDVILAAALFMVLANRYDWQLFLEVTCPPGGSGKSSIMAEIATLLAGE··	520
D5-Protein	67	·RVYEYILCWFEAN·······ILQHPSAKNETALIIITKQGTGKNTFFTDILCKLLEG	115
ORF904	600	·KNVSAMPLKRIMESDRFASIELFHKLANVSSSELFAPKLTNTDLEKKLTDGEDYIEGQKRF	658
P4 α -Protein	521	·DNATSATIETLESPRERAALTGFSLIRLPDQEKWSG···DGAGLKAITGGDAVSVDPKY	576
D5-Protein	116	YSNPNTNLENICGKFNSSIENMKLIVCNELQSIDTTKVLNSDALKSLITDKVGVVERKY	175
		<u>Arg-Finger</u>	
ORF904	659	RDPIYFINYAKLFNATN·ELPVVSDQSYGFWRRWIVIEFPHQPPP···DPNFFDKTFTVE	714
P4 α -Protein	577	RDAYSTHIPAVILAVNNMPMRFT·DRSGGVSRRRVIIHFPEQIAPQERDPQLKDKITR··	633
D5-Protein	176	KDQRCENVANFIMVSNNAVPMKLESSD·····RRRVVVRTSDSHMQ···DTEYFDD·····	224
ORF904	715	EVEGVITVAVIAFARVLQOKKFDDEFSSANVKELWERKTDVSYAFVKELLETERAEYDPA	774
P4 α -Protein	634	·······ELAVIVRRLMQKFSDP··	666
D5-Protein	225	··	252
ORF904	775	NGDLFMPTEDEFYQAVLEWSEENDTKAESKAVVTQRLQSKFRITKD	819
P4 α -Protein	667	NIKRDADPTFDFIGILETLTPQTSGLMGNASIIIPRNYRKYLYHAY	708
D5-Protein	253	Q··	280

Abbildung 3-1: Sequenzvergleich des Poxvirus D5-Proteins und des P4 α -Proteins mit ORF904. In Dunkelgrau sind konservierte Aminosäurereste, in Weiß und Schwarz untermalt sind komplett konservierte Aminosäurereste markiert. Das Walker A Motiv und die potentiellen Argininfinger sind an entsprechender Stelle im Sequenzvergleich gekennzeichnet.

transportierenden DNA herstellt, sowie der bereits erwähnte Argininfinger, der an der ATP-Hydrolyse in einer benachbarten Untereinheit beteiligt ist.

Der strukturbasierte Sequenzvergleich erlaubte es auch ein Homologiemodell von ORF904 zu erstellen (Abbildung 3-3). Dazu wurden die bereits aufgeklärten Strukturen der viralen SF3-Helikasen des Papillomavirus Typ 18 (PDB 1TUE), des Adeno-assoziierten Virus 2 (PDB 1S9H) und des Simianvirus 40 (PDB: 1SVM) verwendet. Da ORF904 keine signifikante Sequenzähnlichkeit außerhalb des AAA⁺-ATPase-Kernbereichs zu einer der drei Helikasen aufweist, und da sich die drei Helikasen außerhalb des Kernbereiches strukturell stark unterscheiden, wurde das Modellieren auf den Helikasekernbereich (Aminosäure 554 bis 695 von ORF904) beschränkt.

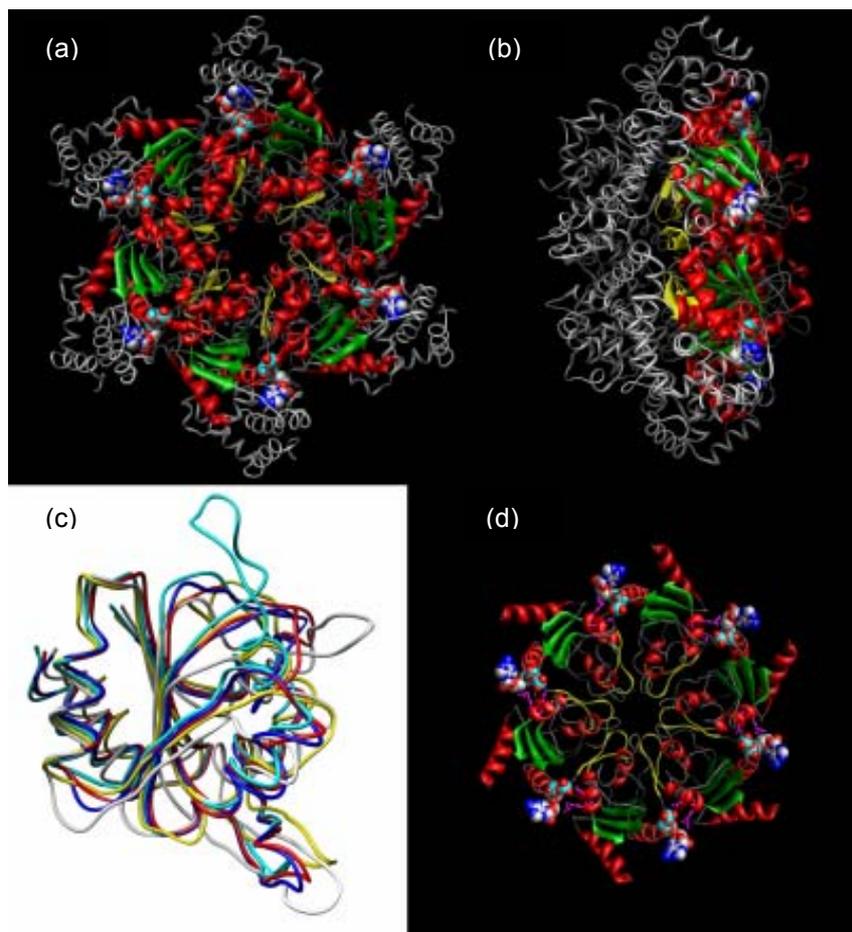


Abbildung 3-3: Homologiemodell von ORF904. (a) Draufsicht und (b) Seitenansicht des SV40 L Tag Hexamers (PDB 1SVM). Der Kernbereich der Helikasedomäne mit seiner AAA⁺-ATPase-Region ist in Grün (β -Faltblätter) und Rot (α -Helices), die ATP-Moleküle sind als Kugelmodelle dargestellt. Der β -Hairpin (Aminosäuren 507-520) ist gelb markiert. (c) Überlagerung der AAA⁺-ATPase-Domäne der drei Helikasekernbereiche des: Papillomavirus Typ 18 (PDB 1TUE, Aminosäuren 460-595, gelb), des Adeno-assoziierten Virus 2 (PDB 1S9H, Aminosäuren 309-450, hellgrau) und des Simianvirus 40 (PDB 1SVM, Aminosäuren 400-546, cyan). Zwei Modelle des Helikasekernbereichs von ORF904 (Aminosäuren 554-695) sind in Rot bzw. Blau dargestellt. (d) Auf der Quartärstruktur von SV40 L Tag basiertes hexamerer Modell der Struktur des Helikasekernbereichs von ORF904 (Farbkode wie in a). Das Modell wurde von G. Lipps erstellt.

Das Modell hat rms-Werte von ungefähr 1,8 Å für die Helikase des Papillomavirus (PV) und des Adeno-assoziierten Virus (AAV) und 0,9 Å für die des Simianvirus 40 (SV40). Die Struktur des SV40 L Tag (*Large T antigen*) erlaubte es, ein hexamerer Modell des Kernbereichs von ORF904 zu konstruieren, in welchem auch die Bindung von Nukleotiden an die Struktur dargestellt ist.

Das Homologiemodell und der Sequenzvergleich von ORF904 verdeutlicht nochmals die Verwandtschaft von ORF904 zu den SF3-Helikasen (siehe 1.4). Darüber hinaus ermöglichten sie, neue, für die Helikaseaktivität von ORF904 relevante Sequenzmotive zu finden und bereits bekannte zu bestätigen.

3.1.1.1.2 Deletions- und Punktmutanten

Auf der Basis des Sequenzvergleichs und des Homologiemodells von ORF904 konnten Deletions- und Punktmutanten entworfen werden, die eine biochemische Charakterisierung der für die Helikaseaktivität von ORF904 essentiellen Bereiche und Aminosäurereste ermöglichte. Anhand der Deletionsmutanten konnte durch sukzessives Verkürzen der Helikasedomäne das Minimalmotiv, der kleinste noch aktive Bereich mit Helikaseaktivität, eingegrenzt werden. Abbildung 3-4 zeigt eine schematische Darstellung der Domänenorganisation von ORF904 und die Positionen und relativen Längen der entworfenen Deletionsmutanten.

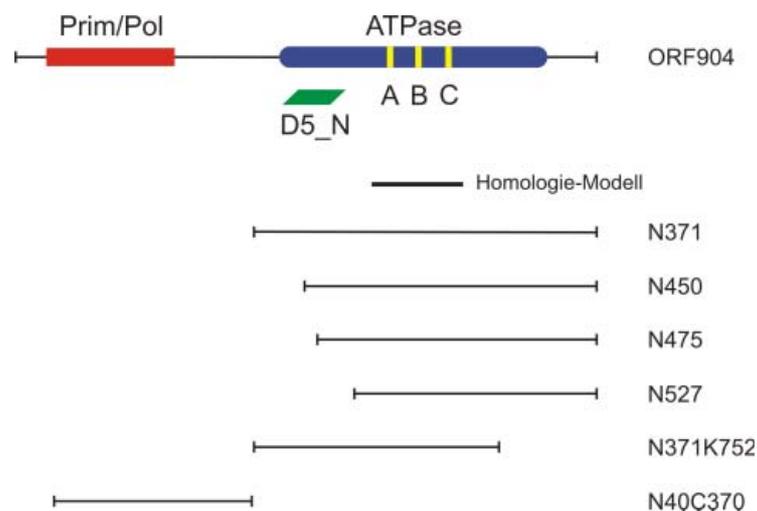


Abbildung 3-4: Schematische Darstellung der Domänenorganisation von ORF904. Das 904 Aminosäuren lange Replikationsprotein von pRN1 besitzt eine N-terminale Prim/Pol-Domäne (pfam09250) und eine C-terminale ATPase-Domäne (COG3378), welche die konservierte D5_N-Domäne (pfam08706) mit einschließt. Das Walker A und B Motiv, sowie Motiv C (gelb) innerhalb der ATPase-Domäne und die Region, die zur Ausarbeitung eines Homologiemodells der SF3-Helikasedomäne herangezogen wurde, sind markiert. Die Positionen und relativen Längen der Deletionsmutanten der Helikasedomäne sowie der Prim/Pol-Domäne sind ebenfalls der Abbildung zu entnehmen.

Um das Minimalmotiv für die ATPase/Helikaseaktivität einzugrenzen, wurden von ORF904 fünf Deletionsmutanten konstruiert. ORF904 enthält wie bereits erwähnt zwei bekannte Domänen, nämlich eine N-terminale Prim/Pol-Domäne (Aminosäuren 47 bis 247, pfam09250) und eine C-terminale ATPase-Domäne (Aminosäuren 408 bis 827, COG3378). Da die Deletionsmutante N40C370 das Minimalmotiv der N-terminalen Prim/Pol-Domäne mit Primase- und Polymeraseaktivität darstellt (Beck

& Lipps, 2007) wurde die erste Deletionsmutante der ATPase/Helikasedomäne ab Aminosäure 371 (N371) konstruiert. Wie unter 3.1.1.1.1 gezeigt, weist der zentrale Bereich der ATPase-Domäne zwischen Aminosäure 550 und Aminosäure 800 Verwandtschaft zu SF3-Helikasen auf. Aus diesem Grund wurde eine zweite Deletionsmutante ab Aminosäure 527 (N527) konstruiert. Wie sich im Laufe der Untersuchungen herausstellte (3.2), war diese Deletionsmutante inaktiv, weshalb die beiden Mutanten N450 und N475 konstruiert wurden, um den Bereich zwischen N371 und N527 genauer zu charakterisieren. Die Deletionsmutante N371K752 wurde konstruiert, weil im Laufe der Arbeit eine C-terminale Winged-Helix-DNA-Bindedomäne (3.1.1.2) identifiziert wurde und es von Interesse war, deren Einfluss auf die Helikaseaktivität zu untersuchen. In Tabelle 3-1 sind sämtliche Deletionsmutanten der Helikasedomäne von ORF904 mit ihrem entsprechenden Molekulargewicht (MW) aufgelistet. Die Punktmutanten von ORF904 lassen sich bezüglich ihres MW nicht vom Wt unterscheiden und sind daher nicht separat aufgeführt.

Tabelle 3-1: Übersicht über die Deletionsmutanten der Helikasedomäne von ORF904 und ihren Molekulargewichten. H6 zeigt den Ort eines 6x Histidin-Tags an. N gibt die erste Aminosäure der Deletionsmutante an und C oder K die letzte. Die Zahl gibt die Aminosäureposition relativ zum N-Terminus des Wt an.

Protein	MW [kDa]
ORF904H6	107,1
N371H6	64,4
N450H6	55,1
N475H6	52,0
N527H6	45,7
N371K752H6	46,2
N40C370H6	39,7

Die Punktmutanten von ORF904 ermöglichten eine Überprüfung der Sequenzmotive und konservierten Aminosäuren auf ihre Relevanz bezüglich der ATPase- und Helikaseaktivität. Die Walker A Mutante K586E war bereits untersucht worden und zeigte wie erwartet keinerlei ATPase-Aktivität (Lipps *et al.*, 2003). Dies war für die weitere Charakterisierung von ORF904 von Interesse, da sämtliche Varianten des Wt identisch aufgereinigt wurden und so ausgeschlossen werden konnte, dass eine Verunreinigung durch eine *E. coli* ATPase vorlag.

Bei sämtlichen Punktmutanten der konservierten Sequenzmotive sowie der konservierten Aminosäuren handelt es sich um Alaninmutanten. Zu diesen zählen die Mutante des potentiellen „Lysinfinders“ K574A, die Mutanten der positiv geladenen Aminosäurereste K656A, K657A und R659A des β -Hairpins sowie die Punktmutanten R689A und R690A des potentiellen Argininfinders. Für die Lysine 656/657 und die Arginine 689/690 wurden darüber hinaus auch Alanindoppelmutanten hergestellt.

Die Aufreinigung des Wildtyps und seiner Varianten erfolgte im ersten Schritt über einen C-terminalen His-Tag mittels Affinitätschromatographie. Anschließend wurde in einem zweiten Schritt mittels Kationenaustauschchromatographie weiter gereinigt und aufkonzentriert (2.3.9). Abbildung 3-5, zeigt die Proteingele von ORF904 und seinen Deletionsmutanten.

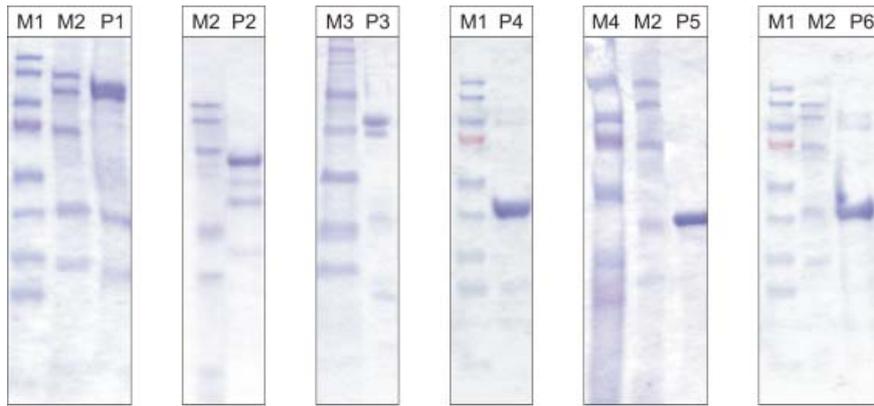


Abbildung 3-5: Proteingele der Deletionsmutanten der Helikasedomäne von ORF904. Spur P1: ORF904; Spur P2: N371; Spur P3: N475; Spur P4: N527; Spur P5: N371K752; Spur P6: N40C370; Spur M1: Fermentas PageRuler™ Prestained Protein Ladder; Spur M2: Jena Bioscience Protein Molecular Weight Marker; Spur M3: Laborstandard und Spur M4: Fermentas PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus.

3.1.1.2 Die Winged-Helix-DNA-Bindedomäne

Es wurde ein Sequenzvergleich des C-terminalen Bereichs von ORF904 (Aminosäuren 752 bis 844) mit den Replikationsproteinen der Plasmide pRN1, pRN2, pDL10, pSSVx und pHEN7, mit integrierten Plasmiden in den Genomen von *Sulfolobus tokodaii* und *Sulfolobus solfataricus* sowie den DNA-Bindedomänen des P4 α -Proteins (PDB 1KA8) und des eukaryotischen Transkriptionsregulationsfaktors Rfx (PDB 1DP7) durchgeführt (Abbildung 3-6).

Der Sequenzvergleich zeigt, dass die untersuchte Region innerhalb der pRN-Plasmidfamilie hoch konserviert ist und mit der Sequenz der Winged-Helix-DNA-Bindedomäne des P4 α -Proteins weitestgehend übereinstimmt.

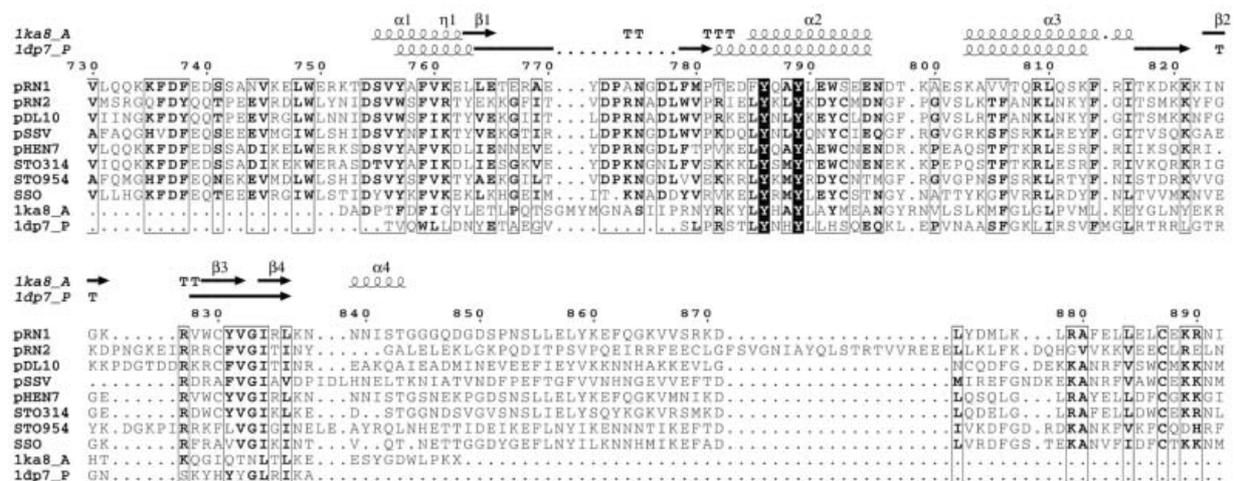


Abbildung 3-6: Sequenzvergleich der Replikationsproteine von pRN1, pRN2, pDL10, pSSVx und pHEN7 mit integrierten Plasmiden in den Genomen von *Sulfolobus tokodaii* und *Sulfolobus solfataricus* sowie den DNA-Bindedomänen des P4 α -Proteins und Rfx. Die beiden Winged-Helix-DNA-Bindedomänen stammen von dem eukaryotischen Transkriptionsregulator Rfx (PDB 1DP7) und von dem Bakteriophagen P4 α -Protein (PDB 1KA8). In Dunkelgrau sind konservierte Aminosäurereste, in Weiß und Schwarz sind komplett konservierte Aminosäurereste markiert. Die mit HHpred an ORF904 angepassten Sekundärstrukturelemente des P4 α -Proteins und von Rfx sind über dem Sequenzvergleich abgebildet.

Darüber hinaus kommt es nach der vorhergesagten Winged-Helix-DNA-Bindedomäne zu einem abrupten Abbruch der Sequenzübereinstimmungen. Interessanterweise besitzt das Bakteriophage P4 α -Protein seine Winged-Helix-DNA-Bindedomäne C-terminal von seiner SF3-Helikasedomäne (Ziegelin *et al.*, 1995); eine Situation, wie sie auch in ORF904 vorzufinden ist. Die Sekundärstruktur dieser Domäne und die von Rfx wurden mit Hilfe des HHpred Algorithmus (Soding *et al.*, 2005; Soding, 2005) an das Replikationsprotein angepasst. Zwei Tyrosine in der Mitte der Helix $\alpha 2$ sind in ORF904, sowie in den beiden Winged-Helix-DNA-Bindedomänen absolut konserviert. Die spezifische Funktion dieser beiden Aminosäurenreste ist nicht bekannt. Die Erkennungshelix $\alpha 3$ und der darauf folgende Flügel W1 bilden dabei die meisten DNA-Kontakte, wie man dem Rfx-DNA-CoKristall entnehmen kann (Gajiwala *et al.*, 2000).

Um herauszufinden, ob sich dieser Teil des Replikationsproteins in eine unabhängige Domäne mit DNA-Bindeaktivität faltet und um das Minimalmotiv zu bestimmen, wurden vier Deletionsmutanten für diese Region konstruiert. Die Mutanten begannen bei Aminosäure D737 oder K752 und endeten entweder bei Aminosäure G844 oder am nativen C-Terminus (Abbildung 3-7).

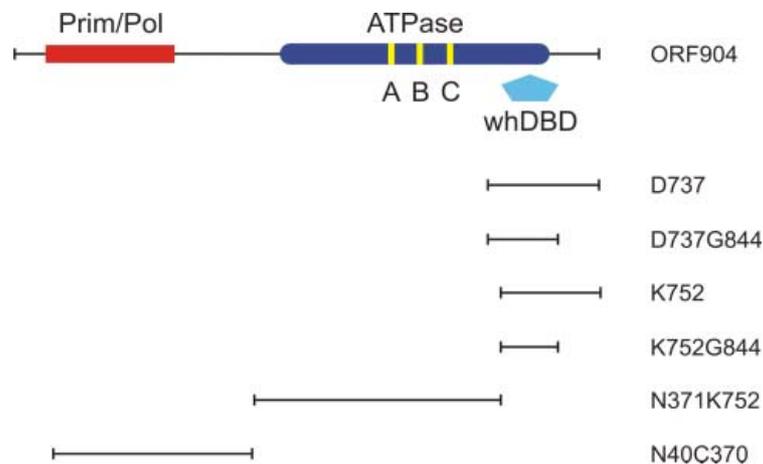


Abbildung 3-7: Schematische Darstellung der Domänenorganisation von ORF904. Am C-Terminus des Proteins befindet sich eine Winged-Helix-DNA-Bindedomäne (whDBD/pfam03288 und pfam02257). Das Walker A und B Motiv, sowie Motiv C (gelb) innerhalb der ATPase-Domäne sind markiert. Die Positionen und relativen Längen der Deletionsmutanten der Winged-Helix-DNA-Bindedomäne sowie der Prim/Pol-Domäne (N40C370) und des Helikase-minimalmotivs (N371K752) sind ebenfalls der Abbildung zu entnehmen.

Die Aufreinigung der Deletionsmutanten erfolgte in einem ersten Schritt durch einen 10-minütigen Hitzeschock bei 70°C und anschließende Zentrifugation für 20 min bei 4°C mit 20000 g. In einem zweiten Schritt wurde der gefilterte Überstand der Zentrifugation über Kationenaustauschchromatographie weiter gereinigt und aufkonzentriert. Mit Ausnahme von D737G844 waren alle Deletionsmutanten löslich. In Tabelle 3-2 sind die Deletionsmutanten der Winged-Helix-DNA-Bindedomäne von ORF904 mit ihrem entsprechenden Molekulargewicht aufgeführt. Abbildung 3-8 zeigt die Proteingele der Deletionsmutanten. K752G844 wurde zum Teil auch als Dimer aufgereinigt, welches sich jedoch durch 8 M Urea komplett denaturieren ließ.

Tabelle 3-2: Übersicht über die Deletionsmutanten der Winged-Helix-DNA-Bindedomäne von OFR904 und ihren Molekulargewichten. D und K geben jeweils die erste Aminosäure der Deletionsmutante an und G die letzte. Die Zahl gibt die Aminosäureposition relativ zum N-Terminus des Wt an.

Protein	MW [kDa]
D737	19,9
K752	18,2
D737G844	12,8
K752G844	11,1

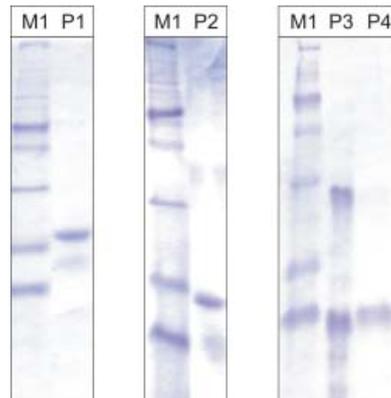


Abbildung 3-8: Proteingele der Deletionsmutanten der Winged-Helix-DNA-Bindedomäne von ORF904. Spur P1: D737; Spur P2: K752; Spur P3: K752G844; Spur P4: K752G844 mit 8 M Urea und Spur M1: Laborstandard.

3.1.2 Die Sekundärstruktur

3.1.2.1 CD-Spektren

Die CD-Spektroskopie wurde im Fern-UV-Bereich (170-250 nm) durchgeführt, da hier das CD-Signal vom Sekundärstrukturgehalt eines Proteins bestimmt wird (Schmid, 1997). In den Spektren ist der Bereich von 200-260 nm angegeben. Außerhalb dieses Bereichs überlagerte die Absorption des Probenpuffers das CD-Signal des Proteins (HT-Wert von über 600 V), so dass es nicht für eine Auswertung herangezogen werden konnte.

Der β -Faltblattanteil eines Proteins lässt sich deutlich durch das Vorhandensein zweier negativer *Peaks* bei 217 nm und 180 nm und einen positiven *Peak* bei 195 nm bestimmen (Woody, 1995).

Im Gegensatz hierzu lassen sich α -Helices durch zwei negative *Peaks* bei 208 nm und 222 nm und einen positiven *Peak* bei 190 nm erkennen und im angegebenen Bereich bestimmen (Johnson, 1990).

Die beiden negativen *Peaks* sind für ORF904, N371 und N40C370 deutlich ausgeprägt, während für N371K752 der *Peak* bei 222 nm und für K752G844 der *Peak* bei 208 nm nur schwer zu erkennen sind (Abbildung 3-9). Der positive *Peak* bei 190 nm konnte aus dem oben genannten Grund nicht dargestellt werden. Jedoch zeigten ORF904, N371 und N40C370 im Bereich um 200 nm ein deutlich positives CD-Signal mit der Tendenz, im niedrigerwelligen Bereich weiter anzusteigen. N371K752 und K752G844 lassen sich in diesem Bereich nur negative CD-Signale zuordnen. Diese zeigen jedoch die Tendenz, positivere Werte anzunehmen.

Die ermittelten CD-Spektren des Wt und der vermessenen Deletionsmutanten zeigten nicht nur, dass die untersuchten Proteine strukturiert vorlagen, sondern gaben auch Aufschluss über deren α -helikalen Anteil.

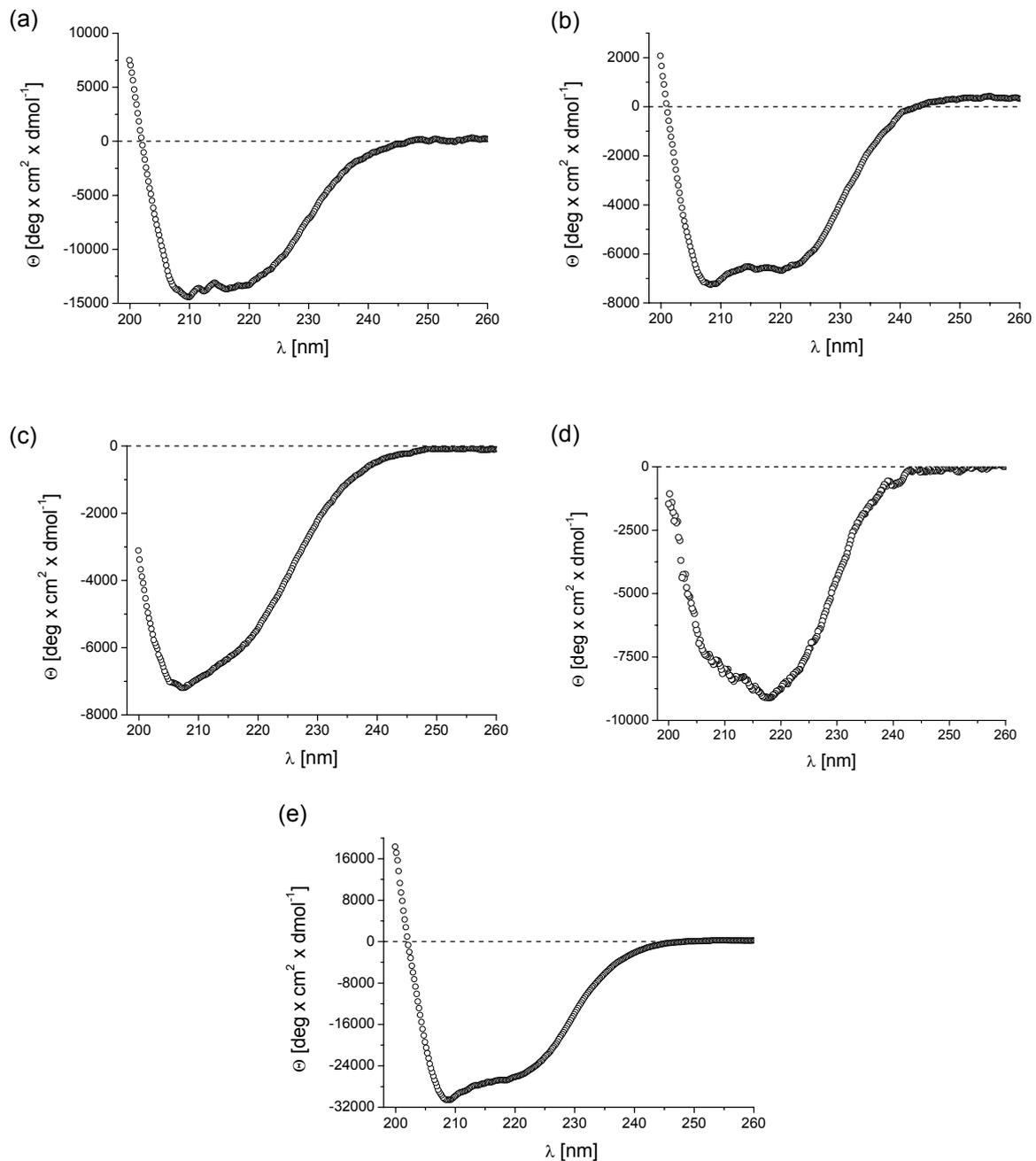


Abbildung 3-9: Fern-UV-CD-Spektren von (a) ORF904, (b) N371, (c) N371K752, (d) K752G844 und (e) N40C370. Aufgetragen ist die molare Elliptizität pro Aminosäurerest in $\text{deg} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$ in Abhängigkeit von der Wellenlänge in nm. Die Spektren wurden bei 20°C mit 1,5; 3,0; 4,0; 16,0 bzw. 5,0 μM Protein in 1x PBS bei einer Schichtdicke von 0,1 mm und einer Bandbreite von 1,0 nm (Dämpfung 1 s) gemessen. Die aus den Spektren ermittelten α -helikalen Anteile der Proteine sind in Tabelle 3-3 aufgeführt.

3.1.2.1.1 Abschätzung des α -helikalen Anteils

Der α -helikale Anteil des Wt und der Deletionsmutanten wurde anhand des Spektrums einer rein α -helikalen Struktur (poly-(Glu)) abgeschätzt (Woody, 1995). Hierzu wurden die CD-Signale bei 208 nm der untersuchten Proteine herangezogen und deren prozentualer Anteil im Vergleich zur rein α -helikalen Struktur berechnet (Tabelle 3-3).

Tabelle 3-3: Ermittelte α -helikale Anteil* von ORF904, N371, N371K752, N40C370 und K752G844.

Protein	α -helikaler Anteil [%]
ORF904	33
N371	17
N371K752	17
N40C370	72
K752G844	19

*Für das CD-Signal bei 208 nm

Die Summe der α -helikalen Anteile von K752G844 und N371K753 müssten unter Berücksichtigung der Aminosäurezahl annähernd dem α -helikalen Anteil von N371 entsprechen. Für N371 ergibt sich so rechnerisch ein α -helikaler Anteil von ca. 16%. Dieser stimmt mit den aus der Messung ermittelten 17% gut überein. Die Abweichung um 1% lässt sich damit erklären, dass wahrscheinlich der C-terminale Teil von N371 zum α -helikalen Anteil des Proteins beiträgt, der bei der Berechnung der Summe von K752G844 und N371K753 jedoch unberücksichtigt bleibt. Ebenso müsste unter Berücksichtigung der Aminosäurezahl die Summe der α -helikalen Anteile von N40C370 und N371 mit dem α -helikalen Anteil von ORF904 übereinstimmen.

Für ORF904 ergibt sich rechnerisch ein α -helikaler Anteil von 37%. Dieser stimmt annähernd mit den gemessenen 33% für ORF904 überein. Die Abweichung von etwa 4% ist vermutlich auf ein Fehlen von N-terminal und C-terminal gelegenen α -helikalen Strukturen in den isolierten Domänen zurückzuführen, die im Volllängenprotein aber ausgebildet werden können. Es sei erwähnt, dass der aus der Messung von N40C370 erhaltene Wert des α -helikalen Anteils auch gut mit dem aus der Struktur von N40C370 abgeschätzten Wert übereinstimmt (Beck, unveröffentlicht).

Im Vergleich zu ORF904 besitzt die SF6-Helikase MCM einen α -helikalen Anteil von etwa 40% und 14% β -Faltblatt (Haugland *et al.*, 2008) und die SF3-Helikase E1 von HPV einen α -helikalen Anteil von etwa 36%, 24% β -Faltblatt, 9% *turns* und 31% *random coil* (Rocque *et al.*, 2000; Ziegelin *et al.*, 1995). SV40 L Tag (P03070) besitzt einen α -helikalen Anteil von etwa 46%. Wie unter 1.2 bereits beschrieben, besitzen alle SF3-Helikasen in ihrem Kernbereich dieselbe Topologie, und unter 3.1.1.1.1 konnte anhand des Homologiemodells gezeigt werden, dass die Strukturen im Kernbereich der Helikasen L Tag (SV40), Rep (AAV2), E1 (BPV) und ORF904 (pRN1) tatsächlich sehr gut übereinstimmen. Der Unterschied in der Sekundärstruktur zwischen verschiedenen SF3-Helikasen ergibt sich also letztlich durch die außerhalb des Kernbereichs gelegenen Strukturen.

3.1.2.2 Thermische Denaturierung

Da es sich bei ORF904 um ein archaeales Protein aus dem thermophilen *Sulfolobus islandicus* handelt, war es von Interesse, Aufschluss über dessen Thermostabilität zu erhalten. Die thermische Entfaltung des Proteins und seiner Deletionsmutanten wurde durch eine Temperaturerhöhung um $1^\circ\text{C}/\text{min}$ in einem Bereich von $20\text{-}105^\circ\text{C}$ bei einer Wellenlänge von 218 nm gemessen (Abbildung 3-10). In den Spektren ist der Bereich zwischen 70 und 100°C bzw. zwischen 70 und 105°C dargestellt, da unter 70°C das Spektrum nahezu ohne Signaländerung verläuft.

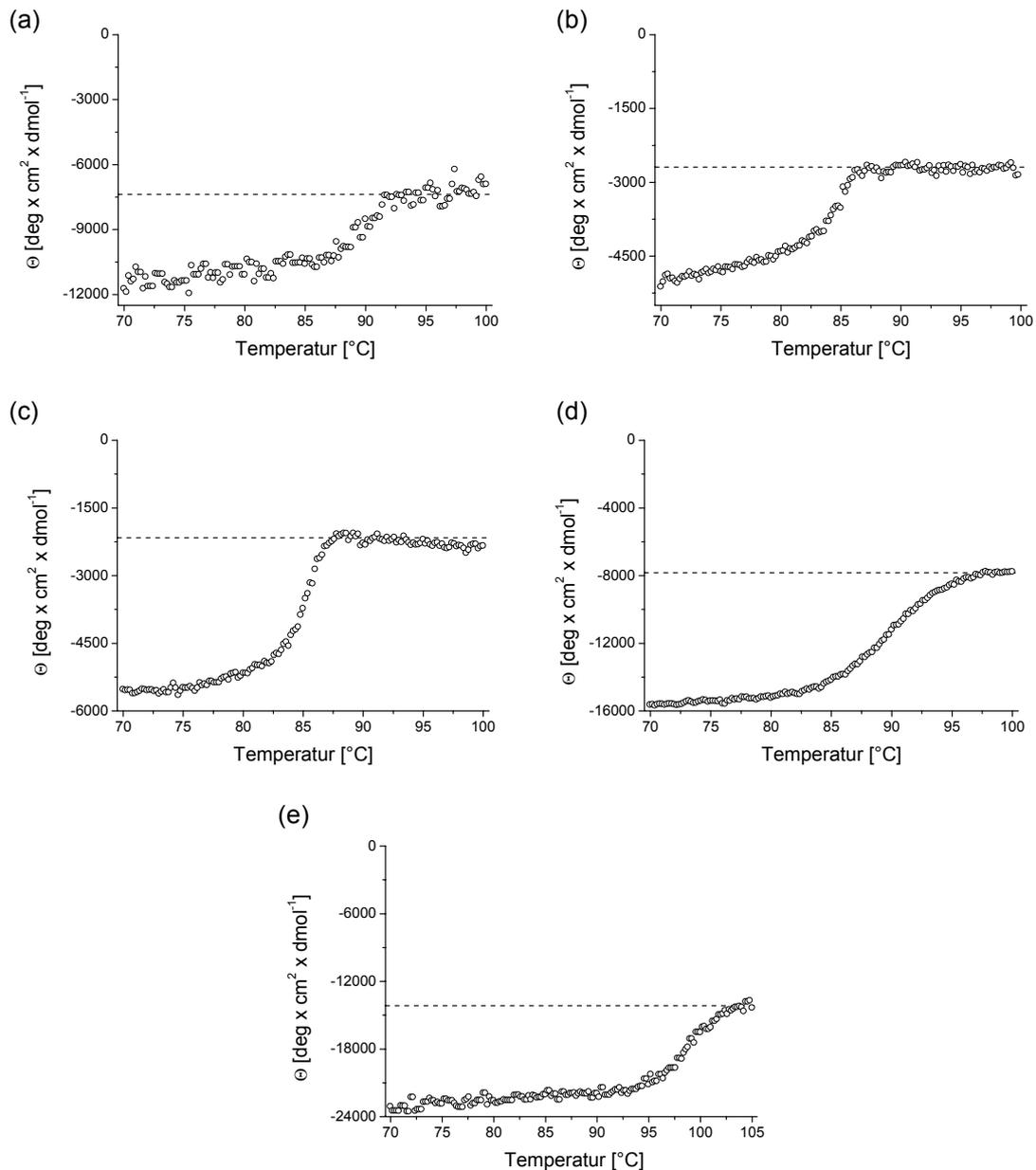


Abbildung 3-10: Thermische Entfaltung von (a) ORF904, (b) N371, (c) N371K752, (d) K752G844 und (e) N40C370. Aufgetragen ist die molare Elliptizität pro Aminosäurerest in $\text{deg} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$ in Abhängigkeit von der Temperatur in $^\circ\text{C}$. Die Übergänge wurden anhand der Änderung des CD-Signals bei 218 nm mit einer Heizrate von 1°C min^{-1} gemessen. Die Spektren wurden mit $1,5; 3,0; 4,0; 16,0$ bzw. $5,0\ \mu\text{M}$ Protein in $1\times\text{PBS}$ bei einer Schichtdicke von $0,1\text{ mm}$ und einer Bandbreite von $1,0\text{ nm}$ (Dämpfung 1 s) gemessen. Die aus den Spektren erhaltenen Schmelzpunkte sind in Tabelle 3-4 aufgeführt.

In Tabelle 3-4 sind die ermittelten apparenten Schmelzpunkte des Wt und der Deletionsmutanten aufgelistet. Hierbei wurde der Temperaturwert bestimmt, der bei 50% zwischen niedrigstem (0%) und höchstem (100%) Wert der molaren Elliptizität pro Aminosäurerest lag. N40C370 weist mit ~98°C den höchsten Schmelzpunkt auf. Es folgen der Wt mit ~90°C, K752G844 mit ~89°C, N371 mit ~84°C und N371K752 mit ~85°C. Die Schmelztemperaturen von ORF904 und seinen Varianten liegen mit etwa 84-90°C relativ nahe beieinander. Die Ausnahme bildet die isolierte Primasedomäne mit einem Schmelzpunkt von etwa 100°C. Dies ist möglicherweise darin begründet, dass die isolierte Primasedomäne kompakter vorliegt als in Verbindung mit den anderen Domänen zusammen und dadurch ihre Oberfläche verkleinert ist, wodurch ihre Thermostabilität erhöht wäre.

Tabelle 3-4: Ermittelte apparente Schmelzpunkte von ORF904, N371, N371K752, N40C370 und K752G844.

Protein	T _M -Wert [°C]
ORF904	90
N371	84
N371K752	85
N40C370	98
K752G844	89

Die Schmelzpunkte von Proteinen einer Vielzahl thermophiler Organismen liegen zwischen etwa 70 und 180°C (Kumar & Nussinov, 2001). Die hier ermittelten Werte lassen sich gut in diesen Bereich einordnen. Die Tolerierung hoher Temperaturen durch diese Proteine ist auf eine Vielzahl von Eigenschaften wie höhere Hydrophibizität, kompaktere Packung, kürzere *Loops* mit höherem Anteil Prolin (Haney *et al.*, 1997), kleinere und weniger Kavitäten, geschützte Oberflächenvergrößerung durch Multimerisierung (Salminen *et al.*, 1996), Reduzierung thermolabiler Aminosäurereste (Russell *et al.*, 1997), einen erhöhten Anteil helikaler Strukturen, mehr Wasserstoffbrückenbindungen und mehr Salzbrücken durch polare Aminosäurereste an der Oberfläche (Kumar *et al.*, 2000) zurückzuführen. Der Unterschied in den Schmelzpunkten der untersuchten Proteine ergibt sich durch ein Wegfallen, eine Akkumulation und/oder eine gegenseitige Verstärkung dieser Eigenschaften. Die hohen Schmelzpunkte unterstreichen den thermophilen Charakter der untersuchten Proteine und deuten mit den CD-Spektren zusammen darauf hin, dass die Deletionsmutanten sich in eigenständige, stabile Domänen falten.

3.1.3 Die Quartärstruktur

3.1.3.1 Sedimentationsanalysen

Es wurden Sedimentationsanalysen und Gelfiltrationschromatographie durchgeführt, um den Oligomerisierungszustand von ORF904 aufzuklären (Lipps, unveröffentlicht). Von der Gelfiltrationssäule eluierte das Protein als Monomer. Für die SF3-Helikase BPV E1 konnte in Gegenwart von DNA die hexamere Form des Proteins im Glyceringradienten nachgewiesen werden (Fouts *et al.*, 1999). Die Sedimentationsanalyse von ORF904 mit dem Glyceringradienten zeigt deutlich, dass das Protein in Lösung ein Monomer ist. Selbst wenn die Ultrazentrifugation (UZ) in

Gegenwart von ATP oder AMP-PnP und Einzel- oder Doppelstrang-DNA durchgeführt wurde, war es nicht möglich, ein multimeres Protein zu identifizieren.

Um zu überprüfen ob die Prim/Pol-Domäne eine Multimerisierung des Wt auf dem Gradienten möglicherweise erschwert oder verhindert, wurde die Helikasedomäne N371 ebenfalls einer Ultrazentrifugation unterzogen (Abbildung 3-11). Da möglicherweise die Bindung zwischen den Monomeren zu schwach war, um einer UZ standzuhalten, wurden die Proben mittels 0,15% Glutaraldehyd einem chemischen *Crosslink* unter limitierenden Bedingungen unterzogen (2.3.10.10). Um die Bildung eines Multimers zu stabilisieren war auch im Glyceringradienten Glutaraldehyd enthalten (Kastner *et al.*, 2008). Es konnte aber auch hier nur das Monomer nachgewiesen werden. Für die Untersuchung von BPV E1 wurde im Gegensatz zur Untersuchung von ORF904, für das der Replikationsursprung noch nicht bekannt ist, DNA verwendet, die Sequenzbestandteile des Replikationsursprungs enthielt (Fouts *et al.*, 1999). An dieser Stelle sei jedoch erwähnt, dass für E1 auch eine sequenzspezifische Multimerisierung nachgewiesen wurde (Sedman & Stenlund, 1998). Es kann jedoch sein, dass für ORF904 und N371 erst ein DNA-Substrat mit der Replikationsursprungssequenz von pRN1 eine spezifische, stabile Bindung an die DNA gewährleistet, die ein Nachweis des Multimers im Gradienten möglich machen würde, wie es auch für die SF3-Helikase AAV Rep68 der Fall ist (Mansilla-Soto *et al.*, 2009).

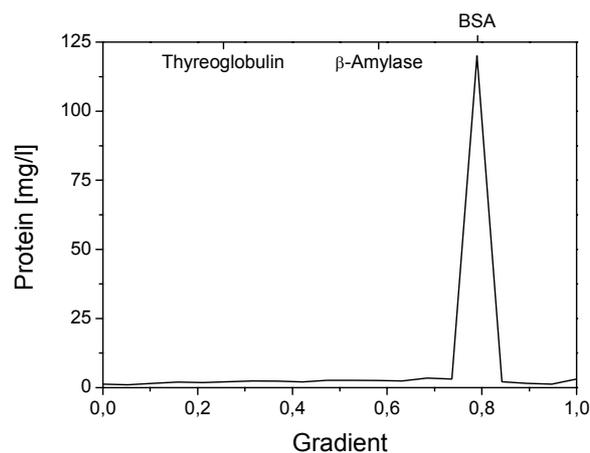


Abbildung 3-11: Glyceringradientenzentrifugation von N371. (a) Graphische Darstellung der Proteinkonzentration in mg/l in Abhängigkeit der relativen Gradientenkonzentration. Der Ansatz mit 11 μM Protein in 1x PBS, 10 mM MgCl_2 und 2 μM dsOligodesoxynukleotid (49 bp) wurde für 30 min bei 60°C inkubiert. Als *Crosslinker* wurden 0,15% (v/v) Glutaraldehyd verwendet. Als Referenz diente ein Ansatz mit 50 μg BSA, β -Amylase und Thyreoglobulin ohne Glutaraldehyd. Die Zentrifugation im Glyceringradienten (17-34%) wurde für 16 h bei 10°C und 40000 rpm/min durchgeführt.

3.1.3.2 *Crosslink*

Um zu überprüfen ob der *Crosslink* vor der Glyceringradientenzentrifugation zur Bildung höherer Oligomerisierungszustände von N371 führte, wurden die Proben von N371 nach dem *Crosslink* mit 0,2% Glutaraldehyd unter limitierenden Bedingungen direkt auf ein 9%-iges PAA-Gel geladen. Eine Multimerisierung von N371, wie sie für SF3-Helikasen typisch ist (Hickman & Dyda, 2005), ließ sich jedoch nur bedingt nachweisen.

In Abbildung 3-12 ist in den Spuren 3-5 zwischen 116 kDa und 170 kDa eine Bande zu erkennen, die der Größe eines Dimers (128,8 kDa) entsprechen könnte. Zwischen 170 kDa und 212 kDa ist in den

Spuren 1, 2, 4 und 5 deutlich und in Spur 3 weniger deutlich eine Bande zu sehen, die von ihrem Molekulargewicht einem Trimer (193,2 kDa) entsprechen könnte. Über 212 kDa, in den Geltaschen, sind in allen 5 Spuren ebenfalls Banden zu erkennen, die vermutlich höhere Oligomerisierungszustände darstellen. Eine spezifische von ssDNA, dsDNA, ATP oder AMP-PnP abhängige Oligomerisierung ließ sich jedoch nicht zeigen.

Bei vergleichbaren Untersuchungen mit BPV E1 konnten höhere Multimerisierungszustände nur in Gegenwart eines DNA-Substrats mit Replikationsursprungssequenz nachgewiesen werden (Fouts *et al.*, 1999). Und auch in *Crosslink*-Experimenten mit Rep78 konnten nur in Gegenwart spezifischer Replikationsursprungs-DNA Oligomere nachgewiesen werden (Smith *et al.*, 1997). Möglicherweise ließ sich die Oligomerisierung für N371 auf Grund des Fehlens der Replikationsursprungssequenz von pRN1 im verwendeten DNA-Substrat, wie im Fall der Sedimentationsanalyse, nicht eindeutig nachweisen. Dennoch lässt sich anhand des *Crosslinks* unter limitierenden Bedingungen erahnen, dass N371 das Potential besitzt, höhere Oligomerisierungszustände anzunehmen.

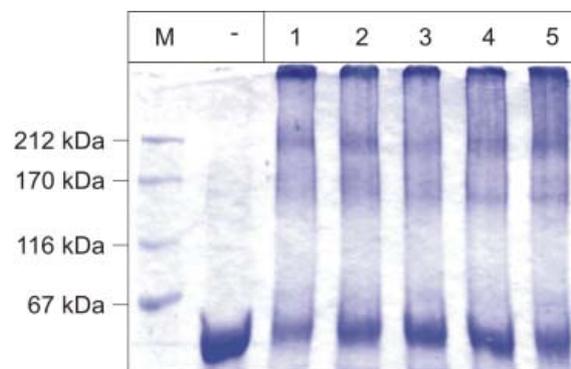


Abbildung 3-12: Glutaraldehyd-*Crosslink* mit N371 (64,4 kDa). 12 μ M Protein in 1x PBS-Puffer mit 2 mM $MgCl_2$ wurden in Abwesenheit bzw. Gegenwart von 2 μ M ss- bzw. dsOligodesoxynukleotid (49bp) und 1 mM ATP für 30 min bei 60°C inkubiert. Durch Zugabe von 0,2% (v/v) Glutaraldehyd (GA) wurde der *Crosslink* für 5 min bei RT durchgeführt. Als Kontrollen dienten N371 und mit GA *gecrosslinktes* N371. Zu sehen sind in Spur M: Laborstandard; Spur -: Protein; Spur 1: Protein + GA; Spur 2: Protein + ssDNA + GA; Spur 3: Protein + dsDNA + GA; Spur 4: Protein + ssDNA + ATP + GA und Spur 5: Protein + dsDNA + ATP + GA.

3.1.3.3 Elektronenmikroskopie

Da Gelfiltrationsanalysen, Sedimentationsanalysen und *Crosslink*-Experimente keinen eindeutigen Aufschluss über die Multimerisierung von ORF904 lieferten, wurde das Protein mittels Cryo-TEM und TEM in Gegenwart von dsDNA und AMP-PnP untersucht. Wie in Abbildung 3-13 (a) zu sehen ist, lassen sich etwa 15 nm große Partikel identifizieren. Ebenso konnten diese Partikel für die Deletionsmutante N371 (Abbildung 3-13 (b)) nachgewiesen werden, jedoch nicht für N527 oder wenn DNA oder AMP-PnP im Ansatz fehlten. Dies deutet darauf hin, dass der Bereich zwischen Aminosäure 371 und Aminosäure 527 nicht nur für die Verlängerung eines Primers (Beck & Lipps, 2007) sondern auch wie für andere SF3-Helikasen für die Multimerisierung von zentraler Bedeutung zu sein scheint (Hickman & Dyda, 2005) und dass diese vermutlich für ORF904 nur in Gegenwart von DNA und ATP bzw. einem ATP-Analogen stattfindet. SV40 L Tag hingegen benötigt nur ATP bzw. ein ATP-Analogen, um in Abwesenheit von DNA zu hexamerisieren (San Martin *et al.*, 1997) und BPV E1

hexamersiert in Gegenwart von DNA, aber nicht wenn nur ATP im Ansatz enthalten ist (Fouts *et al.*, 1999).

Die Überlagerung einzelner mit Uranylformiat kontrastierter Partikel (Abbildung 3-13 (c)-(e)) ergab, dass es sich dabei um ringförmige Strukturen mit einer Sechsfachsymmetrie handelt. Vermutlich handelt es sich bei diesen Partikeln um ORF904 und N371, die mit Hilfe des nicht hydrolysierbaren ATP-Analogons AMP-PnP Hexamere um die DNA ausgebildet haben. Da sich diese Komplexe weder in dem Gelfiltrations- noch in dem Sedimentationsexperiment nachweisen lassen, ist diese Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten vermutlich ziemlich schwach.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten letztlich Aufschluss über die Quartärstruktur von ORF904 und N371 geben, welche mit der anderer SF3-Helikasen wie z.B. BPV E1 und SV40 L Tag übereinstimmt (Fouts *et al.*, 1999; San Martin *et al.*, 1997).

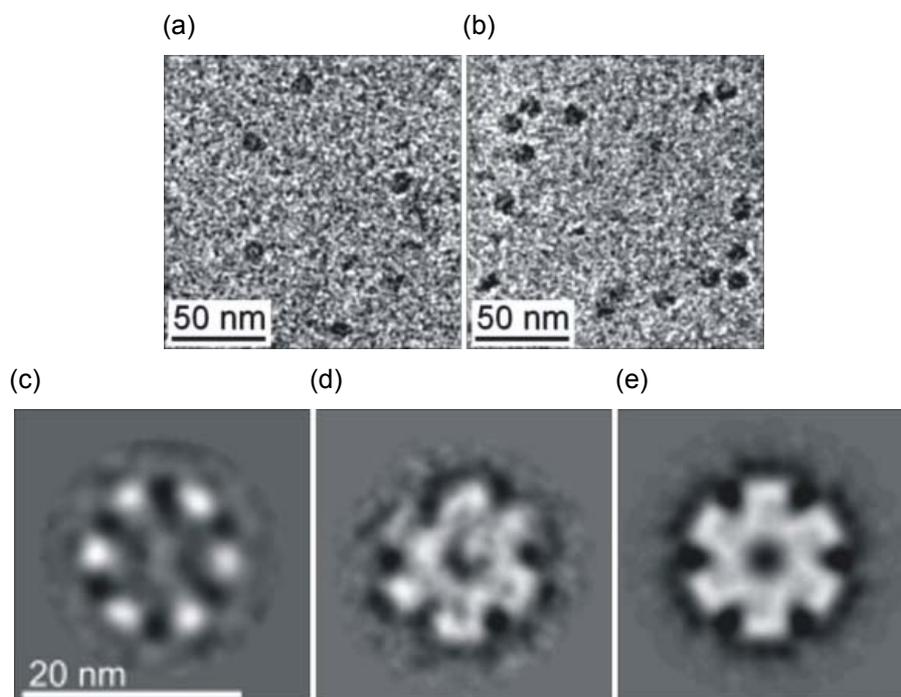


Abbildung 3-13: Cryo-TEM-Aufnahmen von ORF904 und N371. (a) In den Proben waren 0,5 μM ORF904, 0,5 μM dsOligodesoxynukleotid (49 bp), 1 mM AMP-PnP, 10 mM MgCl_2 , 25 mM K-Phosphat und 150 mM KCl enthalten. Zu erkennen sind Partikel von etwa 15 nm Durchmesser. (b) wie (a), aber mit 0,5 μM N371. (c)-(e) Einzelpartikelanalysen der negativ gefärbten Protein-DNA-Komplexe. Zu sehen sind (c) das *eigenimage*, (d) das *first classum* und (e) das *first classum* unter der Annahme einer Sechsfachsymmetrie.

3.2 Enzymatische Aktivitäten der Helikasedomäne

3.2.1 Die ATPase-Aktivität

3.2.1.1 ATPase-Aktivität für unterschiedliche DNA-Substrate

Um die ATPase-Aktivität von ORF904 zu überprüfen, wurde das Protein in Gegenwart von radioaktivem γ -[³²P]-ATP inkubiert. Das durch die ATP-Hydrolyse freiwerdende radioaktive anorganische Phosphat wurde mittels Dünnschichtchromatographie (DC) vom restlichen γ -[³²P]-ATP getrennt und mit dem Instantlmager autoradiographisch analysiert (Abbildung 3-14).

Es war bereits bekannt, dass die ATPase-Aktivität von ORF904 durch Doppelstrang-DNA stark (10fach), durch Einzelstrang-DNA nur schwach (2-3fach) und durch RNA gar nicht stimuliert wird (Lipps *et al.*, 2003). Die SF3-Helikase Rep40 von AAV2 zeigt ähnlich wie ORF904 eine 8fach erhöhte ATPase-Aktivität in Gegenwart von dsDNA, die für Rep40, aber auch für ssDNA gezeigt werden konnte (Yoon-Robarts *et al.*, 2004). Die SF3-Helikase E1 aus BPV wird durch ssDNA stimuliert (2,5fach), durch dsDNA aber gar nicht (Santucci *et al.*, 1995). Ebenso wird die SF3-Helikase des P4 α -Proteins durch ssDNA stimuliert (Ziegelin *et al.*, 1993), und auch die NTPase-Aktivität der hexameren Helikasedomäne des T7Gen4-Proteins (SF4-Helikase) ist in Gegenwart von ssDNA 10mal höher als ohne oder mit dsDNA (Bernstein & Richardson, 1989). Die Aktivität von *E. coli* RuvB (SF6-Helikase) wird durch ssDNA und lineare dsDNA kaum, jedoch durch zirkuläre dsDNA extrem stimuliert (Marrione & Cox, 1995). MCM aus *M. thermotrophicus* zeigt in Gegenwart von Φ X174-ssDNA eine etwa 13fach erhöhte und in Gegenwart von kurzer ssDNA und dsDNA eine etwa 11fach erhöhte ATPase-Aktivität (Kelman *et al.*, 1999). Das eukaryotische MCM4,6,7 zeigt hingegen in Gegenwart von dsDNA so gut wie keine Erhöhung seiner ATPase-Aktivität (Ishimi, 1997). Diese Ergebnisse veranschaulichen, dass die ATPase-Aktivität stimulierenden Nukleinsäuresubstrate von Helikasen, selbst wenn sie derselben Superfamilie angehören, ganz unterschiedlich sein können.

Alle hier genannten Helikasen bilden hexamere Ringstrukturen aus, welche die DNA umschließen. Diese Ringstrukturen sind aber auch bei anderen an der Replikation beteiligten Proteinen zu finden und bieten den Vorteil, dass das Protein mit der DNA einen geschlossenen Komplex bildet, was die Dissoziation des Proteins von der DNA erschwert. In Wechselwirkung mit der entsprechenden Polymerase kann der Protein-DNA-Komplex die Prozessivität der Polymerase erhöhen. Eine hohe Prozessivität ist gerade bei der Replikation von entscheidender Bedeutung.

Da SF3-Helikasen hexamere Ringe ausbilden (Hickman & Dyda, 2005), war es von Interesse herauszufinden, ob ORF904 lange zirkuläre oder kurze lineare DNA als Substrat bevorzugt. Das lange Substrat ermöglicht es, die Prozessivität des Enzyms im Vergleich zum kurzen Substrat zu erforschen, auf dem sich die Helikase nur ein kurzes Stück fortbewegen kann, dann abfallen muss und eine erneute Bindung und Assemblierung an die DNA erfolgen muss. Beide Substrate stimulierten die ATPase-Aktivität von ORF904 gleich stark. Selbst unter limitierenden DNA-Konzentrationen (Abbildung 3-14 (b), hellgrau), unter denen die erneute Bindung an die DNA vermutlich der langsamste Schritt ist, wurde die längere Plasmid-DNA nicht bevorzugt. Unter diesen Bedingungen würde eine Helikase mit hoher Prozessivität in Gegenwart eines Plasmids eine höhere ATPase-Aktivität zeigen als mit kurzer linearer DNA. Im Vergleich hierzu zeigen die Helikasen MCM von *M.*

thermautotrophicus, SV40 L Tag und AAV Rep68 für die Entwindung von Substraten mit einer Länge von 500, 1200 und 1371 Basenpaaren sehr hohe Prozessivitäten (Shechter *et al.*, 2000; Wiekowski *et al.*, 1988; Zhou *et al.*, 1999). Es ist also davon auszugehen, dass ORF904 keine hohe Prozessivität besitzt, wie man sie für eine replikative Helikase erwarten würde.

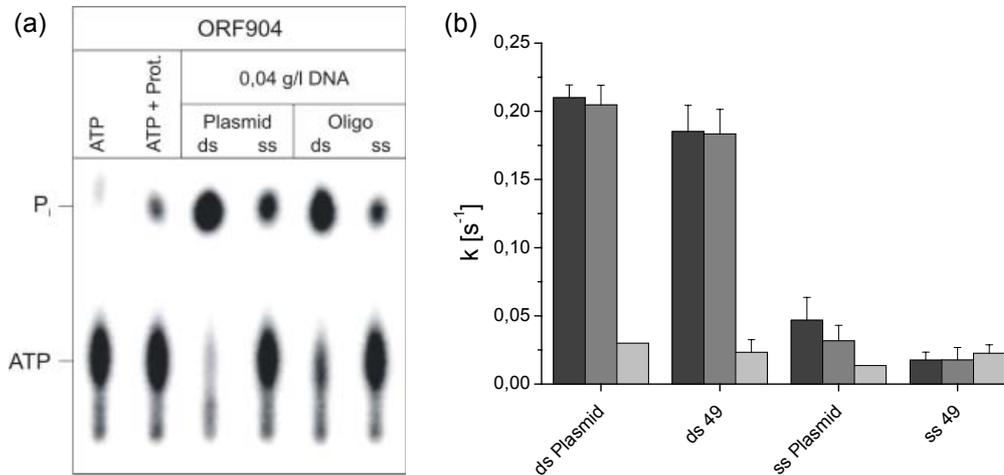


Abbildung 3-14: ATPase-Aktivität von ORF904 in Gegenwart unterschiedlicher DNA-Substrate. (a) Repräsentative DC der ATPase-Reaktionen von ORF904, die sich aus 0,5 μ M Protein, 0,2 mM ATP, 2,0 nM γ - 32 P]-ATP und 0,04 g/l ss- bzw. dsPlasmid (8311 bp) oder Oligodesoxynukleotid-DNA (49 bp) zusammensetzten. Die Ansätze wurden für 20 min bei 80°C inkubiert. Als Kontrollen dienten reines γ - 32 P]-ATP (Spur ATP) und γ - 32 P]-ATP in Gegenwart von Protein (Spur ATP + Prot.). (b) Graphische Darstellung der ATPase-Aktivität k in s^{-1} in Gegenwart von 0,04 g/l DNA (dunkelgrau), 0,01 g/l DNA (grau) und 0,001 g/l DNA (hellgrau). Zu sehen sind die Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Messungen mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

3.2.1.2 Bestimmung von K_M und k_{cat} für ATP und DNA

Die ATPase-Aktivität wurde in Gegenwart von definierten kurzen Einzel- und Doppelstrang-DNA-Substraten, mit variierenden DNA- und ATP-Konzentrationen quantifiziert (Abbildung 3-15 und 3-16). Für die Stimulierung mit Doppelstrang-DNA ergab sich für die ATPase-Aktivität ein 10x höherer Wert im Vergleich zur Einzelstrang-DNA. Die halbmaximale Konzentration konnte mit etwa 70 nM für dsDNA und 0,4 mM für ATP bestimmt werden. Die Wechselzahl für ATP ergab sich zu 0,7 s^{-1} .

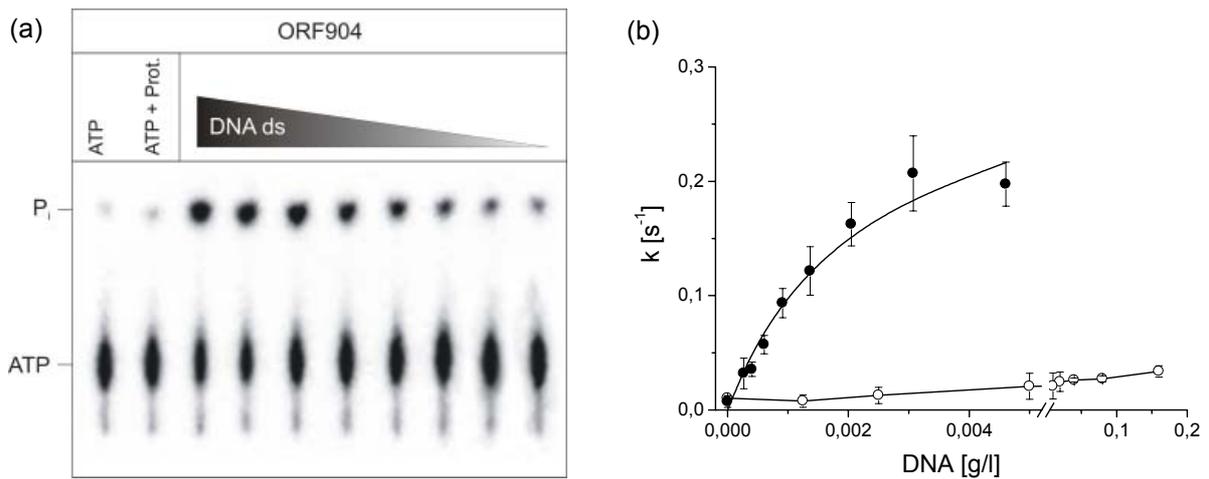


Abbildung 3-15: Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante von ORF904 für dsDNA (49 bp) (a) Repräsentative DC der ATPase-Reaktion von ORF904 mit abnehmenden dsDNA-Konzentrationen (0,0046–0 g/l), 0,5 μ M Protein, 0,16 mM ATP und 2,0 nM γ - ^{32}P -ATP. Die Ansätze wurden für 20 min bei 80°C inkubiert. Als Kontrollen dienten reines γ - ^{32}P -ATP (Spur ATP) und γ - ^{32}P -ATP in Gegenwart von Protein (Spur ATP + Prot.). (b) Graphische Darstellung der ATPase-Aktivität in Abhängigkeit der DNA-Konzentration für ssDNA (weiße Kreise) und für dsDNA (schwarze Kreise). Zu sehen sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen mit den dazugehörigen Standardabweichungen. Die Linie repräsentiert den Angleich der experimentellen Daten an die Michaelis-Menten-Gleichung. Aus diesen Daten wurde der K_M ermittelt.

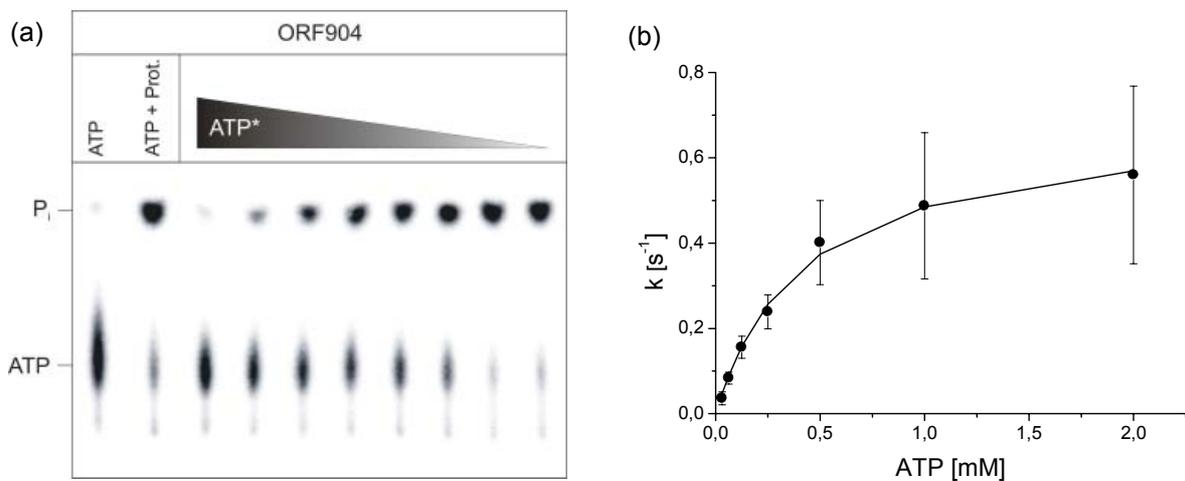


Abbildung 3-16: Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante und der Wechselzahl von ORF904 für ATP. (a) Repräsentative DC der ATPase-Reaktion von ORF904, mit abnehmenden ATP-Konzentrationen (2–0 mM), 0,5 μ M Protein, 0,04 g/l DNA (49 bp) und 2,0 nM γ - ^{32}P -ATP. Die Ansätze wurden für 20 min bei 80°C inkubiert. Als Kontrollen dienten reines γ - ^{32}P -ATP (Spur ATP) und γ - ^{32}P -ATP in Gegenwart von Protein und dsDNA (Spur ATP + Prot.). (b) Graphische Darstellung der ATPase-Aktivität in Abhängigkeit der ATP-Konzentration. Zu sehen sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen mit den dazugehörigen Standardabweichungen. Die Linie repräsentiert den Angleich der experimentellen Daten an die Michaelis-Menten-Gleichung. Aus diesen Daten wurden der K_M und k_{cat} ermittelt.

In Tabelle 3-5 sind die K_M - und k_{cat} -Werte von ORF904 und einigen hexameren Helikasen in Gegenwart der entsprechenden DNA-Substrate aufgelistet. Es ist nur bedingt möglich, die Werte miteinander zu vergleichen. Dies ist unter anderem auf die Bedingungen, unter denen diese Werte ermittelt wurden, zurückzuführen, die stark von denen für ORF904 abweichen, so dass selbst für ein und dieselbe Helikase sehr unterschiedliche Werte ermittelt wurden. Dennoch ist festzuhalten, dass der K_M - und k_{cat} -Wert von ORF904 in der Größenordnung anderer hexamerer Helikasen liegt.

Tabelle 3-5: K_M - und k_{cat} -Werte für ATP von ORF904 und anderen hexameren Helikasen in Gegenwart des entsprechenden Substrats.

Protein	K_M [μ M]	k_{cat} [s^{-1}]	Substrat	Referenz
ORF904	400	0,7	dsDNA	/
BPV E1	750	0,05	ohne	(Santucci <i>et al.</i> , 1995)
BPV E1	375	0,05	ssDNA	(Santucci <i>et al.</i> , 1995)
BPV E1	200	/	ohne	(Yang <i>et al.</i> , 1993)
BPV E1	1100	/	ohne	(MacPherson <i>et al.</i> , 1994)
BPV E1 (C-Terminus 300 AS)	30	0,16	ohne	(Castella <i>et al.</i> , 2006b)
BPV E1 (C-Terminus 300 AS)	30	0,28	ssDNA	(Castella <i>et al.</i> , 2006b)
SV40 L Tag	270	0,3	ohne	(Greenleaf <i>et al.</i> , 2008)
SV40 L Tag	270	2,4	ssDNA	(Greenleaf <i>et al.</i> , 2008)
Sso MCM	50-60	0,22	ohne	(Pucci <i>et al.</i> , 2007)
Sso MCM	0,28	0,051	ohne	(Brewster <i>et al.</i> , 2008)
Sso MCM	1,9 \pm 1,2	0,068	3' und 5'	(Brewster <i>et al.</i> , 2008)

3.2.1.3 ATPase-Aktivität der Deletionsmutanten

In Abbildung 3-17 sind die ATPase-Aktivität der Deletionsmutanten für ein ss- bzw. dsOligodesoxynukleotid (49 bp) und deren relative Aktivität zum Wildtyp zu sehen.

Die Helikasedomäne N371, die Deletionsmutante, die ORF904 ohne Prim/Pol-Domäne darstellt, zeigte gegenüber dem Wt eine leicht erhöhte Aktivität für dsDNA und eine etwa 11fach erhöhte Aktivität für ssDNA. Die erhöhte ATPase-Aktivität von N371 für ssDNA ist vermutlich im Verlust der Prim/Pol-Domäne zu suchen. Diese bindet beim Wt die ssDNA und behindert so die ATPase-Aktivität der Helikasedomäne auf ssDNA. Dies ist mit der ATPase-Aktivität der SF3-Helikase des P4 α -Proteins zu vergleichen, bei der trotz Verlust der Primasedomäne die ATPase-Aktivität erhalten bleibt (Ziegelin *et al.*, 1995; Ziegelin *et al.*, 1997). Fehlt die Prim/Pol-Domäne, wie bei N371 und den anderen Deletionsmutanten, so scheint die Helikasedomäne auch in Gegenwart von ssDNA stärker ATPase-aktiv zu sein.

N371K752, die Helikasedomäne ohne vermeintliche Winged-Helix-DNA-Bindedomäne, besitzt eine stark reduzierte ATPase-Aktivität, die für ssDNA stärker ausgeprägt ist als für dsDNA. Diese ist vermutlich auf das Fehlen der Winged-Helix-DNA-Bindedomäne zurückzuführen, die einen großen Beitrag zur DNA-Bindung leistet (3.2.4.2.2)- also ähnlich wie beim P4 α -Protein, wo die C-terminale Replikationsursprungsbindedomäne zu einem Verlust der ATPase-Aktivität führt (Ziegelin *et al.*, 1997).

N450 zeigte für dsDNA eine um etwa den Faktor 5 niedrigere Aktivität und für ssDNA eine ca. doppelt so hohe Aktivität. Bei N475 war die Aktivität für die dsDNA um einen Faktor 10 zurückgegangen, während die Aktivität für die ssDNA leicht erhöht war.

N527 zeigte für die dsDNA etwa ein 20stel der Aktivität des Wt, während die Aktivität für die ssDNA leicht erhöht war. Es ist deutlich zu erkennen, dass mit der Verkürzung des Bereichs zwischen Aminosäure 371 und Aminosäure 527 ein starker Verlust der ATPase-Aktivität für dsDNA einherging. Wie bei der Elektronenmikroskopie der Probe von N527, bei der sich keine Partikel finden ließen, führte der Verlust der wahrscheinlichen Multimerisierungsdomäne, die bei SF3-Helikasen in diesem Bereich liegt (Hickman & Dyda, 2005), zu dem starken Rückgang der ATPase-Aktivität. Dies würde im Einklang mit dem Mechanismus von SF3-Helikasen stehen, bei denen die Hexamerisierung die Voraussetzung für die Argininfinger bildet, entscheidend an der ATP-Hydrolyse in benachbarten Untereinheiten mitzuwirken (Enemark & Joshua-Tor, 2008; Ogura *et al.*, 2004).

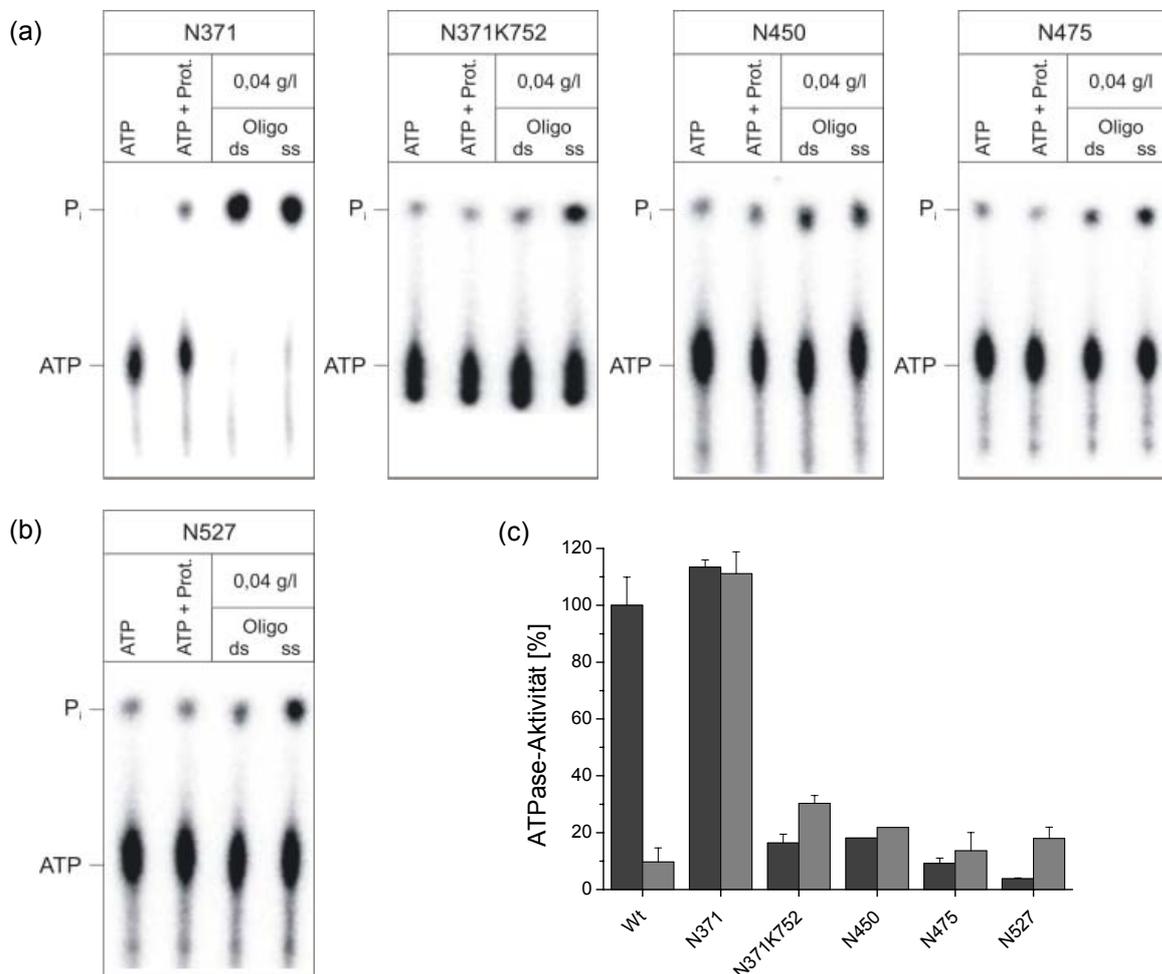


Abbildung 3-17: ATPase-Aktivität der Deletionsmutanten von ORF904. (a und b) Repräsentative DC der ATPase-Reaktionen der Deletionsmutanten, die sich aus 0,5 μ M Protein, 0,2 mM ATP, 2,0 nM γ - 32 P]-ATP und 0,04 g/l ss- bzw. dsOligodesoxynukleotid-DNA (49 bp) zusammensetzten. Die Ansätze wurden für 20 min bei 80°C inkubiert. Als Kontrollen dienten reines γ - 32 P]-ATP (Spur ATP) und γ - 32 P]-ATP in Gegenwart von Protein (Spur ATP + Prot.). (c) Graphische Darstellung der ATPase-Aktivität der Deletionsmutanten in Gegenwart von dsDNA (dunkelgrau) und ssDNA (grau). Die Aktivität ist relativ zur ATPase-Aktivität des Wt mit dsDNA angegeben. Zu sehen sind die Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Messungen mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

3.2.1.4 ATPase-Aktivität der Punktmutanten

Um die ATPase-Aktivität der Punktmutanten von ORF904 zu untersuchen, wurden wie zuvor schon für den Wt und die Deletionsmutanten radioaktive Dünnschichtchromatographien durchgeführt (Abbildung 3-18 (a)).

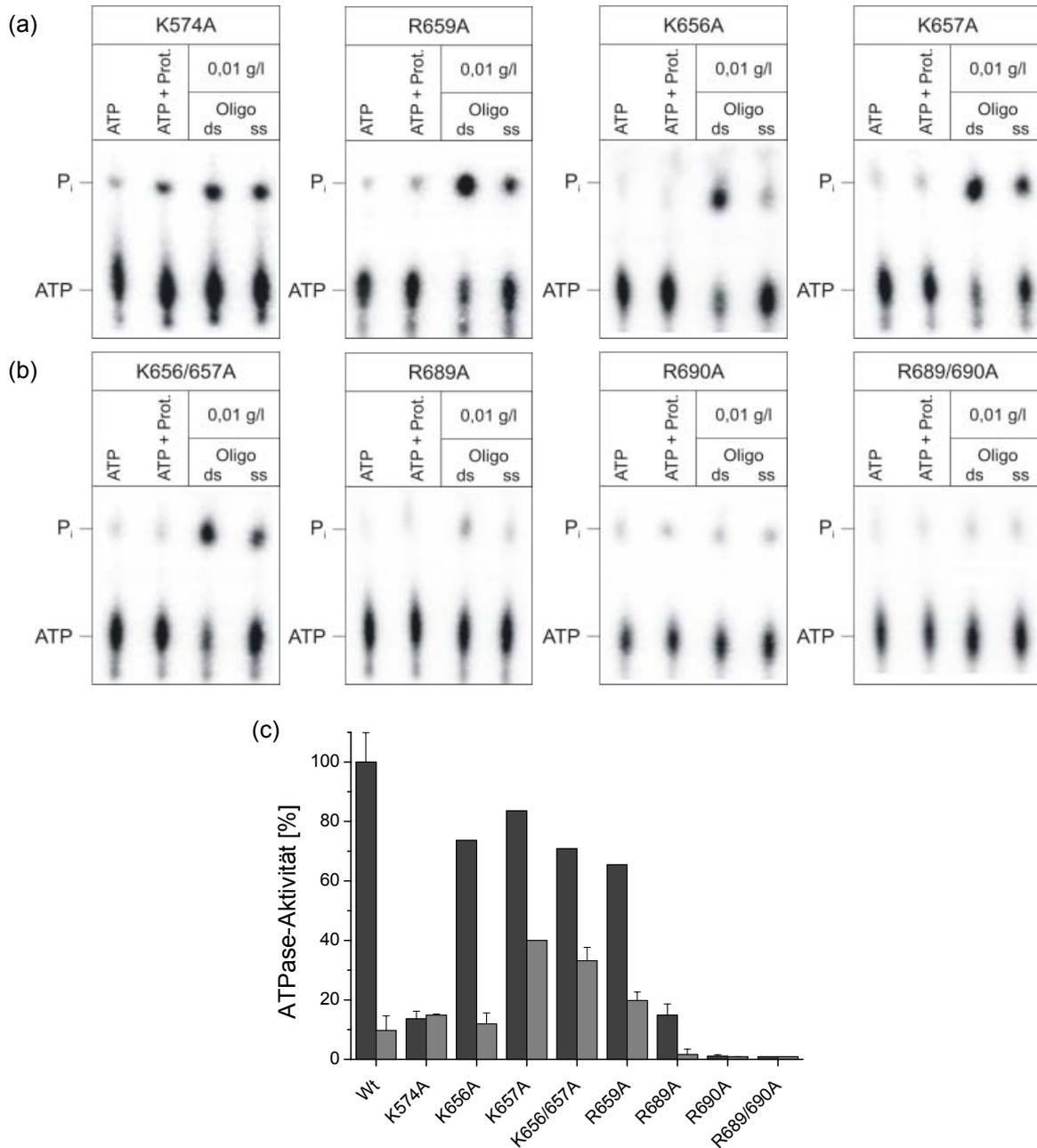


Abbildung 3-18: ATPase-Aktivität der Punktmutanten von ORF904. (a und b) DC der ATPase-Reaktionen der Punktmutanten, die sich aus 0,5 μ M Protein, 0,2 mM ATP, 2,0 nM γ - 32 P]-ATP und 0,01 g/l ss- bzw. dsOligodesoxynukleotid-DNA (49 bp) zusammensetzten. Die Ansätze wurden für 20 min bei 80°C inkubiert. Als Kontrollen dienten reines γ - 32 P]-ATP (Spur ATP) und γ - 32 P]-ATP in Gegenwart von Protein (Spur ATP + Prot.). (c) Graphische Darstellung der ATPase-Aktivität der Punktmutanten in Gegenwart von dsDNA (dunkelgrau) und ssDNA (grau). Die Aktivität ist relativ zur ATPase-Aktivität des Wt angegeben. Zu sehen sind die Mittelwerte aus bis zu 5 unabhängigen Messungen mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Die Alaninpunktmutante des vermeintlichen „Lysinfinfers“ K574 zeigte einen starken Rückgang in der ATPase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp (3-18 (b)). Dies ließ vermuten, dass dieser Aminosäurerest tatsächlich die Nukleotidbindetasche in *trans* kontaktiert und so entscheidend zur Funktion der Helikase beiträgt. Es stellte sich jedoch heraus, dass diese Punktmutante nur eine verminderte Translokationsaktivität im Vergleich zum Wt aufwies (3.2.2.2) und somit ihre Rolle für die Funktion der Helikase nicht kritisch scheint.

Die Punktmutanten des β -Hairpin K656A, K657A, K656/657A und R659A zeigten nur eine relativ geringe Abnahme der ATPase-Aktivität im Vergleich zum Wt. Dies lässt sich durch ihre räumliche Entfernung zur Nukleotidbindetasche erklären. Überraschend war aber die Tatsache, dass die Punktmutanten des β -Hairpin eine deutlich erhöhte ATPase-Aktivität für ssDNA im Vergleich zum Wt zeigten. Wie bereits erwähnt bildet die Hexamerisierung um die DNA die Voraussetzung für die Argininfinger, mit dem ATP einer benachbarten Untereinheit in Kontakt zu treten, um die ATP-Hydrolyse zu ermöglichen. Offensichtlich kann bereits der Austausch einer einzigen Aminosäure im β -Hairpin die Hexamerisierung in Gegenwart von ssDNA und die daraus folgende ATP-Hydrolyse bedeutend beeinflussen. Der kumulative Effekt des Austauschs von sechs Aminosäuren im Bereich der zentralen Pore scheint für dieses Phänomen verantwortlich zu sein.

Die Punktmutanten der vermeintlichen Argininfinger R689A, R690A und R689/690A zeigten gegenüber dem Wt eine stark reduzierte ATPase-Aktivität. R690A und die Doppelmutante waren nahezu nicht in der Lage, ATP zu hydrolysieren, wohingegen R689 ein wenig Restaktivität aufwies. Es scheint so, dass es sich bei R690 um den tatsächlichen Argininfinger handelt, während eine Mutation von R689 durch ihre räumliche Nähe zu R690 indirekt die ATP-Hydrolyse stört.

Ähnliche Ergebnisse wie für ORF904 und seine Punktmutanten wurden auch für SV40 L Tag gefunden. Die Mutation des homologen „Lysin-“ und des Argininfinfers führten auch hier zu einer starken Abnahme der ATPase-Aktivität, während Mutationen im β -Hairpin keinen großen Einfluss darauf hatten (Greenleaf *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007).

3.2.1.4.1 Komplementationsanalyse der Punktmutante R690A mit ORF904

Um zu untersuchen, welchen Effekt die Mutation des Argininfinfers auf die Kooperativität zwischen den Untereinheiten von ORF904 hat, wurde im ATPase-Experiment ein Mix aus Wildtypprotein und Punktmutante im Konzentrationsverhältnis 5 zu 6 bis 1 zu 6 eingesetzt (Abbildung 3-19).

Wie dem Graphen zu entnehmen ist, nimmt die ATPase-Aktivität des Wildtyps bei Zunahme des Anteils der ATPase-defekten Punktmutante im Ansatz linear ab. Bei vollständiger Kooperativität zwischen den Wt-Untereinheiten und den Untereinheiten der Punktmutante würde man eine exponentielle Abnahme der ATPase-Aktivität erwarten. Der lineare Kurvenverlauf deutet auf eine fehlende oder reduzierte Kooperativität zwischen den Wt-Untereinheiten und Punktmutanteuntereinheiten hin (Moreau *et al.*, 2007). Dabei sind zwei Möglichkeiten denkbar.

Bei der ersten Möglichkeit beeinflussen die Punktmutanteuntereinheiten, bei Ausbildung eines Heterohexamers aus Punktmutante- und Wt-Untereinheiten, die Aktivität der Wt-Untereinheiten nicht in dem Maße, dass die Aktivität des Enzyms komplett verloren geht. Vielmehr behalten die Untereinheiten des Wt im Heterohexamer ihre ATPase-Aktivität bei, wobei vermutlich die Position der Wt-Untereinheiten zu den anderen Untereinheiten im Multimer einen Einfluss auf ihre Aktivität hat. Ein

sequential model der ATP-Hydrolyse wie es für viele SF3-Helikasen angenommen wird (1.4), in welchem eine Untereinheit den ATP-Hydrolysezustand einer benachbarten Untereinheit reguliert, kommt hier nicht in Frage. Vielmehr muss hier ein *probabilistic model* angenommen werden, bei dem trotz Vorliegen defekter Untereinheiten im Multimer auf Grund eines hohen Maßes an Flexibilität des Enzyms seine Funktion, wenn auch mit geringerer Umsatzrate, weiterhin gewährleistet ist, wie man z.B. für die hexamere AAA⁺-Protease ClpX zeigen konnte (Martin *et al.*, 2005).

Bei der anderen Möglichkeit ist davon auszugehen, dass sich nur die Wildtypproteinmonomere zu Hexameren zusammenlagern können. Dies steht mit Ergebnissen aus Gelfiltrationschromatographieexperimenten der SF3-Helikase E1 im Einklang. Hier konnte gezeigt werden, dass der Austausch einer einzigen Aminosäure im Kernbereich der Helikasedomäne das Hexamerisierungsverhalten der Helikase empfindlich stören kann (Castella *et al.*, 2006a).

Vermutlich gilt nicht eine der beiden Möglichkeiten strikt, sondern es kommen ein reduziertes Hexamerisierungsverhalten der Punktmutante und eine reduzierte ATPase-Aktivität des Hexamers, bei Einbau von Punktmutanteuntereinheiten, gleichzeitig zum Tragen.

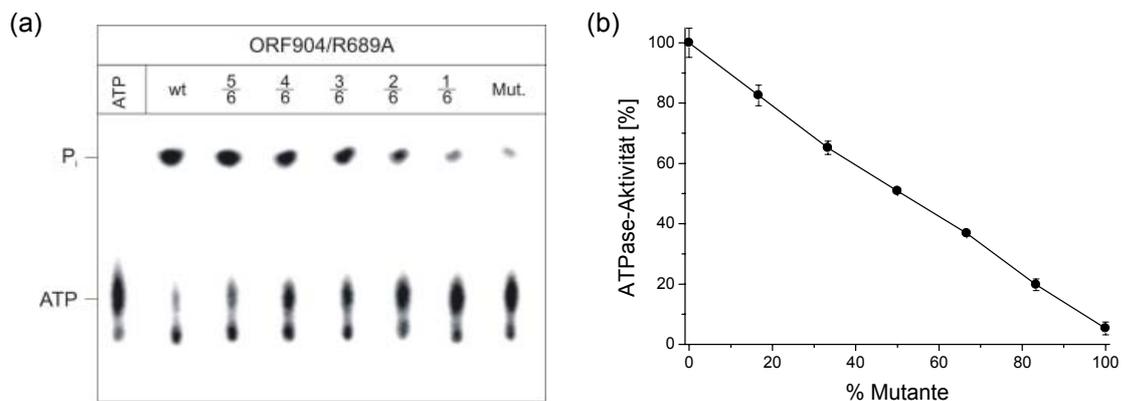


Abbildung 3-19: *Mutant doping*-Experiment mit der Argininfingermutante R690A.

(a) Repräsentative DC der ATPase-Reaktionen, bei denen 0,5 μ M der angegebenen Verhältnisse von Wt zur Punktmutante, 0,01 g/l dsDNA (49 bp), 0,2 mM ATP und 2,0 nM γ -[³²P]-ATP eingesetzt wurden. Die Ansätze wurden für 20 min bei 80°C inkubiert. Als Kontrollen diente reines γ -[³²P]-ATP (Spur ATP). (b) Graphische Darstellung der ATPase-Aktivität in Abhängigkeit des Proteinanteils der Punktmutante an der Proteingesamtkonzentration. Die Aktivität ist relativ zur ATPase-Aktivität des Wt angegeben. Zu sehen sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Messungen mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

3.2.2 Die Translokationsaktivität

3.2.2.1 Translokationsaktivität von ORF904 und den Deletionsmutanten

Um die Polarität von ORF904 zu bestimmen, wurden Biotin-Streptavidin-Verdrängungsversuche durchgeführt (Morris & Raney, 1999; Morris *et al.*, 2001; Shin & Kelman, 2006a). Als Substrat dienen Oligodesoxynukleotide, die am 3'- oder am 5'-Ende einen Biotinrest trugen und am 5'-Ende radioaktiv markiert waren. Die Substrate wurden erst mit Streptavidin und anschließend mit einem Überschuss Biotin inkubiert. Bei anschließender Inkubation mit einer ringförmigen Helikase wie ORF904 in Gegenwart von ATP sollte die Translokation der Helikase auf dem Substrat zu einem Verdrängen des Streptavidintetramers und zu einer Zunahme des Signals des freien radioaktiv markierten

Oligodesoxynukleotids führen. Mittels PAA-Gel wurden Substrat und freies Oligodesoxynukleotid voneinander getrennt und mit Hilfe des Instantlmagers analysiert. Die Translokation stellt den Prozentsatz an freiem Oligodesoxynukleotid im Ansatz dar. Die Nettotranslokation errechnete sich aus der Differenz der Translokation in Gegenwart und in Abwesenheit von ATP.

Wie in Abbildung 3-20 zu sehen, ist das Volllängenprotein in der Lage, das Streptavidin vom 5'-Ende, jedoch nicht vom 3'-Ende, zu verdrängen -und das auch nur auf ssDNA. Daraus folgt, dass das Protein in 3'-5'-Richtung auf Einzelstrang-DNA transloziert. Die Ergebnisse sind mit denen von SV40 L Tag vergleichbar, dessen 3'-5'-Translokationsaktivität ebenfalls mit dem Biotin-Streptavidin-Verdrängungsexperiment bestätigt wurde (Morris *et al.*, 2002). Somit konnte gezeigt werden, dass ORF904 die gleiche Polarität besitzt wie andere Superfamilie-3-Helikasen (Singleton *et al.*, 2007).

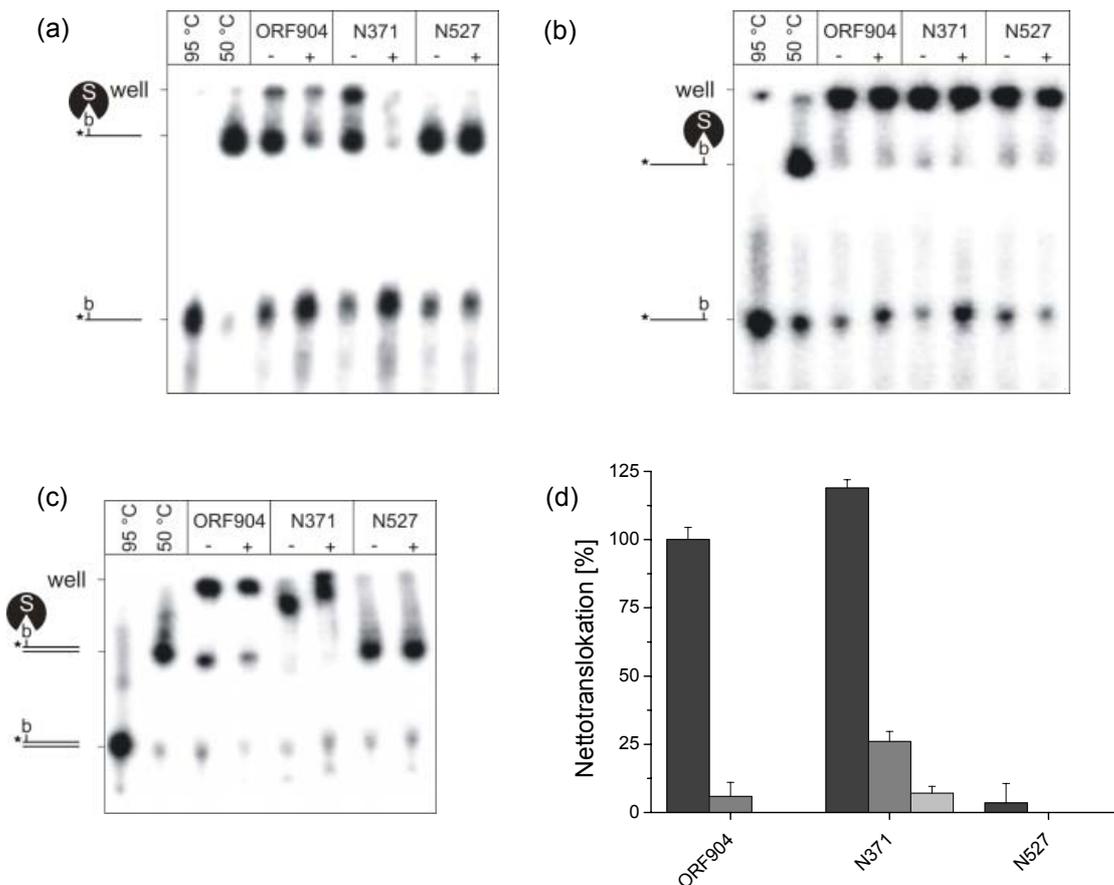


Abbildung 3-20: Translokationsaktivität von ORF904 und den Deletionsmutanten N371 und N527 auf unterschiedlichen DNA-Substraten. (a) Repräsentatives 8%-iges PAA-Gel der Translokationsreaktionen des Wt und der Deletionsmutanten in Abwesenheit (Spur -) und in Gegenwart von 2 mM ATP (Spur +). In den Ansätzen waren 0,5 μ M Protein und 6,5 μ M freies Biotin enthalten. Als Substrat wurden 10 nM eines am 5'-Ende biotinylierten Oligodesoxynukleotids (50 b) verwendet, das mit 32 P markiert und mit Streptavidin abgesättigt war. Die Ansätze wurden für 30 min bei 50°C inkubiert. Als Kontrolle diente das bei 95°C bzw. bei 50°C inkubierte Substrat. (b) wie (a), aber Oligodesoxynukleotid am 3'-Ende biotinyliert. (c) wie (a), aber Oligodesoxynukleotid mit Komplementärstrang zu Doppelstrang hybridisiert. (d) Graphische Darstellung der Translokationsaktivität vom Wt und den Deletionsmutanten N371 und N527 für das am 5'-Ende biotinylierte Oligodesoxynukleotid (dunkelgrau), das am 3'-Ende biotinylierte Oligodesoxynukleotid (grau) und das biotinylierte dsOligodesoxynukleotid (hellgrau). Die Aktivität ist relativ zur Nettotranslokationsaktivität des Wt angegeben. Zu sehen sind die Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Messungen mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Die Deletionsmutante N371 zeigt bezüglich allen drei Substraten eine leicht erhöhte Aktivität gegenüber dem Wt. Die erhöhte Translokationsaktivität steht wahrscheinlich in direktem Zusammenhang mit der erhöhten ATPase-Aktivität (3.2.1.3) und ist wie auch diese möglicherweise auf das Fehlen der Prim/Pol-Domäne zurückzuführen.

N527 zeigt nur eine Restaktivität für das am 5'-Ende biotinylierte Oligodesoxynukleotid, was wahrscheinlich auf seine fehlende Eigenschaft, zu hexamerisieren zurückzuführen ist (3.1.3.2).

3.2.2.2 Translokationsaktivität der Punktmutanten

Als nächstes wurde die Translokationsaktivität der Punktmutanten untersucht (Abbildung 3-21).

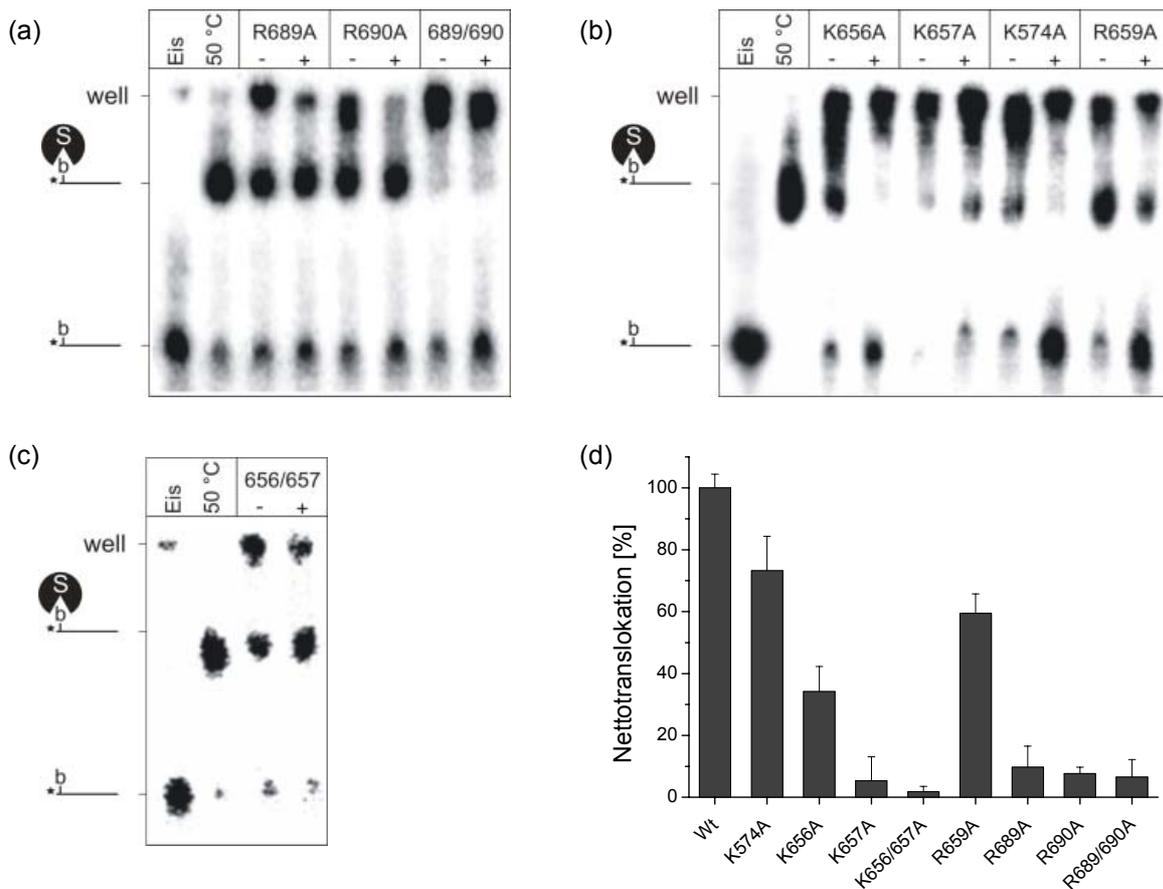


Abbildung 3-21: Translokationsaktivität der Punktmutanten von ORF904. (a-c) 8%-ige PAA-Gele von Translokationsreaktionen der Punktmutanten in Abwesenheit (Spur -) und in Gegenwart von 2 mM ATP (Spur +). In den Ansätzen waren 0,5 μ M Protein und 6,5 μ M freies Biotin enthalten. Als Substrat wurden 10 nM eines am 5'-Ende biotinylierten Oligodesoxynukleotids (50 b) verwendet, das mit 32 P markiert und mit Streptavidin abgesättigt war. Die Ansätze wurden für 30 min bei 50°C inkubiert. Als Kontrolle diente das bei 95°C bzw. bei 50°C inkubierte Substrat. (d) Graphische Darstellung der Translokationsaktivität vom Wt und den Punktmutanten für das am 5'-Ende biotinylierte Oligodesoxynukleotid. Die Aktivität ist relativ zur netto Nettotranslokationsaktivität des Wt angegeben. Zu sehen sind die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Messungen mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Es zeigte sich, dass die Alaninmutation des potentiellen „Lysin-fingers“ K574 nur einen geringen Einfluss auf die Translokationsaktivität ausübt, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich beim Lysin K574 nicht um den vermeintlichen „Lysin-finger“ handelt.

Bei der Punktmutante K656A im β -Hairpin war ein deutlicher Rückgang in der Translokationsaktivität im Vergleich zum Wt zu sehen, der bei K657A noch stärker ausgeprägt war und bei der Doppelmutante K656/657A gegen Null ging. Dies deutet darauf hin, dass K657 die Spitze des β -Hairpins ausbildet und den Kontakt zur DNA herstellt, während eine Mutation von K656, durch ihre räumliche Nähe zu K657, diese Interaktion direkt oder indirekt stört. Der kumulative Effekt der beiden Mutationen spiegelt sich in der Doppelmutante K656/657A wider, bei der die Translokationsaktivität gegen Null geht. Die Ergebnisse lassen sich mit denen der SF3-Helikase AAV Rep40 vergleichen, bei der Mutationen von basischen Aminosäureresten im β -Hairpin zu einem Verlust der DNA-Bindung führen (Yoon-Robarts *et al.*, 2004).

Die Punktmutante R659A ließ nur eine geringe Abnahme der Aktivität erkennen. Dieser Rückgang ist vermutlich wie bei K656A auf die räumliche Nähe des Aminosäurerests zu K657 zu erklären.

Bei den Punktmutanten des Argininfingers R690A und des angrenzenden Arginins R689A sowie der Doppelmutante R689/690A ging die Translokationsaktivität gegen Null. Dies steht mit der Rolle dieser Aminosäurereste in der ATP-Hydrolyse im Einklang, welche die Voraussetzung für die Translokation bildet.

3.2.2.3 Bestimmung der Translokationsgeschwindigkeit

Um die Translokationsgeschwindigkeit von ORF904 zu bestimmen, wurden für den Biotin-Streptavidin-Verdrängungsversuch die Kinetiken im Bereich von 0 bis 30 min aufgenommen und ausgewertet (Abbildung 3-22).

Für das Hintergrundsignal war nur eine leichte Zunahme der Aktivität im zeitlichen Verlauf zu erkennen. Diese ist vermutlich auf eine nicht vollständige Thermostabilität des Substrats bei 50°C zurückzuführen, was möglicherweise an einer nicht absolut homogenen Population von Streptavidinmolekülen lag, die unterschiedlich stabil an die biotinylierte DNA banden.

Für die Kinetik mit Protein aber ohne ATP ergab sich nahezu ein identischer Verlauf. Unter Berücksichtigung des Hintergrundsignals zeigt das Protein ohne ATP keine Translokationsaktivität, während in Gegenwart von ATP die Aktivität von ORF904 deutlich zunahm. Dies macht deutlich, dass ORF904 eine durch ATP induzierbare Translokase ist, die 3'-5'-Polarität aufweist.

Die Werte für die Translokation in Abwesenheit bzw. Gegenwart von ATP wurden durch Ermitteln der Steigung im linearen Bereich des Graphen zwischen 1 und 10 min mittels linearer Regression bestimmt. Dabei wurden die Werte um die Hintergrundaktivität korrigiert. Die Nettotranslokation errechnet sich aus der Differenz der ermittelten Werte, stellt also die ATP-abhängige Translokation dar. Die Translokationsgeschwindigkeit errechnet sich aus der Nettotranslokation, wobei die Konzentrationen von Protein, DNA-Substrat sowie die Länge des DNA-Substrats berücksichtigt wurden (2.3.10.2.1).

Die Translokationsgeschwindigkeit lässt sich für ein 50 Basen langes Substrat anhand der ermittelten Werte zu etwa $6,2 \cdot 10^{-4} \text{ b s}^{-1}$ bestimmen (Tabelle 3-6). Der Wert stimmt gut mit den Werten für die Entwindungsaktivität von ORF904 überein (3.2.3.2.4). Es ist darauf hinzuweisen, dass unter den experimentellen Bedingungen das Protein gegenüber dem Substrat im Überschuss vorlag. Außerdem konnten die Translokationsexperimente für ORF904 auf Grund der Thermostabilität des Biotin-Streptavidin-Substrats nur bei 50°C, also unter suboptimalen Bedingungen, durchgeführt werden.

Der tatsächliche Wert der Translokationsgeschwindigkeit von ORF904 liegt vermutlich höher. Der ermittelte Wert lässt aber auch vermuten, dass es sich bei der Translokation vermutlich um eine Hintergrundaktivität handelt.

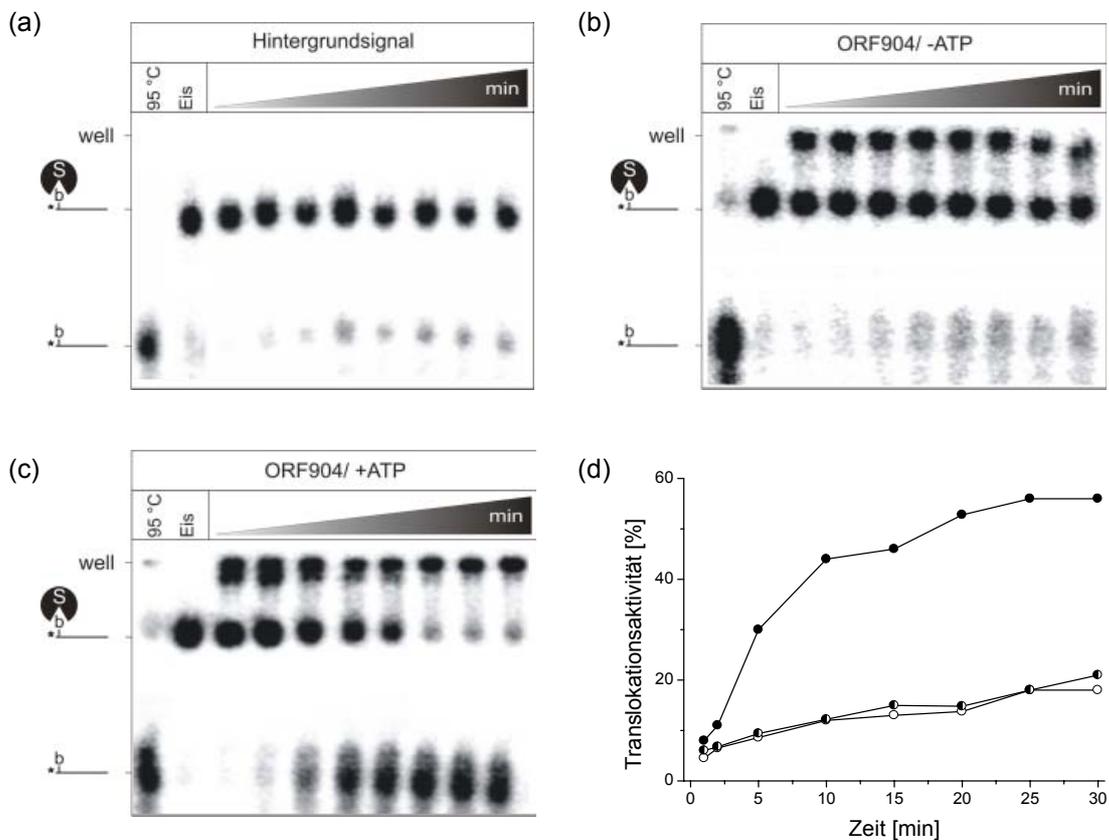


Abbildung 3-22: Bestimmung der Translokationsgeschwindigkeit von ORF904. (a) Repräsentatives 8%-iges PAA-Gel, das den zeitlichen Verlauf (1-30 min) der Translokationsreaktion von ORF904 in Abwesenheit von Protein und ATP, (b) in Gegenwart von 0,5 μM Protein ohne ATP und (c) in Gegenwart von 0,5 μM Protein und 2 mM ATP zeigt. In den Ansätzen waren 6,5 μM freies Biotin enthalten. Als Substrat wurden 10 nM eines am 5'-Ende biotinylierten Oligodesoxynukleotids (50 b) verwendet, das mit ^{32}P markiert und mit Streptavidin abgesättigt war. Die Ansätze wurden bei 50°C inkubiert. Als Kontrolle diente das bei 95°C bzw. bei 50°C inkubierte Substrat. (d) Graphische Darstellung der Translokationsaktivität in Abhängigkeit von der Zeit für das Substrat (weiße Kreise), für das Substrat mit Protein (halbgefüllte Kreise) und für das Substrat mit Protein und ATP (schwarze Kreise). Die für dieses Substrat ermittelte Translokationsgeschwindigkeit von ORF904 ist in Tabelle 3-6 aufgeführt.

Tabelle 3-6: Ermittelte Translokationsgeschwindigkeit von ORF904 für das am 5'-Ende biotinylierte ssSubstrat. Die Translokation stellt den Prozentsatz an verdrängtem Streptavidin vom Substrat pro Zeiteinheit dar*. Die Nettotranslokation ergibt sich aus der Differenz der Translokation mit und ohne ATP. Bei der Bestimmung der Translokationsgeschwindigkeit aus der Nettotranslokation wurden die Konzentrationen von Protein, DNA-Substrat sowie die Länge des DNA-Substrats berücksichtigt.

Substrat	Protein	ATP [mM]	% Translokation /min	% Nettotranslokation /min	Translokationsgeschwindigkeit [$\text{b s}^{-1} \cdot 10^{-4}$]
ss 3' → 5'	ORF904	0	0		
		2	3,4; 4,1	4,1; 4,7	5,6; 6,8

*Durch lineare Regression im linearen Bereich des Graphen (1-10 min) ermittelt. Angegeben sind der um die Hintergrundaktivität korrigierte Minimal- und Maximalwert aus zwei unabhängigen Messungen.

3.2.3 Die Entwindungsaktivität

3.2.3.1 Entwindungsaktivität für unterschiedliche DNA-Substrate

3.2.3.1.1 Entwindungsaktivität für dsPlasmid-DNA

Um zu überprüfen, ob die Helikase von ORF904 selbständig in der Lage ist an die dsPlasmid-DNA von pRN1 zu binden, diese aufzuschmelzen und zu entwiden, wurde das Plasmid pUC_pRN1, welches die vollständige Sequenz von pRN1 trägt, in Gegenwart von Protein, ATP und S1-Nuklease inkubiert. Sollte das Protein die dsPlasmid-DNA entwiden, würden die dabei freiwerdenden Einzelstrangbereiche der einzelstrangverdauenden Nuklease S1 zugänglich werden. Dies würde auf einem analytischen Agarosegel durch eine Zunahme des Signals der linearisierten Plasmid-DNA sichtbar werden.

Wie in Abbildung 3-23, Spur 1, zu sehen ist, zeigt die Kontrolle, in der das Plasmid in Abwesenheit von Protein verdaut wurde, das stärkste Signal für linearisierte Plasmid-DNA.

Die Zunahme ist wahrscheinlich durch eine thermische Entfaltung der dsPlasmid-DNA bei der Inkubationstemperatur von 60°C zu erklären, die ein lokales Aufschmelzen der dsPlasmid-DNA bewirkte, so dass dabei freiwerdende Einzelstrangbereiche durch S1 abgebaut werden konnten. Die Probe, in der kein Verdau stattfand, Spur - und die Proben mit ORF904, Spuren 2 und 3 zeigen hingegen die gleiche Signalstärke für ssPlasmid-DNA.

Dies zeigt, dass ORF904 die Plasmid-DNA zwar nicht entwunden hat, aber sehr wohl in der Lage war, diese zu binden und somit einen Verdau durch S1 zu verhindern. Ob ORF904 jedoch hierbei die thermisch freigewordenen Einzelstrangbereiche gebunden hat oder die dsPlasmid-DNA von vornherein vor einem S1-Verdau geschützt hat, lässt sich nicht eindeutig sagen. Die Gegenwart von ATP scheint jedoch hier keinen Einfluss zu haben.

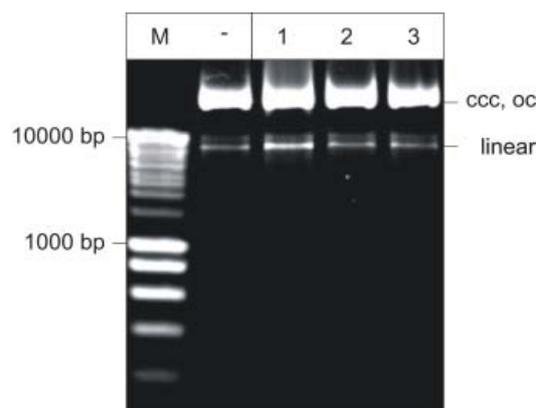


Abbildung 3-23: Repräsentatives 1,0%-iges Agarosegel eines S1-Plasmidverdaus in Gegenwart von ORF904. 10 nM pUC_pRN1 (8036 bp) in 1x NEB 1 wurden für 5 min bei 60°C in Gegenwart bzw. Abwesenheit von 0,5 µM ORF904 und 1 mM ATP mit 0,04 U/µl S1-Nuklease verdaut. Als Kontrollen dienen Plasmid und S1-Nuklease-verdautes Plasmid in Abwesenheit von Protein. Zu sehen sind in Spur M: der Eurogentec DNA Standard; Spur -: pUC_pRN1; Spur 1: pUC_pRN1 + S1; Spur 2: pUC_pRN1 + Protein + S1; Spur 3: pUC_pRN1 + Protein + ATP + S1. ccc: *covalently closed circle*; oc: *open circle*

3.2.3.1.2 Entwindungsaktivität für kurze lineare DNA-Substrate

Für die Helikase konnte unter Verwendung von Substraten mit 3'- bzw. 5'-Überhang, die aus Oligodesoxynukleotiden die an ein virales, einzelsträngiges M13-Plasmid hybridisiert waren, keine Aktivität gezeigt werden (Lipps *et al.*, 2003). Deswegen wurde die Helikaseaktivität von ORF904 in Abwesenheit und Gegenwart von ATP für unterschiedliche, kurze DNA-Substrate untersucht, wie sie auch von Gupta *et al.* (2005) oder Shin *et al.* (2003) verwendet wurden. Bei den Substraten handelte es sich um Oligodesoxynukleotide, die miteinander hybridisiert waren und von denen eines am 5'-Ende radioaktiv markiert war. Zeigte das Protein Helikaseaktivität, kam es auf Grund der Entwindung des Substrats zu einem Freisetzen des radioaktiven Oligodesoxynukleotids aus dem Substrat. Mittels PAA-Gel wurden Substrat und freies Oligodesoxynukleotid voneinander getrennt und mit Hilfe des InstantImagers analysiert (Abbildung 3-24).

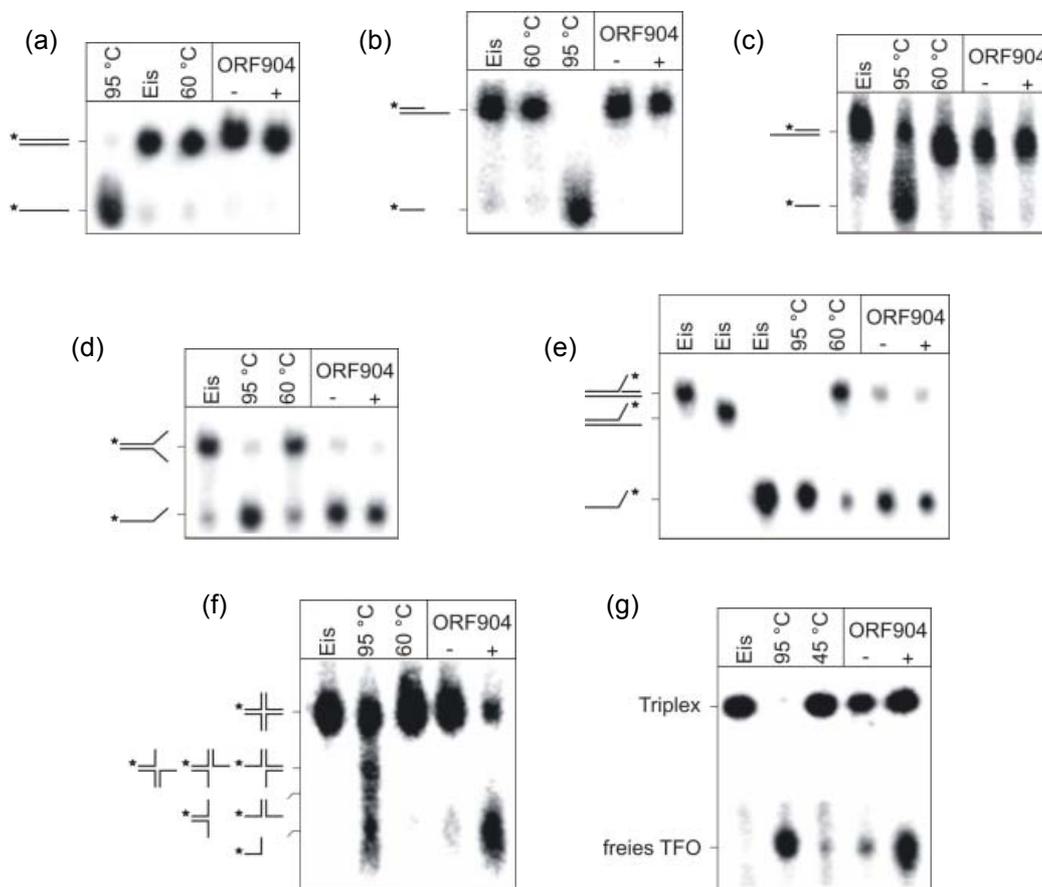


Abbildung 3-24: Entwindungsaktivität von ORF904 für unterschiedliche DNA-Substrate. (a) Repräsentative 8%-ige PAA-Gele der Entwindungsreaktion von ORF904 in Abwesenheit (Spur -) und in Gegenwart von 2 mM ATP (Spur +). In den Ansätzen waren 0,5 μ M Protein und 100 nM unmarkiertes Oligodesoxynukleotid enthalten. Als Substrat wurden 10 nM eines am 5'-Ende mit 32 P markierten und zum perfekten Doppelstrang hybridisierten Oligodesoxynukleotids (49 bp) verwendet. Die Ansätze wurden für 30 min bei 60°C inkubiert. Als Kontrolle diente das auf Eis bzw. bei 95°C oder bei 60°C inkubierte Substrat. (b) wie (a), aber Substrat besitzt einen 5'-Überhang. (c) wie (a), aber Substrat besitzt einen 3'-Überhang. (d) wie (a), aber Substrat besitzt einen 3'- und einen 5'-Überhang. (e) wie (a), aber Substrat besitzt einen internen 3'-Überhang. (f) wie (a), aber als Substrat wurde eine Holliday-Struktur verwendet. (g) wie (a), aber in den Ansätzen waren 5 nM einer DNA-Triple-Helix und 50 nM Protein enthalten. Die Inkubation der Ansätze und der Kontrolle wurde bei 45°C statt bei 60°C durchgeführt.

Unter Verwendung eines Substrats mit einem 25 Basen langen 3'- und 5'-Überhang und einer 25 Basen langen Duplexregion konnte für ORF904 Entwindungsaktivität nachgewiesen werden. Ebenso wie für SV40 L Tag (Wang *et al.*, 2007), BPV E1 (Sedman & Stenlund, 1998), P4 α -Protein (Ziegelin *et al.*, 1993), AAV Rep (Zhou *et al.*, 1999) und MCM aus *M. thermautotrophicus* (Sakakibara *et al.*, 2008). Dieses Substrat stellt das bevorzugte Substrat ringförmiger Helikasen, wie den SF3-Helikasen, dar (Jezewska *et al.*, 1998; Matson & Richardson, 1983; Seo *et al.*, 1993). Dies untermauert nochmals die Zugehörigkeit der Helikase von ORF904 zu den SF3-Helikasen. SF3-Helikasen wie BPV E1 können an eine der Einzelstrangregionen des Substrates binden und dann die Einzelstrang-DNA aktiv durch die zentrale Pore transportieren (Enemark & Joshua-Tor, 2006). Der andere Strang der DNA wird sterisch ausgeschlossen, was zu einer Entwindung des Doppelstrangbereichs des Substrats führt.

Eine mögliche Ursache der Destabilisierung des Substrats in Gegenwart von ORF904 ohne ATP ist mitunter im multidomänen Charakter des Proteins zu suchen. Die N-terminale Prim/ Pol-Domäne ist in der Lage, Einzelstrang-DNA zu binden. Es ist möglich, dass unter den experimentellen Bedingungen (Überschuss von Protein gegenüber DNA) ORF904 die Duplex-DNA destabilisiert hat, indem es bevorzugt an Einzelstrang-DNA bindet.

Für ORF904 konnten weder für ein DNA-Doppelstrangsubstrat mit glatten Enden noch für Substrate mit 3'- oder 5'-Überhang Entwindungsaktivität nachgewiesen werden. Der Grund hierfür ist vermutlich ebenfalls im möglichen Mechanismus der Helikase zu suchen. Für das Doppelstrangsubstrat und das Substrat mit dem 5'-Überhang ist ein sterischer Ausschluss nicht möglich. Auf Grund der Polarität der Helikase wird diese auf dem Substrat mit dem 5'-Überhang wahrscheinlich an die Doppelstrangregion binden und dann im Zuge der Translokation auf die Einzelstrangregion wechseln. Bei dem Substrat mit dem 3'-Überhang ist vermutlich das Gegenteil der Fall, wie es für die Ringhelikase MCM4,6,7 bereits gezeigt wurde (Kaplan *et al.*, 2003). Auch diese Befunde stehen im Einklang mit dem beschriebenen Mechanismus.

Ganz anders bei SV40 L Tag bzw. AAV Rep, wo für ein dsDNA-Substrat mit glatten Enden, das die Replikationsursprungssequenz trägt (Wang *et al.*, 2007) bzw. die RBE-Sequenz (*Rep Binding Element*) (Zhou *et al.*, 1999) enthielt, Entwindungsaktivität nachgewiesen werden konnte. Für ein dsSubstrat ohne Erkennungssequenz hingegen konnte keine Aktivität gezeigt werden. Möglicherweise verhält es sich bei ORF904 ähnlich, und eine Aktivität für dsDNA mit glatten Enden konnte nur auf Grund des Fehlens der Replikationsursprungssequenz im Substrat nicht nachgewiesen werden. Für BPV E1 (Castella *et al.*, 2006a), SV40 L Tag (Wiekowski *et al.*, 1988), AAV Rep (Zhou *et al.*, 1999) und MCM aus *M. thermautotrophicus* (Shin & Kelman, 2006b) wurde für ein dsDNA-Substrat mit 3'-Überhang ebenfalls Entwindungsaktivität nachgewiesen. Von allen Helikasen war keine in der Lage, das dsDNA-Substrat mit dem 5'-Überhang zu entwinden. Dies zeigt, dass ORF904 eine ähnliche Präferenz bei der Entwindung von DNA-Substraten wie die SF3-Helikase besitzt und die Entwindung nach dem *strand exclusion model* zu erfolgen scheint.

Die Analyse der ATPase-Aktivität zeigte, dass Doppelstrang-DNA das bevorzugte Substrat von ORF904 ist. Deswegen scheint es unwahrscheinlich, dass ORF904 bevorzugt auf Einzelstrang-DNA transloziert. Um zu untersuchen, ob das Protein auch auf Doppelstrang-DNA transloziert, wurde für das Helikaseexperiment ein Substrat verwendet, welches einen internen 5'-Überhang besitzt. Dabei

muss die Helikase auf Grund ihrer 3'-5'-Polarität erst auf dem Doppelstrang translozieren, bevor sie den internen einzelsträngigen 5'-Überhang sterisch ausschließen kann. Dabei wechselt die Helikase vermutlich am „Verzweigungspunkt“ auf den Einzelstrang, auf dem sie in 3'-5'-Richtung translozieren kann. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit dem für MCM aus *M. thermotrophicus* (Shin & Kelman, 2006b). Wie für das Substrat mit 3'- und 5'-Überhang zeigte ORF904 auch für dieses Substrat eine Aktivität in Abwesenheit von ATP, die vermutlich auf den Multidomänencharakter des Proteins zurückzuführen ist.

Zur weiteren Untersuchung der Aktivität auf Doppelstrang-DNA wurde ein Substrat verwendet, das einer Holliday-Struktur nachempfunden war. Dieses Substrat stellt für die initiale Bindung an die DNA keine Einzelstrangregionen zur Verfügung. Es zeigte sich, dass die Holliday-Struktur nur in Gegenwart von ATP entwunden wird. Möglicherweise bindet das ORF904 einen der vier Arme des Substrats, über welchen es transloziert und dabei den Verzweigungspunkt auflöst, was zum Freisetzen von zwei gegabelten Strukturen führt, die anschließend auch entwunden werden. Da während dieses Versuchs keinerlei Intermediate zu beobachten waren, scheint es, dass die Entwindung der gegabelten Strukturen schneller verläuft als die der Holliday-Struktur. Die Entwindung des Substrates deutet stark darauf hin, dass ORF904 auf dsDNA translozieren kann, was auch mit den Ergebnissen der ATPase-Aktivität für dsDNA übereinstimmt. Für MCM4,6,7 konnte ebenfalls eine Entwindung von Holliday-Strukturen gezeigt werden (Kaplan *et al.*, 2003; Kaplan & O'Donnell, 2004). MCM4,6,7 benötigt aber im Gegensatz zu ORF904 einen 3'-Überhang für die initiale Bindung. ORF904 verhält sich für dieses Substrat also eher wie UvrD (SF1-Helikase) oder RuvAB (SF6-Helikase), die keinen Überhang für die initiale Bindung benötigen.

Um letztlich die Translokations- und Helikaseaktivität für dsDNA zu klären, wurde als Substrat der linearisierte dsPlasmid pMJ5 mit dem Oligodesoxynukleotid TFO zu einer DNA-Triple-Helix hybridisiert (Firman & Szczelkun, 2000; Soyfer & Potaman, 1996). Wie die Holliday-Struktur stellt auch die Triple-Helix für die initiale Bindung an die DNA keine Einzelstrangregionen zur Verfügung. ORF904 war in der Lage, die Triple-Helix in Gegenwart von ATP zu entwinden. Dies macht deutlich, dass ORF904 tatsächlich auf dsDNA translozieren kann. Dabei bildet das Protein wahrscheinlich um den Plasmiddoppelstrang ein Hexamer und schließt während der Translokation das Oligodesoxynukleotid sterisch aus. Dass nur etwa 50% des Substrats entwunden wurden, liegt vermutlich daran, dass es bei der Hybridisierung auch zur Bildung von Aggregaten aus zwei oder mehreren Plasmiden mit einem Oligodesoxynukleotid kommt (Kopel *et al.*, 1996), die von ORF904 nicht aufgelöst werden können.

3.2.3.2 Bestimmung der Entwindungsgeschwindigkeiten für die Helikasesubstrate

3.2.3.2.1 Das Substrat mit 3'- und 5'-Überhang

Die Bestimmung der Entwindungsgeschwindigkeit für die unterschiedlichen DNA-Substrate wurde analog zur Bestimmung der Translokationsgeschwindigkeit (3.2.2.3) durchgeführt.

Wie man in Abbildung 3-25 erkennen kann, nimmt das Hintergrundsignal für das Substrat mit 3'- und 5'-Überhang nahezu nicht zu. Die leichte Zunahme ist wahrscheinlich auf eine unvollständige Oligodesoxynukleotidsynthese zurückzuführen, so dass in der Substratpopulation auch solche

Oligodesoxynukleotide enthalten waren, die nicht die für dieses Experiment gewünschte Thermostabilität aufwiesen.

Für die Kinetik von ORF904 ohne ATP zeigte sich im zeitlichen Verlauf eine deutliche Zunahme der Entwindung des Substrats. Vermutlich lässt sich dies auf die Präsenz der Prim/Pol-Domäne zurückführen, die in der Lage ist, Einzelstrang-DNA zu binden (3.2.3.1.2). Sie könnte die Duplex-DNA destabilisieren, indem sie bevorzugt an die Einzelstrangregionen bindet.

Das Signal für die Entwindung des Substrats nahm in Gegenwart von ATP stärker zu als ohne ATP. Dies macht deutlich, dass für ORF904 eine ATP-abhängige Induzierbarkeit der Entwindungsaktivität vorliegen muss. Die Entwindungsgeschwindigkeit von ORF904 für dieses Substrat liegt zwischen $6,0$ und $7,2 \cdot 10^{-4}$ bp s⁻¹. Die Entwindungsgeschwindigkeit wurde analog zur Translokationsgeschwindigkeit berechnet (2.3.10.2.1).

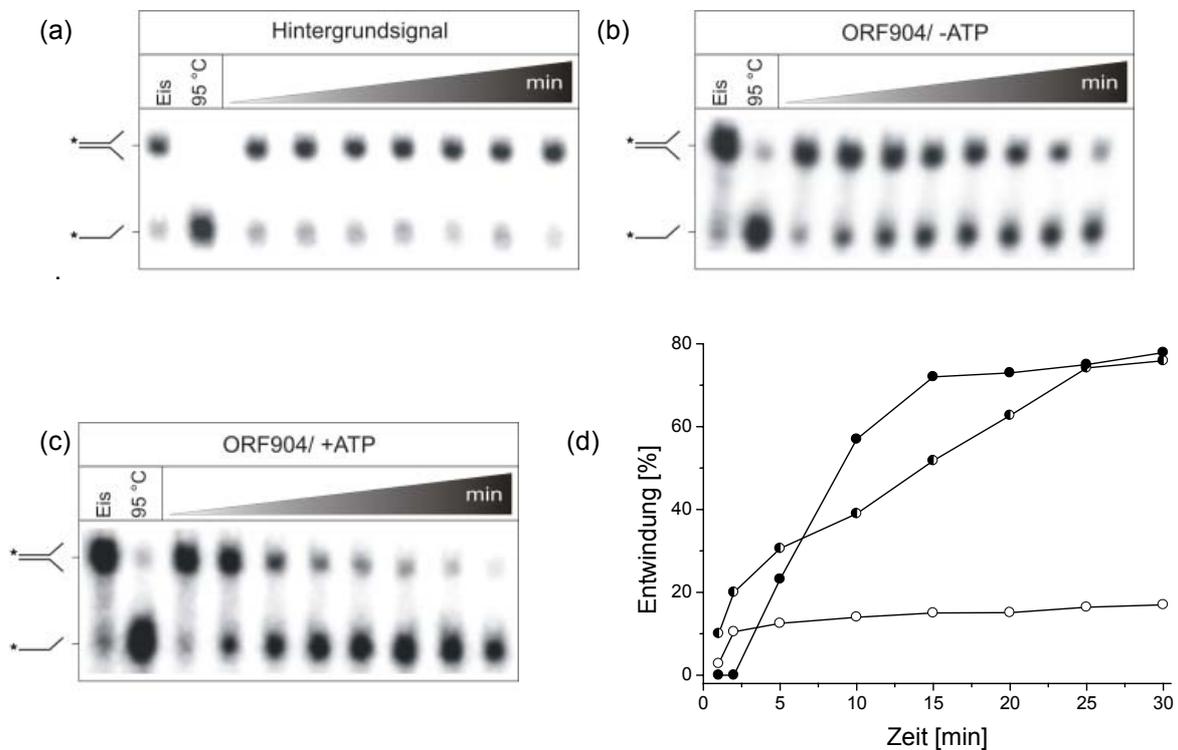


Abbildung 3-25: Bestimmung der Entwindungsgeschwindigkeit von ORF904 für das Substrat mit 3'- und 5'-Überhang. (a) Repräsentative 8%-ige PAA-Gele, die den zeitlichen Verlauf (1-30 min) der Entwindungsreaktion von ORF904 in Abwesenheit von Protein und ATP, (b) in Gegenwart von $0,5 \mu\text{M}$ Protein ohne ATP und (c) in Gegenwart von $0,5 \mu\text{M}$ Protein und 2 mM ATP zeigen. In den Ansätzen waren 10 nM ^{32}P markiertes Substrat und 100 nM unmarkiertes Oligodesoxynukleotid enthalten. Die Ansätze wurden bei 60°C inkubiert. Als Kontrolle diente das auf Eis bzw. bei 95°C inkubierte Substrat. (d) Graphische Darstellung der Entwindungsaktivität in Abhängigkeit von der Zeit für das Substrat (weiße Kreise), für das Substrat mit Protein (halbgefüllte Kreise) und für das Substrat mit Protein und ATP (schwarze Kreise). Die ermittelte Entwindungsgeschwindigkeit von ORF904 für das Substrat mit 3'- und 5'-Überhang ist in Tabelle 3-7 aufgeführt.

Wie man für die Kinetik von N371 ohne ATP erkennen kann (Abbildung 3-26), nimmt das Signal für das Substrat mit 3'- und 5'-Überhang mit der Zeit nahezu nicht zu und ist mit der Zunahme des Hintergrundsignals (Abbildung 3-25) vergleichbar. Dieses Protein zeigt im Vergleich zum Wildtyp nur eine sehr schwache Destabilisierung des Substrats in Abwesenheit von ATP. Es scheint tatsächlich so, dass die Prim/Pol-Domäne für die bei ORF904 beobachtete Substratdestabilisierung verantwortlich ist (siehe oben). In Gegenwart von ATP hingegen nimmt das Signal mit der Zeit deutlich zu. Dies macht klar, dass N371 eine durch ATP induzierbare Entwindungsaktivität besitzt. Seine Entwindungsgeschwindigkeit liegt zwischen $4,9$ und $5,4 \cdot 10^{-4}$ bp s^{-1} . In Tabelle 3-7 sind nochmals die Entwindungsgeschwindigkeiten von ORF904 und N371 für alle Substrate aufgeführt.

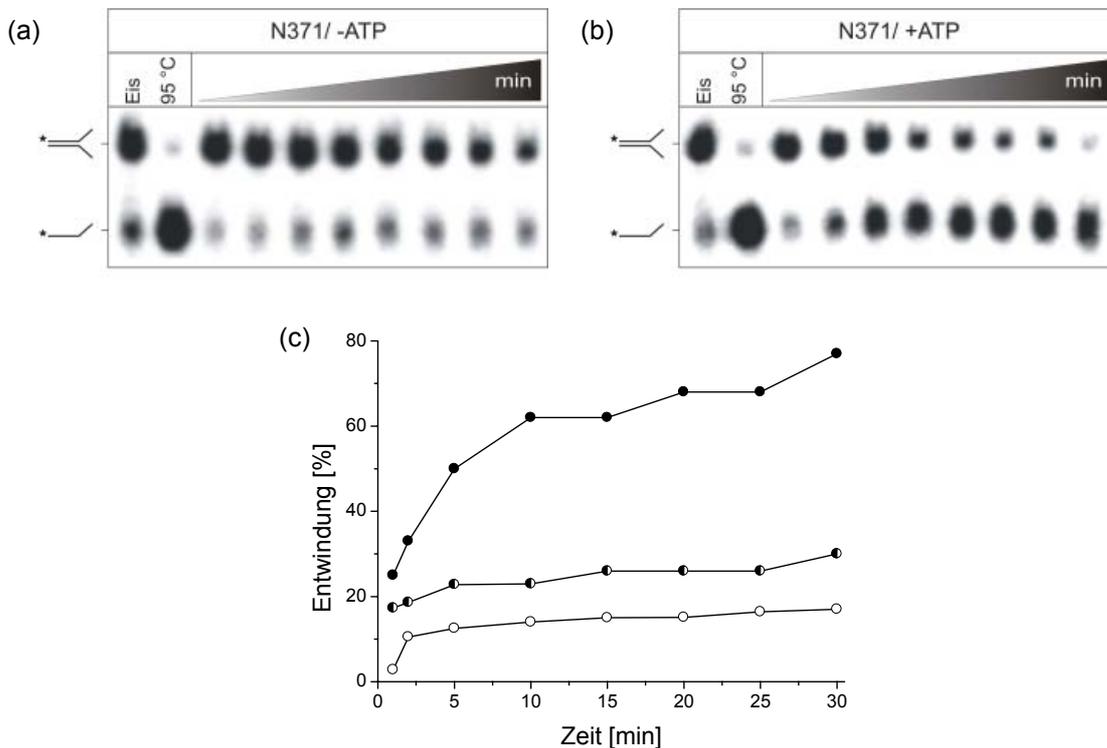


Abbildung 3-26: Bestimmung der Entwindungsgeschwindigkeit von N371 für das Substrat mit 3'-und 5'-Überhang. (a) Repräsentative 8%-ige PAA-Gele, die den zeitlichen Verlauf (1-30 min) der Entwindungsreaktion von N371 in Gegenwart von $0,5 \mu\text{M}$ Protein ohne ATP und (b) in Gegenwart von $0,5 \mu\text{M}$ Protein und 2 mM ATP zeigen. In den Ansätzen waren 10 nM ^{32}P markiertes Substrat und 100 nM unmarkiertes Oligodesoxynukleotid enthalten. Die Ansätze wurden bei 60°C inkubiert. Als Kontrolle diente das auf Eis bzw. bei 95°C inkubierte Substrat. (c) Graphische Darstellung der Entwindungsaktivität in Abhängigkeit von der Zeit für das Substrat (weiße Kreise) (siehe Abb. 3-11), für das Substrat mit Protein (halbgefüllte Kreise) und für das Substrat mit Protein und ATP (schwarze Kreise). Die ermittelte Entwindungsgeschwindigkeit von N371 für das Substrat mit 3'- und 5'-Überhang ist in Tabelle 3-7 aufgeführt.

3.2.3.2 Die Holliday-Struktur

In Abbildung 3-27 ist zu erkennen, dass für die Holliday-Struktur das Hintergrundsignal über die Zeit konstant blieb. Weshalb man überhaupt ein Hintergrundsignal messen konnte, liegt vermutlich daran, dass sich nicht alle Oligodesoxynukleotide zu der Holliday-Struktur hybridisieren ließen. Dies ist wahrscheinlich auf eine unvollständige Oligodesoxynukleotidsynthese zurückzuführen.

ORF904 zeigt in Abwesenheit von ATP nur eine schwache Signalzunahme im zeitlichen Verlauf des Experiments. Dies lässt sich damit erklären, dass für die Prim/Pol-Domäne bei der Holliday-Struktur keine Einzelstrang-Bereiche vorliegen, die von dieser gebunden werden können. Möglicherweise führt aber die relativ hohe Temperatur von 60°C zu einem temporären Aufschmelzen im Verzweigungspunkt der Holliday-Struktur. Dadurch würden sich für die Prim/Pol-Domäne zugängliche Einzelstrangregionen ausbilden. Dies würde eine Destabilisierung des Substrats durch die Prim/Pol-Domäne erklären, wenn auch weniger stark als bei Vorliegen von Einzelstrangbereichen wie bei dem Substrat mit 3'- und 5'-Überhang.

Bei Betrachtung der Kinetik von ORF904 mit ATP ist zu erkennen, dass das Signal für die Entwindung mit der Zeit deutlich zunimmt. Auch hier wird nochmals klar, dass ORF904 eine ATP-abhängige Entwindungsaktivität besitzt und in der Lage ist, auf dsDNA zu translozieren. Die Entwindungsgeschwindigkeit von ORF904 für die Holliday-Struktur liegt zwischen $1,0$ und $1,5 \cdot 10^{-4}$ bp s⁻¹.

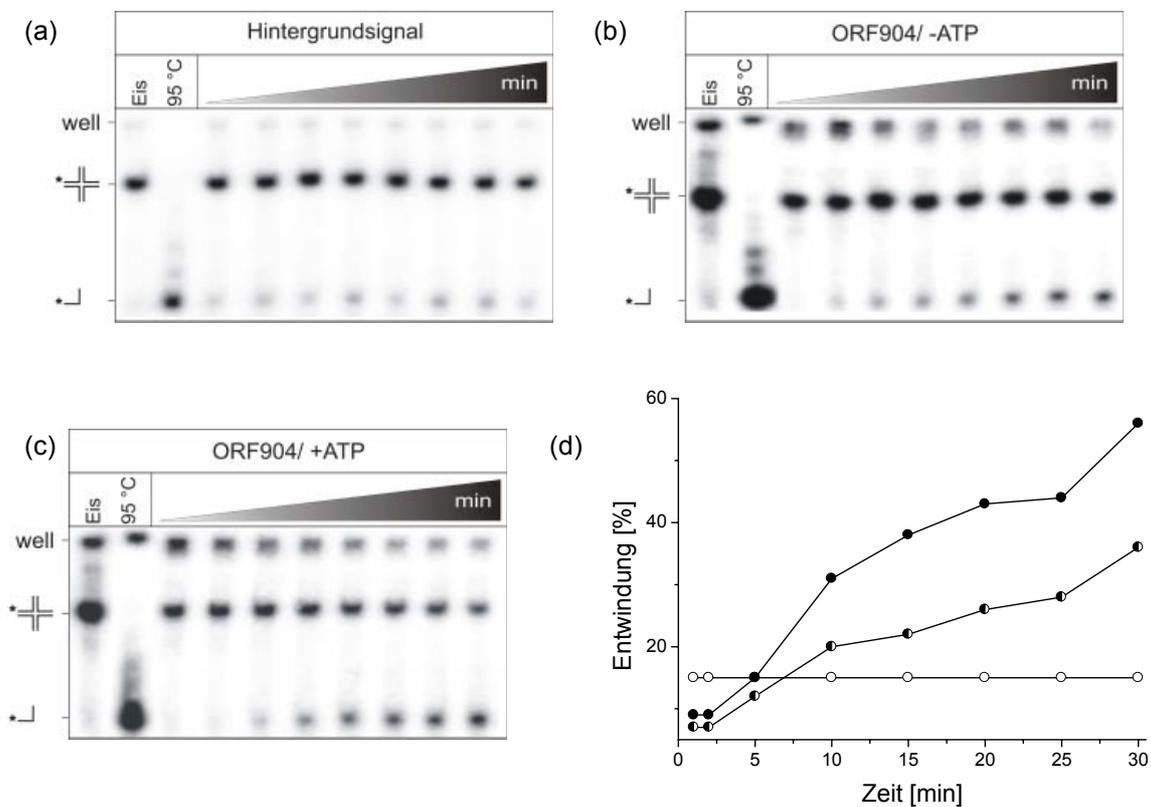


Abbildung 3-27: Bestimmung der Entwindungsgeschwindigkeit von ORF904 für die Holliday-Struktur. (a) Repräsentative 8%-ige PAA-Gele, die den zeitlichen Verlauf (1-30 min) der Helikasereaktion von ORF904 in Abwesenheit von Protein und ATP, (b) in Gegenwart von 0,5 µM Protein ohne ATP und (c) in Gegenwart von 0,5 µM Protein und 2 mM ATP zeigen. In den Ansätzen waren 10 nM ³²P markiertes Substrat und 100 nM unmarkiertes Oligodesoxynukleotid enthalten. Die Ansätze wurden bei 60°C inkubiert. Als Kontrolle diente das auf Eis bzw. bei 95°C inkubierte Substrat. (d) Graphische Darstellung der Entwindungsaktivität in Abhängigkeit von der Zeit für das Substrat (weiße Kreise), für das Substrat mit Protein (halbgefüllte Kreise) und für das Substrat mit Protein und ATP (schwarze Kreise). Die ermittelte Entwindungsgeschwindigkeit von ORF904 für die Holliday-Struktur ist in Tabelle 3-7 aufgeführt.

Für die Holliday-Struktur zeigt N371 ohne ATP ein nahezu konstantes Signal, das mit dem Hintergrundsignal fast identisch ist (Abbildung 3-28). Dies ist wie bereits beschrieben auf das Fehlen der Prim/Pol-Domäne bei N371 zurückzuführen (siehe oben).

Wie für das Substrat mit dem 3'- und 5'-Überhang nimmt in Gegenwart von ATP auch das Signal für die Holliday-Struktur mit der Zeit deutlich zu und belegt nochmals die Induzierbarkeit der Entwindungsaktivität der Helikase durch ATP und ihre Fähigkeit, auf dsDNA zu translozieren. Die Entwindungsgeschwindigkeit von N371 für die Holliday-Struktur liegt zwischen $2,8$ und $3,3 \cdot 10^{-4}$ bp s^{-1} .

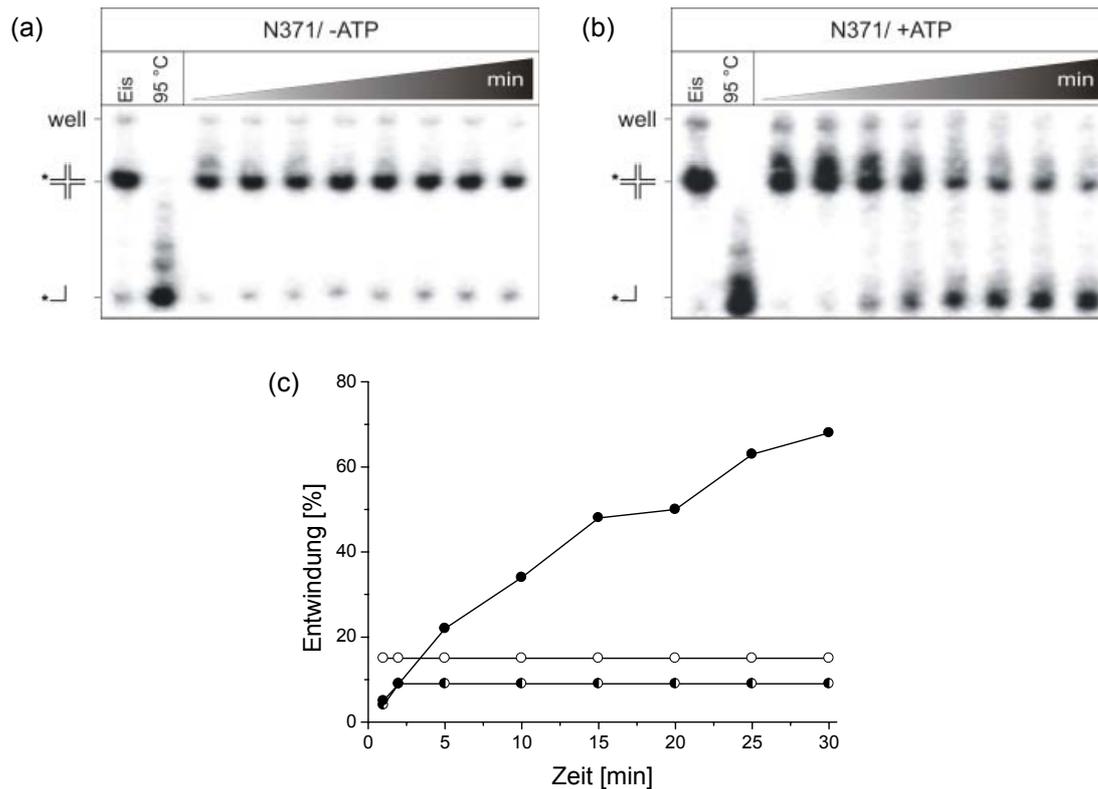


Abbildung 3-28: Bestimmung der Entwindungsgeschwindigkeit von N371 für die Holliday-Struktur. (a) Repräsentative 8%-ige PAA-Gele, die den zeitlichen Verlauf (1-30 min) der Entwindungsreaktion von N371 in Gegenwart von $0,5 \mu\text{M}$ Protein ohne ATP und (b) in Gegenwart von $0,5 \mu\text{M}$ Protein und 2 mM ATP zeigen. In den Ansätzen waren 10 nM ^{32}P markiertes Substrat und 100 nM unmarkiertes Oligodesoxynukleotid enthalten. Die Ansätze wurden bei 60°C inkubiert. Als Kontrolle diente das auf Eis bzw. bei 95°C inkubierte Substrat. (c) Graphische Darstellung der Entwindungsaktivität in Abhängigkeit von der Zeit für das Substrat (weiße Kreise) (siehe Abb. 3-13), für das Substrat mit Protein (halbgefüllte Kreise) und für das Substrat mit Protein und ATP (schwarze Kreise). Die ermittelte Entwindungsgeschwindigkeit von N371 für die Holliday-Struktur ist in Tabelle 3-7 aufgeführt.

3.2.3.2.3 Die DNA-Triple-Helix

Das Hintergrundsignal der Triple-Helix zeigt in Abhängigkeit von der Zeit einen leicht hyperbolischen Kurvenverlauf (Abbildung 3-29). Dieser ist möglicherweise in einer nicht ganz genauen Hybridisierung begründet, bei der die unter 3.2.3.1.2 beschriebenen Aggregate entstehen können, die unterschiedliche Thermostabilitäten aufweisen. Zusätzlich können auf Grund einer nicht vollständigen Oligodesoxynukleotidsynthese von TFO unterschiedliche Thermostabilitäten des Triple-Helix-Substrats resultieren.

Das Signal von ORF904 ohne ATP nimmt im Laufe der Zeit nicht stärker zu als das Hintergrundsignal. Dies war zu erwarten, da die DNA-Triple-Helix keinerlei Einzelstrangbereiche besitzt, die eine Destabilisierung des Substrates durch die Prim/Pol-Domäne zuließe.

In Gegenwart von ATP ist eindeutig eine zeitabhängige Signalzunahme zu erkennen. Diese belegt abermals die Fähigkeit von ORF904 auf dsDNA zu translozieren und diese auch zu entwinden. Die Entwindungsgeschwindigkeit von ORF904, für die DNA-Triple-Helix liegt zwischen $3,3$ und $4,0 \cdot 10^{-4}$ bp s⁻¹.

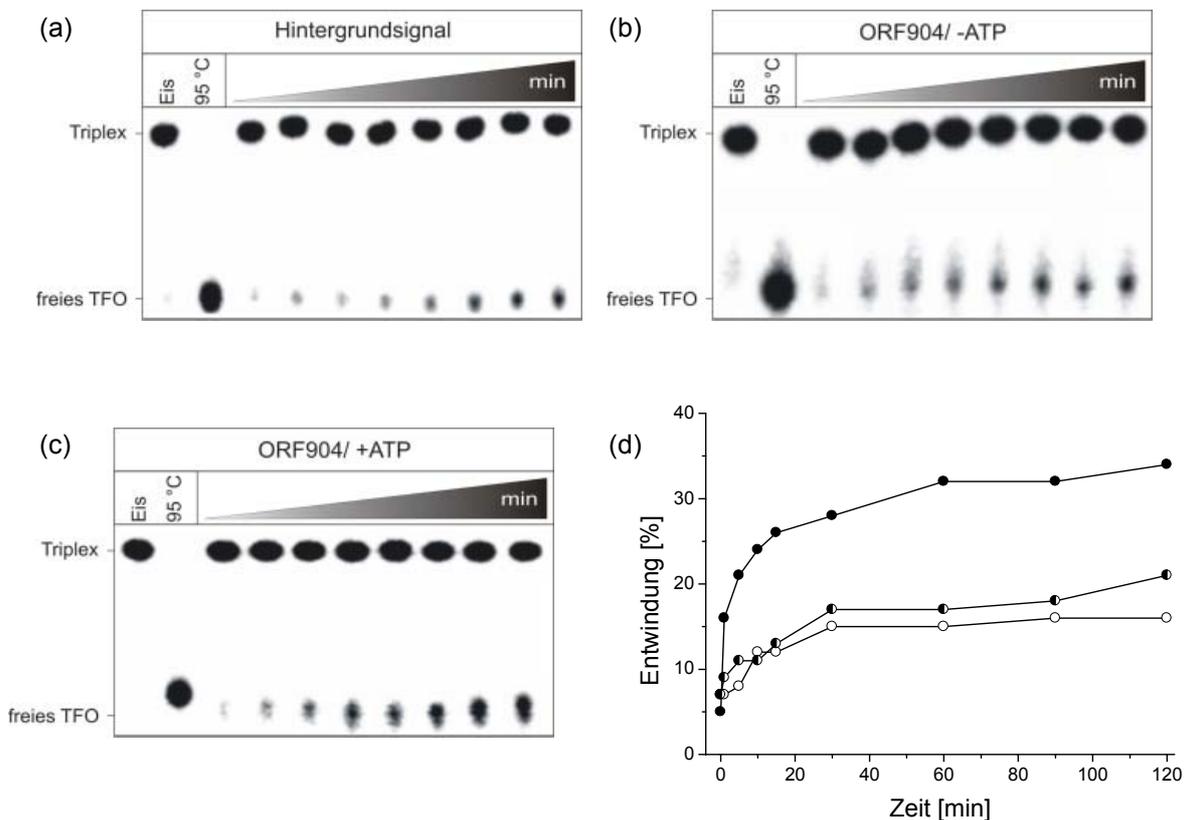


Abbildung 3-29: Bestimmung der Entwindungsgeschwindigkeit von ORF904 für die DNA-Triple-Helix. (a) Repräsentative 8%-ige PAA-Gele, die den zeitlichen Verlauf (1-120 min) der Entwindungsreaktion von ORF904 in Abwesenheit von Protein und ATP, (b) in Gegenwart von $0,05 \mu\text{M}$ Protein ohne ATP und (c) in Gegenwart von $0,05 \mu\text{M}$ Protein und 2 mM ATP zeigen. In den Ansätzen waren 5 nM ^{32}P markiertes Substrat enthalten. Die Ansätze wurden bei 45°C inkubiert. Als Kontrolle diente das auf Eis bzw. bei 95°C inkubierte Substrat. (d) Graphische Darstellung der Entwindungsaktivität in Abhängigkeit von der Zeit für das Substrat (weiße Kreise), für das Substrat mit Protein (halbgefüllte Kreise) und für das Substrat mit Protein und ATP (schwarze Kreise). Die ermittelte Entwindungsgeschwindigkeit von ORF904 für die DNA-Triple-Helix ist in Tabelle 3-7 aufgeführt.

Die Kinetiken von N371 für die DNA-Triple-Helix verlaufen analog zu denen von ORF904 (Abbildung 3-30). Die Entwindungsgeschwindigkeit von N371 für die DNA-Triple-Helix liegt zwischen $2,9$ und $4,4 \cdot 10^{-4} \text{ bp s}^{-1}$.

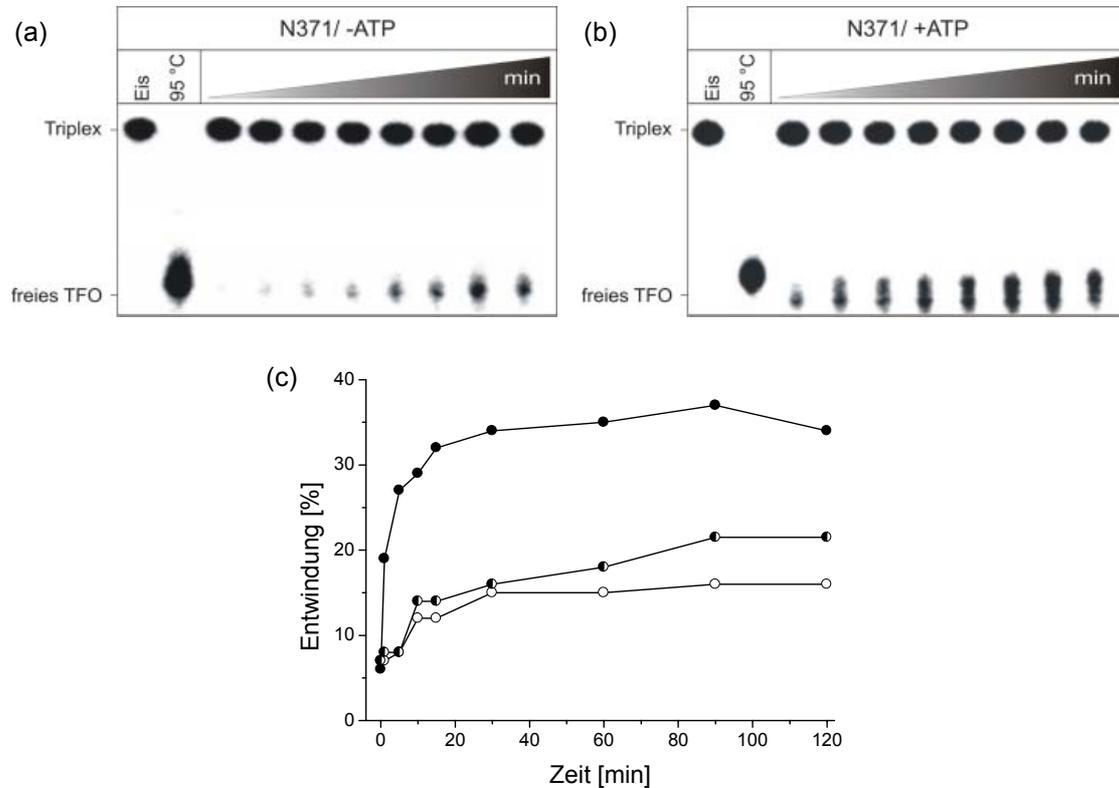


Abbildung 3-30: Bestimmung der Entwindungsgeschwindigkeit von N371 für die DNA-Triple-Helix. (a) Repräsentative 8%-iges PAA-Gel, die den zeitlichen Verlauf (1-120 min) der Entwindungsreaktion von N371 in Gegenwart von $0,05 \mu\text{M}$ Protein ohne ATP und (b) in Gegenwart von $0,05 \mu\text{M}$ Protein und 2 mM ATP zeigen. In den Ansätzen waren 5 nM ^{32}P markiertes Substrat enthalten. Die Ansätze wurden bei 45°C inkubiert. Als Kontrolle diente das auf Eis bzw. bei 95°C inkubierte Substrat. (c) Graphische Darstellung der Entwindungsaktivität in Abhängigkeit von der Zeit für das Substrat (weiße Kreise) (siehe Abb. 3-15), für das Substrat mit Protein (halbgefüllte Kreise) und für das Substrat mit Protein und ATP (schwarze Kreise). Die ermittelte Entwindungsgeschwindigkeit von N371 für die DNA-Triple-Helix ist in Tabelle 3-7 aufgeführt.

3.2.3.2.4 Vergleich der Entwindungsgeschwindigkeiten von ORF904 und N371

Die höchste Entwindungsgeschwindigkeit zeigen ORF904 und N371 für das Substrat mit 3'- und 5'-Überhang (Tabelle 3-7), welches das bevorzugte Substrat von SF3-Helikasen ist. Hier zeigt ORF904 eine höhere Entwindungsgeschwindigkeit als N371.

Der leicht höhere Wert für die Entwindungsgeschwindigkeit von N371 für die DNA-Triple-Helix gegenüber ORF904 ist vermutlich durch die leicht höhere ATPase-Aktivität von N371 für dsDNA gegenüber dem Wt zu erklären (3.2.1.3).

Die Werte für die Holliday-Struktur sind die niedrigsten von allen drei Substraten, was vermutlich daran liegt, dass erst die Holliday-Struktur selbst und anschließend die zwei freigesetzten Substrate mit 3'- und 5'-Überhang aufgelöst werden müssen (3.2.3.1.2). Für die Holliday-Struktur zeigte sich, dass N371 gegenüber dem Wt eine leicht höhere Entwindungsgeschwindigkeit aufweist, die

wahrscheinlich in der leicht höheren ATPase-Aktivität von N371 für dsDNA gegenüber dem Wt begründet liegt.

Tabelle 3-7: Ermittelte Entwindungsgeschwindigkeiten von ORF904 und N371 für unterschiedliche DNA-Substrate. Die Entwindung stellt den Prozentsatz entwundenen Substrats pro Zeiteinheit dar*. Die Nettoentwindung ergibt sich aus der Differenz der Entwindung mit und ohne ATP. Bei der Bestimmung der Entwindungsgeschwindigkeit aus der Nettoentwindung wurden die Konzentrationen von Protein, DNA-Substrat sowie die Länge des DNA-Substrats berücksichtigt.

Substrat	Protein	ATP [mM]	% Entwindung / min	% Nettoentwindung / min	Entwindungsgeschwindigkeit [bp s ⁻¹ * 10 ⁻⁴]
3'-und 5'-Überhang	ORF904	0	1,2; 1,9		
		2	5,6	3,7; 4,4	6,0; 7,2
	N371	0	0,1		
		2	3,1; 3,4	3,0; 3,3	4,9; 5,4
Holliday-Struktur	ORF904	0	0,9; 1,1		
		2	1,7; 1,8	0,6; 0,9	1,0; 1,5
	N371	0	0		
		2	1,7; 2,0	1,7; 2,0	2,8; 3,3
DNA-Triple-Helix	ORF904	0	0,2; 0,3		
		2	1,0; 1,2	0,7; 1,0	2,6; 3,6
	N371	0	0,1; 0,3		
		2	1,1; 1,3	0,8; 1,2	2,9; 4,4

*Durch lineare Regression im linearen Bereich des Graphen ermittelt. Linearer Bereich des Graphen für das Substrat mit 3'- und 5'-Überhang 2-10 min; für die Holliday-Struktur 5-20 min; für die DNA-Triple-Helix 0-15 min. Angaben sind der um die Hintergrundaktivität korrigierte Minimal- und Maximalwert aus drei unabhängigen Messungen.

Die Werte für die Entwindungsgeschwindigkeit von ORF904 und N371 liegen abhängig vom Substrat zwischen 1,0 und 7,2*10⁻⁴ bp s⁻¹. Im Vergleich hierzu zeigt die SF3-Helikase SV40 L Tag eine Entwindungsgeschwindigkeit von etwa 2,4 bp s⁻¹ (Wiekowski *et al.*, 1988). Und für AAV Rep68 konnte eine vergleichbare Entwindungsgeschwindigkeit von etwa 5,75 bp s⁻¹ gezeigt werden (Zhou *et al.*, 1999). Die hohen Werte spiegeln den viralen Charakter der Proteine wider, die eine schnelle Replikation im Wirt ermöglichen.

Für das archaeale MCM aus *M. thermautotrophicus* wurde eine Entwindungsgeschwindigkeit zwischen 48*10⁻⁴ bp s⁻¹ (Shechter *et al.*, 2000) und 148 bp s⁻¹ (Sakakibara *et al.*, 2008) bestimmt.

Man erkennt eine deutliche Diskrepanz zwischen den viralen und archaealen Proteinen, die unter anderem auf die suboptimalen Temperaturbedingungen bei MCM und ORF904 zurückzuführen ist.

Wie bei den Translokationsexperimenten gilt es auch bei den Entwindungsexperimenten darauf hinzuweisen, dass auf Grund der Thermoinstabilität der Substrate die Entwindungsgeschwindigkeiten nur bei 60°C bzw. 45°C bestimmt werden konnten. Daher handelt es sich bei den ermittelten Werten nur um Näherungen an die tatsächlichen Werte, die vermutlich höher liegen.

Obwohl für das archaeale MCM die Entwindungsraten auch relativ klein sind, kann im Gegensatz zu ORF904 auf Grund der hohen Prozessivität (Shechter *et al.*, 2000) davon ausgegangen werden, dass

es sich beim MCM um die replikative Helikase handelt. Die Ergebnisse der Entwindungsgeschwindigkeiten von ORF904 und N371, zusammen mit denen für die Prozessivität und Translokation, lassen vermuten, dass die Entwindung wohl eher wie z.B. für Orc1 (Dueber *et al.*, 2007; Gaudier *et al.*, 2007) lokal begrenzt ist und ORF904 vornehmlich am Aufschmelzen des Replikationsursprungs beteiligt ist.

3.2.3.3 Verwertbarkeit von rNTPs und dNTPs

Es war auch von Interesse zu untersuchen, welche Nucleosidtriphosphate bzw. Desoxynucleosidtriphosphate ORF904 als Energiequelle für die Translokation und die Entwindung von DNA nutzen kann.

Wie Abbildung 3-31 zu entnehmen ist, können ATP, CTP sowie sämtliche dNTPs mit etwa gleicher Effizienz genutzt werden, während UTP als auch GTP für ORF904 etwas weniger geeignet scheinen.

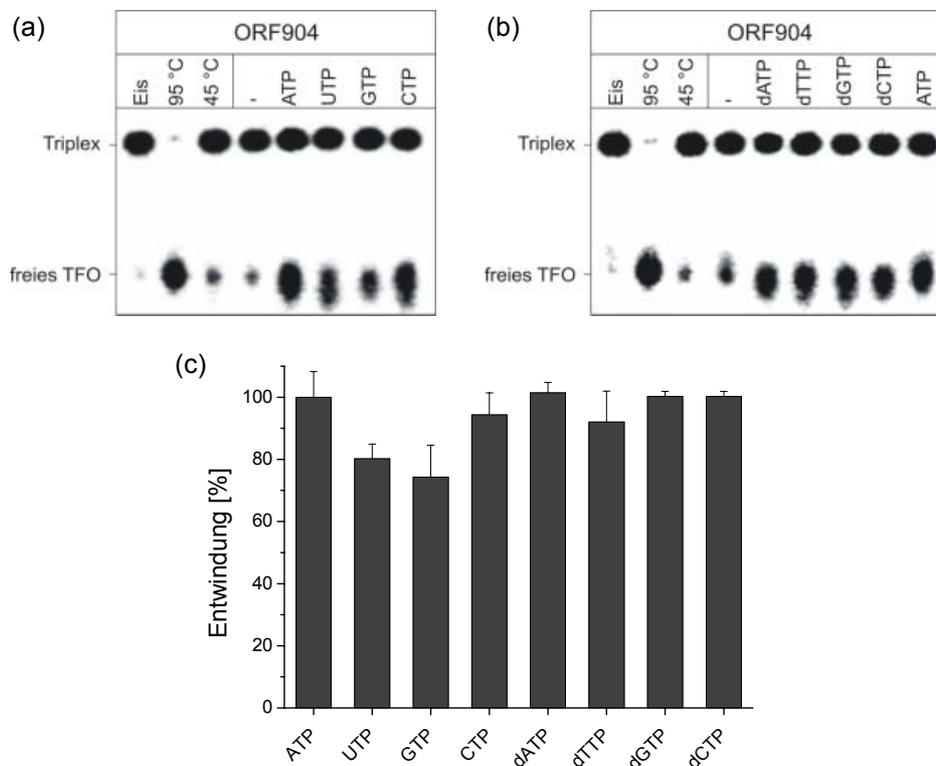


Abbildung 3-31: Verwertbarkeit von rNTPs und dNTPs als Energiequelle für ORF904. (a) Repräsentative 8%-ige PAA-Gele der Entwindungsreaktion von ORF904 in Abwesenheit (Spur -) und in Gegenwart von 2 mM rNTPs (Spur ATP, UTP, GTP, CTP). In den Ansätzen waren 0,05 μ M Protein und 5 nM 32 P markierte DNA-Triple-Helix enthalten. Als Kontrolle diente das auf Eis bzw. bei 95°C oder 45°C inkubierte Substrat. (b) wie (a) aber statt rNTPs wurden dNTPs (Spur dATP, dTTP, dGTP, dCTP) verwendet. Als zusätzliche Kontrolle diente ein Ansatz mit ATP. (c) Graphische Darstellung der Entwindungsaktivität in Gegenwart von NTPs und dNTPs. Die Aktivität ist relativ zur Entwindungsaktivität des Wt in Gegenwart von ATP angegeben. Zu sehen sind die Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Messungen mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Für SV40 L Tag wurde gezeigt, dass $ATP \approx dATP > dTTP > UTP \approx CTP \approx dCTP > GTP \approx dGTP$ für die Helikaseaktivität genutzt werden (Wiekowski *et al.*, 1988). Für BPV E1 war die Helikaseaktivität für alle NTPs und dATP gleich stark (Yang *et al.*, 1993). Für AAV Rep68 wurde gezeigt, dass $ATP \approx GTP > CTP \approx dATP > UTP > dGTP$ die Helikaseaktivität fördern, während mit dCTP und dTTP keine Helikaseaktivität nachgewiesen werden konnte (Zhou *et al.*, 1999). Für das P4 α -Protein wurde herausgefunden, dass $CTP > ATP \approx dATP \approx dGTP > GTP > dCTP$ für die Helikaseaktivität genutzt werden. Für UTP und dTTP konnte jedoch so gut wie keine Helikaseaktivität nachgewiesen werden (Ziegelin *et al.*, 1993). Und für das MCM aus *M. thermotrophicus* wurde für ATP und dATP Helikaseaktivität nachgewiesen, während für alle anderen rNTPs und dNTPs keine Aktivität nachweisbar war (Kelman *et al.*, 1999).

Dies zeigt, dass die hexameren Helikasen, selbst wenn sie der gleichen Superfamilie angehören, ihre eigenen Spezifitäten bezüglich der Nutzung von rNTPs bzw. dNTPs für die Helikaseaktivität haben. ATP scheint aber dennoch die bevorzugte Energiequelle zu sein oder zumindest immer unter den am besten genutzten Nukleosidtriphosphaten und Desoxynukleosidtriphosphaten zu liegen.

3.2.4 DNA-Bindung

3.2.4.1 EMSA-Experimente

Um die grundlegende Eigenschaft von Helikasen DNA, zu binden, für ORF904 und seine Deletionsmutanten zu überprüfen, wurden EMSA-Experimente durchgeführt. Hierzu wurden der Wt und seine Varianten mit ^{32}P -markierten, kurzen, einzelsträngigen bzw. doppelsträngigen Oligodesoxynukleotiden (49 bp) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Trennung der Protein-DNA-Komplexe und der freien DNA mittels nativer PAGE. Die Analyse mit dem InstantImager ließ jedoch keine Protein-DNA-Komplexe erkennen, selbst dann nicht, wenn ATP, ADP bzw. ATP-Analoga wie AMP-PnP oder γ -S-ATP im Ansatz enthalten waren. Ein möglicher Grund, warum die EMSA-Experimente nicht funktioniert haben, ist vermutlich die Kürze der Oligodesoxynukleotide, die nur relativ wenigen Proteinmolekülen eine Bindung ermöglichen. Ist diese Bindung an die DNA auch noch relativ schwach kann sich während des Gellaufs das Protein von der DNA lösen.

Mittels Gelelektrophorese konnte für das P4 α -Protein die Bindung an Restriktionsfragmente mit der *crr*- (*cis replication region*) oder *ori*- (*origin*) Sequenz nachgewiesen werden (Ziegelin *et al.*, 1993). Aus diesem Grund diente in einem weiteren EMSA-Experiment ein pUC_pRN1-Restriktionsverdau mit *RsaI* als Substrat, um die Bindekapazität der Deletionsmutanten des C-Terminus von ORF904 zu untersuchen. Das Plasmid enthielt die gesamte Sequenz von pRN1, und der Verdau mit *RsaI* ergibt 14 Fragmente mit Größen zwischen 136 und 1917 Basenpaaren.

Es wurde erwartet, dass die Deletionsmutanten präferentiell an ein Restriktionsfragment binden würden, um so die native DNA-Bindungsstelle zu entschlüsseln. Es zeigten jedoch alle Restriktionsfragmente eine reduzierte Mobilität. Das EMSA-Experiment in Abbildung 3-32 zeigt, dass das Volllängenprotein relativ stark an die DNA band, was zu einer stark reduzierten Mobilität der DNA im Gel führte. Unter den Deletionsmutanten zeigten K752 und K752G844, welches dem Minimalmotiv der vermeintlichen Winged-Helix-DNA-Bindedomäne entspricht, DNA-Bindung. Für D738 konnte keine Bindung gezeigt werden.

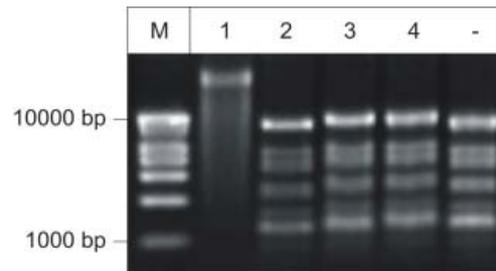


Abbildung 3-32: EMSA mit ORF904, D738, K752 und K752G844. 2 μ M Protein wurden mit 50 nM *Rsal* verdautem pUC_pRN1 in 1 Reaktionspuffer für 5 min bei RT inkubiert. Als Kontrolle diente *Rsal*-verdautes pUC_pRN1. Zu sehen sind in Spur M: der Eurogentec DNA-Standard; Spur 1: der Ansatz mit ORF904; Spur 2: der Ansatz mit D738; Spur 3: der Ansatz mit K753; Spur 4: der Ansatz mit K752G844 und Spur -: *Rsal*-verdautes pUC_pRN1.

Im Fall von BPV E1 konnte für ssDNA eine schwache Bindung in Abwesenheit von ATP nachgewiesen werden (Santucci *et al.*, 1990). Für Doppelstrang-DNA war diese Bindung ebenfalls schwach (Hu *et al.*, 2006), nahm aber bei Vorliegen der ori-Sequenz deutlich zu, wobei die spezifische Bindung von E1 an die Replikationsursprungssequenz durch das E2-Protein noch erheblich verstärkt wird (Sanders & Stenlund, 1998). Möglicherweise verhält es sich bei ORF904 ähnlich wie bei BPV E1, bei dem für eine spezifische Bindung an den Replikationsursprung weitere Proteine notwendig sind.

Um letztlich die DNA-Bindung von ORF904, der Helikasedomäne N371 und der vermeintlichen Winged-Helix-DNA-Bindedomäne K752G844 nochmals deutlich aufzuzeigen, wurde ein 200 bp langes PCR-Produkt im EMSA-Experiment eingesetzt.

Wie in Abbildung 3-33 zu sehen ist, konnte in Gegenwart des Wt und seiner Deletionsmutanten ein deutlich verzögertes Laufverhalten des PCR-Produkts im Agarosegel beobachtet werden. Der *Up-Shift* war für ORF904 am größten, dann folgte N371 und schließlich K752G844. Die Stärke der *Shifts* stimmt mit den Molekulargewichten der drei Proteine überein und macht deutlich, dass alle drei Proteine in der Lage sind, ATP-unabhängig Doppelstrang-DNA zu binden. Das leichte Schmierens von K752G844 liegt vermutlich an der nicht allzu starken Bindung des Proteins an die DNA.

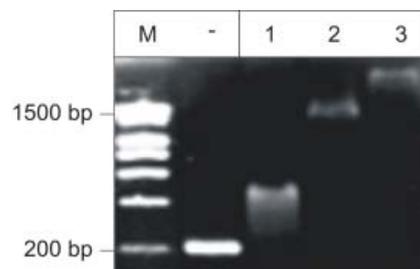


Abbildung 3-33: EMSA mit ORF904, N371 und K752G844. 2 μ M Protein wurden mit 2 μ l PCR-Produkt (200 bp) in 1 Reaktionspuffer für 5 min bei RT inkubiert. Als Kontrolle diente das PCR-Produkt. Zu sehen sind in Spur M: der Eurogentec DNA Standard; Spur -: das 200 bp PCR-Produkt; Spur 1: der Ansatz mit K752G844; Spur 2: der Ansatz mit N371 und in Spur 3: der Ansatz mit ORF904.

Vergleichbares wurde für MCM aus *M. thermotrophicus* gezeigt, das in Abwesenheit von ATP Doppelstrang-DNA bindet, jedoch weniger stark als Einzelstrang-DNA (Sakakibara *et al.*, 2008). Für die Bindung von Einzelstrang-DNA konnte gezeigt werden, dass sie in Gegenwart von ATP zunimmt (Kelman *et al.*, 1999). Es wurde zwar für MCM aus *M. thermotrophicus* auch gezeigt, dass ATP keinen Einfluss auf die Bindung von ssDNA hat (Jenkinson & Chong, 2006), dies ist aber vermutlich auf die Kürze des 12 Basen langen DNA-Substrats zurückzuführen, welches in der entsprechenden Publikation verwendet wurde. Dieses erschwert auf Grund der Translokation in Gegenwart von ATP die Ausbildung eines stabilen MCM-Komplexes auf der DNA. Wie für ORF904 wurde für die C-terminale Winged-Helix-DNA-Bindedomäne von *S. solfataricus* MCM gezeigt, dass sie weniger stark DNA bindet als das Vollängen-MCM oder die isolierte Helikasedomäne alleine (Pucci *et al.*, 2007). Für die SF3-Helikase SV40 L Tag (mit ATP) (Wang *et al.*, 2007) und AAV Rep40 (ohne ATP) (Yoon-Robarts *et al.*, 2004) konnte mittels EMSA eine schwache Bindung an ssDNA gezeigt werden. Für dsDNA hingegen zeigte nur SV40 L Tag, ähnlich wie BPV E1, eine schwache Bindung. Wenn das dsDNA-Substrat aber die ori-Sequenz trug, steigerte dies die Bindung erheblich (Kumar *et al.*, 2007). Für AAV Rep68 wurde eine dsDNA-Entwindung nur bei Vorliegen der RBE- (*Rep Binding Element*) Sequenz beobachtet, weswegen eine Bindung an dsDNA nur in Gegenwart der RBE-Sequenz angenommen wird (Zhou *et al.*, 1999).

Für ORF904 konnte mittels der EMSA-Experimente eine deutliche Bindung an Doppelstrang-DNA nachgewiesen werden. Möglicherweise reichte für ORF904, im Gegensatz zu SV40 L Tag und AAV Rep68, für eine spezifische Bindung an die DNA, das Vorliegen der ori-Sequenz alleine nicht aus. ORF904 benötigt unter Umständen die Anwesenheit weiterer Proteine, welche die Spezifität und Affinität der DNA-Bindung deutlich erhöhen sowie es auch für BPV E1 der Fall ist.

3.2.4.2 Anisotropie

3.2.4.2.1 Bestimmung von $K_{0,5}$ für die Helikasedomäne N371

Um die DNA-Bindekapazität von ORF904 und seinen Deletionsmutanten quantitativ zu bestimmen, wurde die Bindungsaffinität mittels Fluoreszenzanisotropie ermittelt. Als erstes wurde die Helikasedomäne bezüglich ihrer Bindungsaffinität untersucht. Als Einzelstrangsubstrat diente ein 25 Basen langes Oligodesoxynukleotid, welches am 3'-Ende mit Fluorescein markiert war, und als Doppelstrangsubstrat diente das mit seinem Komplementärstrang hybridisierte Oligodesoxynukleotid. Die Fluoreszenzanisotropie für N371 und das Substrat wurde in Abwesenheit und Gegenwart von γ -S-ATP, AMP-PnP, ADP und ATP gemessen.

Abbildung 3-34 zeigt die Graphen der Anisotropiemessungen mit den nach dem Hill-Bindungsmodell angepassten Datenpunkten. In Tabelle 3-8 sind die aus den Graphen ermittelten Minimal- und Maximalwerte der Dissoziationskonstanten für halbmaximale Bindung ($K_{0,5}$) aus 3 unabhängigen Messungen angegeben.

Tabelle 3-8: Mit dem Hill-Bindungsmodell ermittelte Dissoziationskonstanten für halbmaximale Bindung ($K_{0,5}$)* von N371 für ein 25 Basen langes ss- bzw. dsOligodesoxynukleotid in Abwesenheit bzw. Gegenwart unterschiedlicher ATP-Analoga.

ATP-Analogon	$K_{0,5}$ [nM]/ n (ss)	$K_{0,5}$ [nM]/ n (ds)
ohne	800-920/ 1,1-2,3	590-660 / 1,2-2,0
γ -S-ATP	1400-1700/ 1,6-2,1	530-800 / 1,4-2,6
AMP-PnP	730-760 / 1,4-1,6	440-510 / 1,4-2,5
ADP	450-750 / 1,1-1,2	390-480 / 1,0-1,3
ATP	270-390 1,2-1,8	290-300/ 1,5-1,6

*Angegeben sind der Minimal- und Maximalwert aus drei unabhängigen Messungen mit den dazugehörigen Hill-Koeffizienten (n)

Es ist deutlich zu erkennen, dass der Doppelstrang generell besser gebunden wird als der Einzelstrang und dass in Gegenwart der ATP-Analoga die Bindung an die DNA stärker erfolgt. Für ATP, den natürlich vorkommenden Energielieferanten, konnte die stärkste Bindung nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang mit der etwas erhöhten ATPase-Aktivität für dsDNA und die Induzierbarkeit der Translokations- und Entwindungsaktivität der Helikase durch ATP. Auch deutet der Hill-Koeffizient, der generell zwischen 1 und 2 liegt, darauf hin, dass zwischen den Untereinheiten der hexameren Helikase positive Kooperativität für die DNA-Bindung herrscht.

Bei der Bestimmung der Bindungskonstanten lag die Temperatur mit 25°C auch weit unter der optimalen Reaktionstemperatur von ORF904 (80°C). Es ist anzumerken, dass für das DNA-Bindungsprotein ORF56 von pRN1 aus *Sulfolobus islandicus* die stärkste Bindung bei 37°C beobachtet wurde, und nicht wie zu erwarten war bei höheren Temperaturen (Lipps *et al.*, 2001b). Daher kann es sich bei den in dieser Arbeit ermittelten Werten nur um Näherungen an die tatsächlichen Dissoziationskonstanten handeln.

Für SV40 L Tag wurden Anisotropiemessungen mit einem 80 Basen langen Oligodesoxynukleotid durchgeführt (Greenleaf *et al.*, 2008). Hier wurden in Abwesenheit von ATP ein $K_{0,5}$ von etwa 180 nM für ssDNA und ein $K_{0,5}$ von etwa 110 nM für dsDNA bestimmt. In Gegenwart des ATP-Analogons γ -S-ATP konnten die Werte für ssDNA zu etwa 65 nM und für dsDNA zu etwa 95 nM ermittelt werden. Dies deutet wie bei N371 darauf hin, dass die DNA-Bindung durch ATP verstärkt wird. Der Hill-Koeffizient war in allen Fällen für SV40 L Tag größer 1 und deutet auch hier auf eine Kooperativität zwischen den Untereinheiten hin. Der mittels Fluoreszenzanisotropie ermittelte K_D -Wert für das MCM aus *M. thermotrophicus* beträgt für ein 50 Basen langes Oligodesoxynukleotid 132 nM in Abwesenheit von ATP und 189 in Gegenwart von ATP (Sakakibara *et al.*, 2008). Dies zeigt, dass die ATP-Bindung einer hexameren Helikase nicht zwangsläufig zu einer Verstärkung der DNA-Bindung führen muss, wie es für N371 und SV40 L Tag der Fall ist.

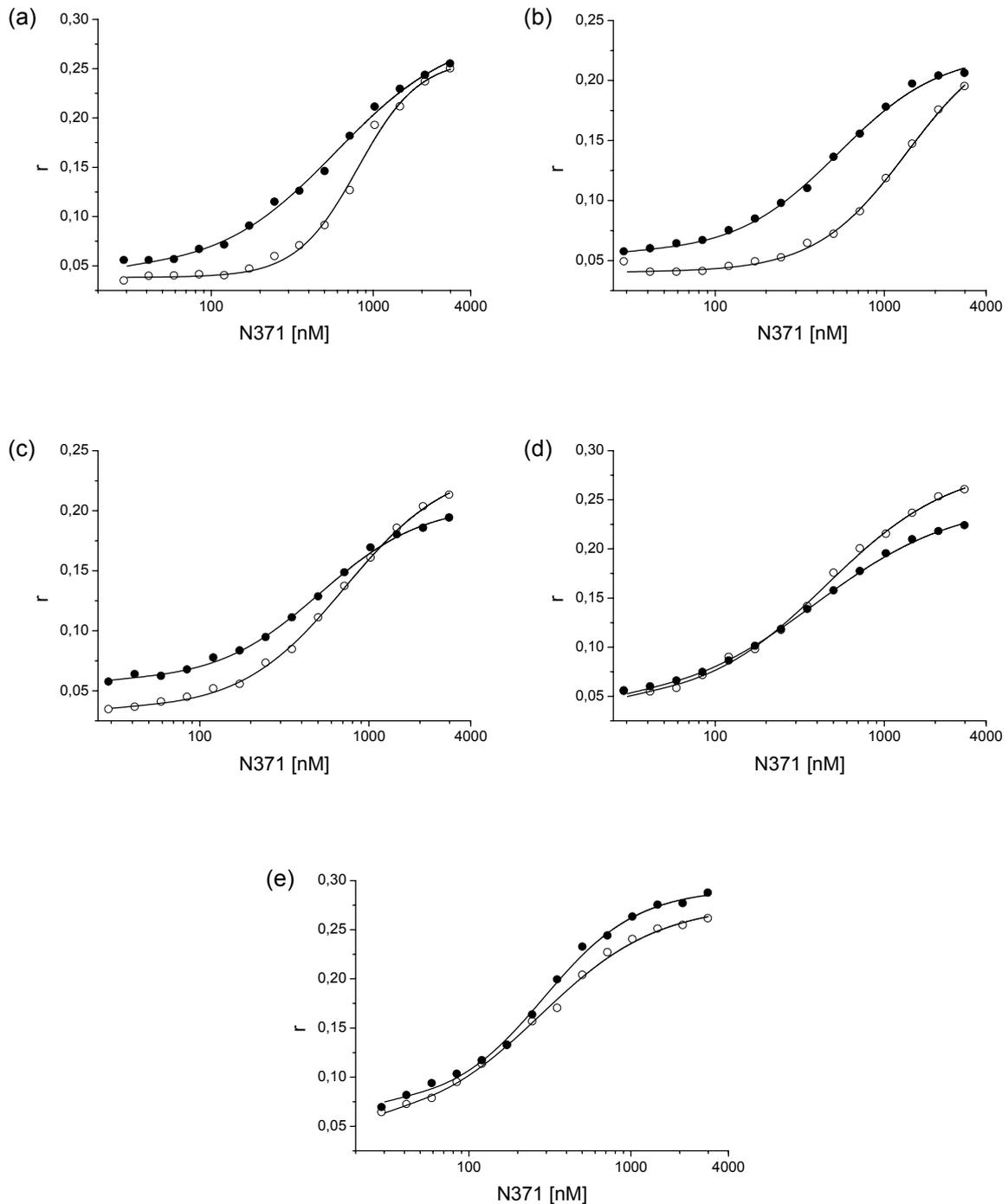


Abbildung 3-34: DNA-Bindung der ORF904-Deletionsmutante N371. (a) Datenpunkte der Fluoreszenzanisotropiemessung der reversen Titration von N371 mit einem 25 Basen langen und am 3'-Ende mit Fluorescein markierten Oligodesoxynukleotid. Die Datenpunkte für die ssDNA sind als weiße Kreise, die für die dsDNA als schwarze Kreise dargestellt. Die Linien repräsentieren den Anstieg der experimentellen Daten an die Hill-Gleichung. Zu sehen ist die Fluoreszenzanisotropie (r) in Abhängigkeit der Proteinkonzentration von N371 in nM. Die Proteinanzfangskonzentration betrug $3 \mu\text{M}$. Im Ansatz waren 20 nM DNA, 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM KCl, $0,01\%$ TWEEN 20 und 10 mM MgCl_2 enthalten. Die Messung wurde in einer 1-cm-Quarzküvette bei 25°C durchgeführt. Bei jedem Titrationsschritt erfolgte eine 30%-ige Verdünnung der Proteinkonzentration. (b) wie (a), aber zusätzlich 1 mM $\gamma\text{-S-ATP}$. (c) wie (a), aber zusätzlich 1 mM AMP-PnP. (d) wie (a), aber zusätzlich 1 mM ADP. (e) wie (a), aber zusätzlich 1 mM ATP. Die Dissoziationskonstanten wurden mit dem Hill-Bindungsmodell ermittelt und sind in Tabelle 3-8 aufgeführt.

3.2.4.2.2 Bestimmung von $K_{0,5}$ für ORF904 und seine Deletionsmutanten

Wie für N371 wurden auch für ORF904, N40C370, N371K752 und K752G844 die Dissoziationskonstanten mittels Fluoreszenzanisotropie bestimmt. Um vergleichbare Werte zu erhalten, wurde das gleiche 25 Basen lange Substrat wie für N371 verwendet. Die Messungen erfolgten für ss- und dsDNA nur in Abwesenheit bzw. Gegenwart von ATP, da es im Vergleich zu den ATP-Analoga die stärkste Änderung in der DNA-Bindung hervorrief (3.2.4.2.1).

Abbildung 3-35 (ohne ATP) und Abbildung 3-36 (mit ATP) zeigen die Graphen der Anisotropiemessungen mit den nach dem Hill-Bindungsmodell angepassten Datenpunkten. In Tabelle 3-9 sind die aus den Graphen ermittelten Minimal- und Maximalwerte der Dissoziationskonstanten für halbmaximale Bindung ($K_{0,5}$) aus 3 unabhängigen Messungen angegeben.

Tabelle 3-9: Ermittelte Dissoziationskonstanten für halbmaximale Bindung ($K_{0,5}$)* für ORF904 und die Deletionsmutanten N40C370, N371, N371K752 und K752G844 für ein 25 Basen langes ss- bzw. dsOligodesoxynukleotid in Abwesenheit bzw. Gegenwart von ATP.

Protein	$K_{0,5}$ [nM]/ n (ss)	$K_{0,5}$ [nM]/ n (ds)	$K_{0,5}$ [nM]/ n (ss, ATP)	$K_{0,5}$ [nM]/ n (ds, ATP)
ORF904	130-330/ 1,0-1,1	620-820/ 1,0-1,1	260-450/ 1,5	700-800/ 1,7-1,8
N40C370	720-780/ 1,3	4270-4300/ 0,8-0,9	5000-6500	>14000
N371	800-920/ 1,1-2,3	590-660/ 1,2-2,0	270-390/ 1,2-1,8	290-300/ 1,5-1,6
N371K752	2400-2700	1700-1900	430-460/ 1,7-2,2	820-900/ 1,3-1,4
K752G844	1500-1600/ 1,5-2,4	1700-2100/ 1,0-2,0		

*Angegeben sind der Minimal- und Maximalwert aus drei unabhängigen Messungen mit den dazugehörigen Hill-Koeffizienten (n).

Die DNA-Bindung von K752G844 ist für ssDNA etwas stärker als für dsDNA. Man findet für K752G844 sowohl für ss- als auch dsDNA positive Kooperativität, was mit dem Vorfinden des Dimers im Proteingel in Einklang steht (3.1.1.2). Wahrscheinlich war die Proteinprobe nicht ganz DNA-frei, was die Bildung eines Dimers förderte. Interessanterweise hat man für die isolierte DNA-Bindedomäne von HPV E1 für unspezifische dsDNA einen K_D von etwa 105 nM und für dsDNA mit zwei E1BS (*E1 Binding Site*) der ori-Sequenz einen K_D von etwa 7 nM nachgewiesen. Für dsDNA mit einer E1BS liegt der K_D bei etwa 95 nM. Kompetitor-DNA-Titrations mit HPV E1 (Aminosäuren 72 bis 649) und *origin*-DNA erlaubten es, ein IC_{50} von etwa 50 nM für unspezifische dsDNA und von 13 nM für dsDNA mit einer oder zwei E1BS-*origin*-Sequenzen zu bestimmen (Titolo *et al.*, 2003a). Es wird daher angenommen, dass die DNA-Bindedomäne von E1 als Dimer an die *origin*-DNA bindet und diese auch für die hohe Affinität und Spezifität der Bindung verantwortlich ist. Auch wurde für den transkriptionalen Aktivator Rfx gezeigt, dass zwei Monomere eine einzige DNA-Bindestelle auf

Doppelstrang-DNA binden (Gajiwala *et al.*, 2000). Und auch für das P4 α -Protein wird ein ähnlicher Mechanismus der DNA-Bindung über ein Dimer angenommen (Yeo *et al.*, 2002). Möglicherweise erfolgt die Bindung der DNA und des Replikationsursprungs durch die Winged-Helix-DNA-Bindedomäne in vergleichbarer Weise wie für E1, das P4 α -Protein oder Rfx (3.1.1.2). Ein eindeutiger Beweis steht hier jedoch noch aus, da die Sequenz des Replikationsursprungs von pRN1 noch nicht bekannt ist. An dieser Stelle sei aber auch angemerkt, dass bei der OBD (*Origin Binding Domain*) von SV40 L Tag die Dimerisierung offensichtlich keine Rolle bei der Bindung des Replikationsursprungs spielt (Titolo *et al.*, 2003b).

Bei der Helikasedomäne N371 sowie der Helikasedomäne ohne Winged-Helix-DNA-Bindedomäne N371K752 ist zu erkennen, dass die DNA-Bindung für dsDNA stärker als für ssDNA erfolgt. In Gegenwart von ATP nimmt die DNA-Bindung deutlich zu und ist für N371 für ds- und ssDNA nahezu identisch, was gut mit den Ergebnissen der ATPase-Aktivität übereinstimmt (3.2.1.3). N371K752 zeigt mit ATP hingegen eine stärkere Bindung für ssDNA, wobei die Bindung an die DNA generell weniger stark erfolgt als für N371. Auch dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der ATPase-Aktivität (3.2.1.3). Die Ursache hierfür scheint das Fehlen der Winged-Helix-DNA-Bindedomäne zu sein, die einerseits die Bindung an die DNA verbessert und zum anderen einen Einfluss auf die ATPase-Aktivität besitzt (3.2.1.3).

In Abwesenheit von ATP zeigt die Prim/Pol-Domäne N40C370 eine deutlich höhere Affinität für ssDNA im Vergleich zu dsDNA. Dies stimmt mit der Funktion dieser Domänen überein, in Gegenwart von ssDNA einen Primer zu synthetisieren (Beck & Lipps, 2007). Die Zugabe von ATP führt zu einer stark reduzierten DNA-Bindung, die für den Doppelstrang im Vergleich zum Einzelstrang deutlich stärker ausfällt. Die Ursache hierfür ist nicht bekannt.

In Abwesenheit von ATP bindet ORF904 ssDNA stärker als dsDNA. Aber auch in Gegenwart von ATP bindet der Wt im Gegensatz zu N371 ssDNA stärker als dsDNA, wobei der Wt im Vergleich zu N371 in Gegenwart von ATP eine geringere Affinität sowohl für ds- als auch für ssDNA besitzt. Es scheint, dass bei Nichtvorliegen der Erkennungssequenz die Prim/Pol-Domäne in der Lage ist, die DNA-Bindungsstelle der Helikasedomäne in Gegenwart von ATP zu verdecken; möglicherweise, um eine unspezifische Bindung an DNA zu erschweren. Dies lässt vermuten, dass die Bindung von ATP eine Konformationsänderung in der Prim/Pol- oder Helikasedomäne hervorruft. Eine Untersuchung der ATP-induzierten Konformationsänderung von ORF904 mittels limitierender Trypsin- und Chymotrypsin-Proteolyse (Dokudovskaya *et al.*, 2006) gab jedoch keinen Aufschluss.

Wie für N371 lässt sich auch für ORF904 und die übrigen Deletionsmutanten ein Hill-Koeffizient zwischen 1 und 2 finden. Dies lässt den Schluss zu, dass zwischen den Untereinheiten des Wt bzw. der Deletionsmutanten positive Kooperativität herrscht, wie sie auch für die SF3-Helikase SV40 L Tag beobachtet wurde (Greenleaf *et al.*, 2008). Eine Ausnahme bildet N40C370, bei der für den Doppelstrang bzw. in Gegenwart von ATP keine Kooperativität gezeigt werden konnte. Dies lässt sich mit großer Wahrscheinlichkeit auf die einzelstrangabhängige Funktion der Prim/Pol-Domäne zurückführen (siehe oben).

Es ist gut zu erkennen, dass sich in Abwesenheit von ATP die Dissoziationskonstanten der Deletionsmutanten in der Art und Weise ergänzen, dass sie sich der Dissoziationskonstante des Vollängenproteins annähern. Ein vergleichbares Ergebnis lieferten Anisotropiemessungen mit AAV

Rep68, das sich aus der AAA⁺-Domäne Rep40 und der OID (OriIn InterAction Domain) zusammensetzt und einen K_D von 23 nM für ssDNA aufweist. Rep40, die isolierte Helikasedomäne, hat einen K_D von etwa 3,5 μ M und OID einen K_D von etwa 130 nM (Mansilla-Soto *et al.*, 2009). Auch hier ergänzen sich die K_D s der isolierten Domänen bei Betrachtung der Dissoziationskonstante des Volllängenproteins.

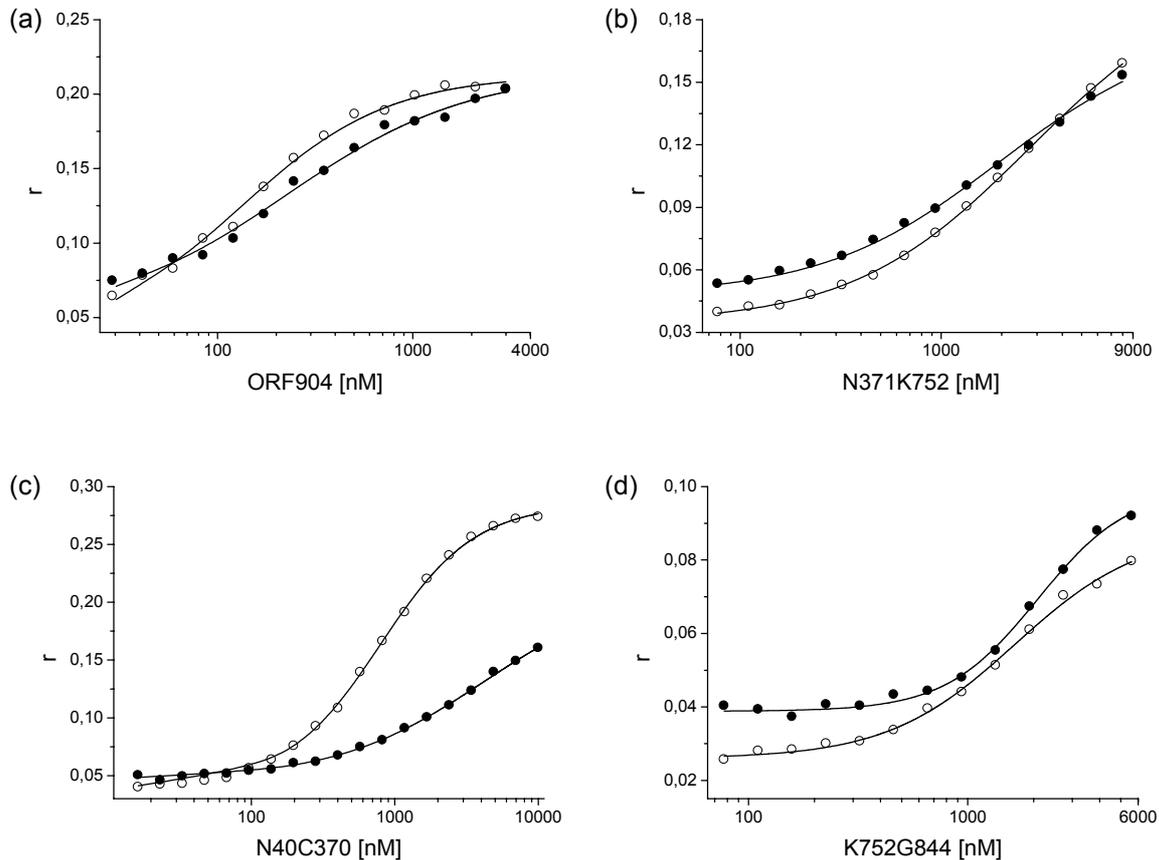


Abbildung 3-35: DNA-Bindung von ORF904 und den Deletionsmutanten N371K752, N40C370 und K752G844 in Abwesenheit von ATP. (a-d) Datenpunkte der Fluoreszenzanisotropiemessung der reversen Titration des entsprechenden Proteins mit einem 25 Basen langen und am 3'-Ende mit Fluorescein markierten Oligodesoxynukleotid. Die Datenpunkte für die ssDNA sind als weiße Kreise, die für die dsDNA als schwarze Kreise dargestellt. Die Linien repräsentieren den Angleich der experimentellen Daten an die Hill-Gleichung. Zu sehen ist die Fluoreszenzanisotropie (r) in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration des entsprechenden Proteins in nM. Die Proteinanzfangskonzentration betrug für ORF904 3 μ M, für N371K752 8 μ M, für N40C370 10 μ M und für K752G844 6 μ M. Im Ansatz waren 20 nM DNA, 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM KCl, 0,01% TWEEN 20 und 10 mM $MgCl_2$ enthalten. Die Messung wurde in einer 1-cm-Quarzküvette bei 25°C durchgeführt. Bei jedem Titrationsschritt erfolgte eine 30%-ige Verdünnung der Proteinkonzentration. Die Dissoziationskonstanten wurden nach dem Hill-Bindungsmodell ermittelt und sind in Tabelle 3-9 aufgeführt.

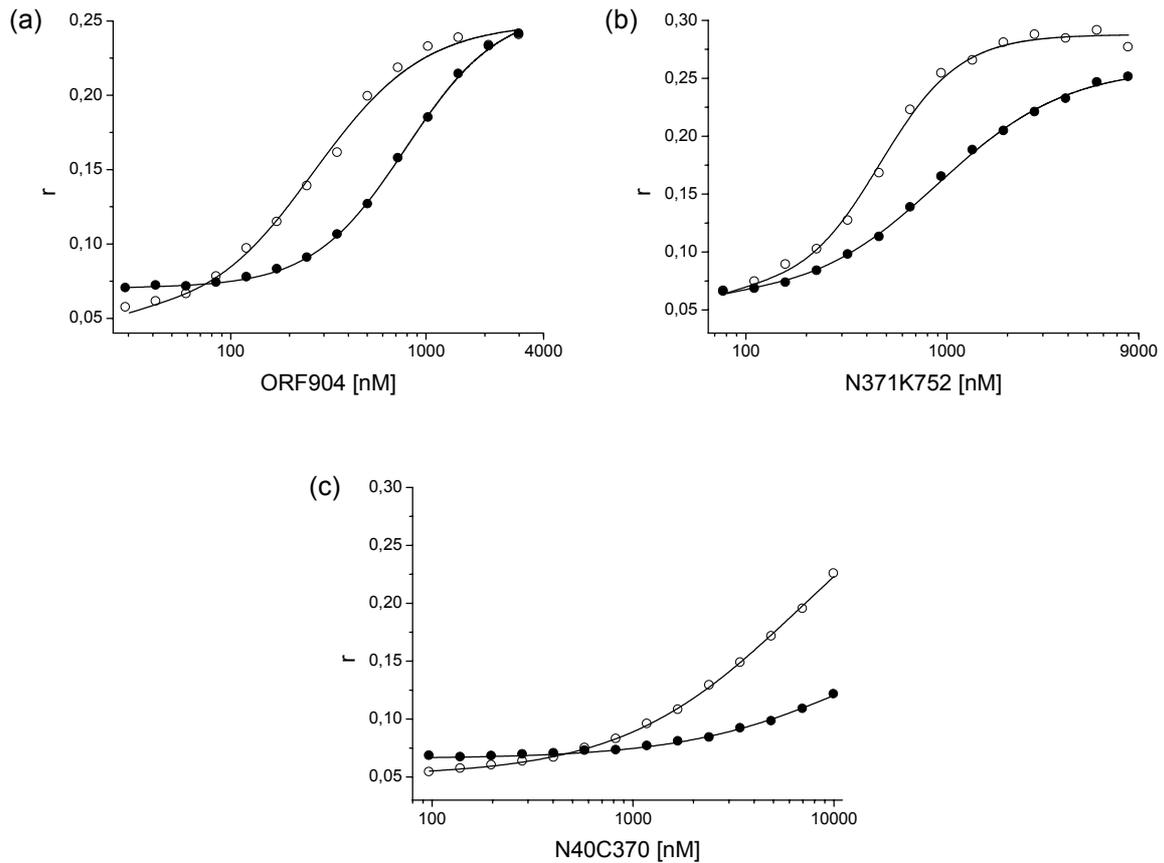


Abbildung 3-36: DNA-Bindung von ORF904 und den Deletionsmutanten N371K752 und N40C370 in Gegenwart von ATP. (a-c) Datenpunkte der Fluoreszenz-anisotropiemessung der reversen Titration des entsprechenden Proteins mit einem 25 Basen langen und am 3'-Ende mit Fluorescein markierten Oligodesoxynukleotid. Die Datenpunkte für die ssDNA sind als weiße Kreise, die für die dsDNA als schwarze Kreise dargestellt. Die Linien repräsentieren den Angleich der experimentellen Daten an die Hill-Gleichung. Zu sehen ist die Fluoreszenzanisotropie (r) in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration des entsprechenden Proteins in nM. Die Proteinanfangskonzentration betrug für ORF904 3 μ M, für N371K752 8 μ M und für N40C370 10 μ M. Im Ansatz waren 20 nM DNA, 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM KCl, 0,01% TWEEN 20, 10 mM $MgCl_2$ und 1 mM ATP enthalten. Die Messung wurde in einer 1-cm-Quarzküvette bei 25°C durchgeführt. Bei jedem Titrationsschritt erfolgte eine 30%-ige Verdünnung der Proteinkonzentration. Die Dissoziationskonstanten wurden nach dem Hill-Bindungsmodell ermittelt und sind in Tabelle 3-9 aufgeführt.

Für N40C370 konnte gezeigt werden, dass die DNA-Bindung sequenzspezifisch erfolgt. Für ein 17 Basen langes einzelsträngiges Oligodesoxynukleotid mit GTG-Bindemotiv konnte der $K_{0,5}$ zu ca. 225 nM bestimmt werden. Ohne Bindemotiv sank die Affinität auf etwa 1200 nM (Beck & Lipps, 2007). Für das doppelsträngige 17 Basen lange Substrat ohne Bindemotiv wurde ein $K_{0,5}$ von etwa 2100 nM ermittelt.

Es war von Interesse, zu überprüfen, welchen Einfluss das GTG-Bindemotiv auf die Bindung der Prim/Pol-Domäne von dsDNA ohne und mit ATP hat. Abbildung 3-37 zeigt die Graphen der Anisotropiemessungen mit den nach dem Hill-Bindungsmodell angepassten Datenpunkten für das 17 Basen lange einzelsträngige bzw. doppelsträngige Oligodesoxynukleotid mit GTG-Bindemotiv in Gegenwart bzw. Abwesenheit von ATP. In Tabelle 3-10 sind die aus den Graphen ermittelten Minimal- und Maximalwerte der Dissoziationskonstanten für halbmaximale Bindung aus 3 unabhängigen Messungen angegeben.

Tabelle 3-10: Ermittelte Dissoziationskonstanten für halbmaximale Bindung ($K_{0,5}$)* von N40C370 für ein 17 Basen langes ss- bzw. dsOligodesoxynukleotid mit GTG-Sequenzmotiv in Abwesenheit bzw. Gegenwart von ATP.

Protein	$K_{0,5}$ [nM]/ n (ss)	$K_{0,5}$ [nM]/ n (ds)	$K_{0,5}$ [nM]/ n (ss, ATP)	$K_{0,5}$ [nM]/ n (ds, ATP)
N40C370	225-230	950-1040	90-110/ 0,5-0,6	2100-2500/ 0,4

*Angegeben sind der Minimal- und Maximalwert aus drei unabhängigen Messungen mit den dazugehörigen Hill-Koeffizienten (n).

Wie auch für das 25 Basen lange Substrat ohne GTG zeigte sich, dass der Einzelstrang in Abwesenheit wie auch in Gegenwart von ATP stärker gebunden wird als der Doppelstrang. Für den Doppelstrang mit GTG-Motiv ging jedoch die DNA-Bindung mit ATP weniger stark zurück als für den Doppelstrang ohne GTG-Motiv (Vergleich der Werte von N40C370 aus Tabelle 3-9 mit 3-10). Während bei dem Substrat ohne GTG-Bindemotiv die Affinität für den Einzelstrang in Gegenwart von ATP zurückging, nahm in Gegenwart von ATP der $K_{0,5}$ für den Einzelstrang mit GTG-Motiv mit 90-110 nM einen halb so hohen Wert an.

Dies zeigt, dass das Vorliegen des GTG-Bindemotivs zum einen die DNA-Bindung der Prim/Pol-Domäne auch für dsDNA erhöht und zum anderen, dass ATP diesen Effekt für den Einzelstrang bei Vorliegen des GTG-Motivs noch weiter verstärkt. Dies steht im Einklang mit dem Befund, einen Primer beginnend mit einem ATP zu synthetisieren (Beck & Lipps, 2007). Außerdem besteht die Möglichkeit, dass bei Vorliegen der Erkennungssequenz die Prim/Pol-Domäne die Helikasedomäne bei der Bindung an die Doppelstrang-DNA unterstützt.

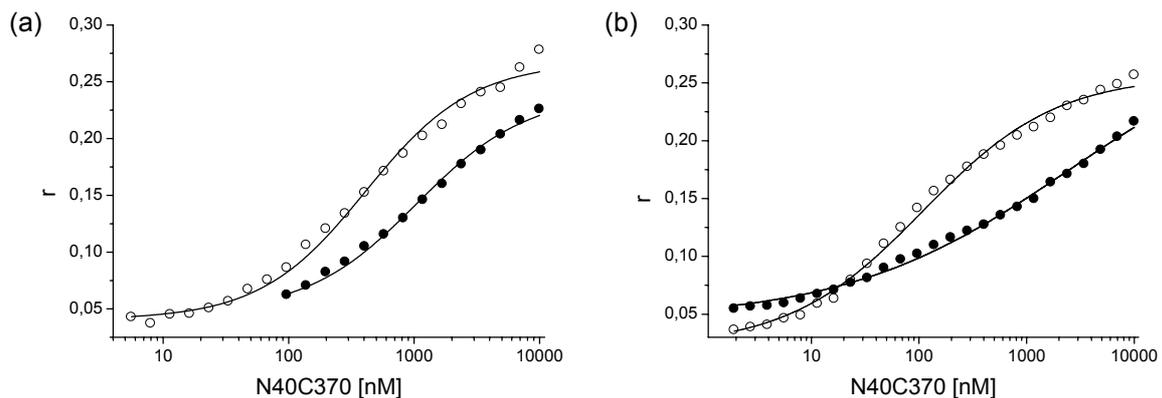


Abbildung 3-37: Sequenzspezifische DNA-Bindung der ORF904-Deletionsmutante N40C370. (a) Datenpunkte der Fluoreszenzanisotropiemessung der reversen Titration von N40C370 mit einem 17 Basen langen und am 3'-Ende mit Fluorescein markierten Oligodesoxynukleotid in Abwesenheit von ATP. Die Datenpunkte für die ssDNA sind als weiße Kreise, die für die dsDNA als schwarze Kreise dargestellt. Die Linien repräsentieren den Angleich der experimentellen Daten an die Hill-Gleichung. Zu sehen ist die Fluoreszenzanisotropie (r) in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration von N40C370 in nM. Die Proteinanfangskonzentration betrug 10 μ M. Im Ansatz waren 20 nM DNA, 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM KCl, 0,01% TWEEN 20 und 10 mM $MgCl_2$ enthalten. Die Messung wurde in einer 1-cm-Quarzküvette bei 25°C durchgeführt. Bei jedem Titrationsschritt erfolgte eine 30%-ige Verdünnung der Proteinkonzentration. (b) wie (a), aber zusätzlich war im Ansatz 1 mM ATP enthalten. Die Dissoziationskonstanten wurden mit dem Hill-Bindungsmodell ermittelt und sind in Tabelle 3-10 aufgeführt.

3.3 Bestimmung des Replikationsursprungs von pRN1

3.3.1 DNase-I-Nuklease-Footprint

Aus Deletionsanalysen mit pRN1 war bereits bekannt, dass eine ca. 200 bp lange Region stromabwärts von *orf904* für die Plasmidreplikation essentiell ist (Berkner & Lipps, unveröffentlicht). Dieser Bereich bildet eine ausgeprägte *Stemloop*-Struktur aus und war bereits bei der Sequenzierung des Plasmids aufgefallen (Keeling *et al.*, 1996). Um den Replikationsursprung von pRN1 zu lokalisieren, wurden bereits LM-PCR und ein Primersynthese-Experiment mit einzelsträngiger pRN1-Plasmid-DNA durchgeführt (Beck, 2008). Da die Experimente keine eindeutigen Ergebnisse lieferten, wurden *Footprint*-Experimente mit der *Stemloop*-Region und ORF904 und seinen Deletionsmutanten durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurde ein PCR-Produkt generiert, das die Sequenz der *Stemloop*-Region trägt und unter den experimentellen Bedingungen die gewünschte Sekundärstruktur ausbildet (Abbildung 3-38). Die Sekundärstrukturvorhersage wurde mit dem Programm Mfold (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/>) durchgeführt. Dieses berechnet anhand von Energieminima optimale und suboptimale Sekundärstrukturen, die das PCR-Produkt annehmen kann. Der Vergleich der Sekundärstruktur der ausgewählten Region im nativen Sequenzkontext und der isolierten Form verdeutlicht, dass in beiden Fällen die *Stemloop*-Struktur ausgebildet wird.

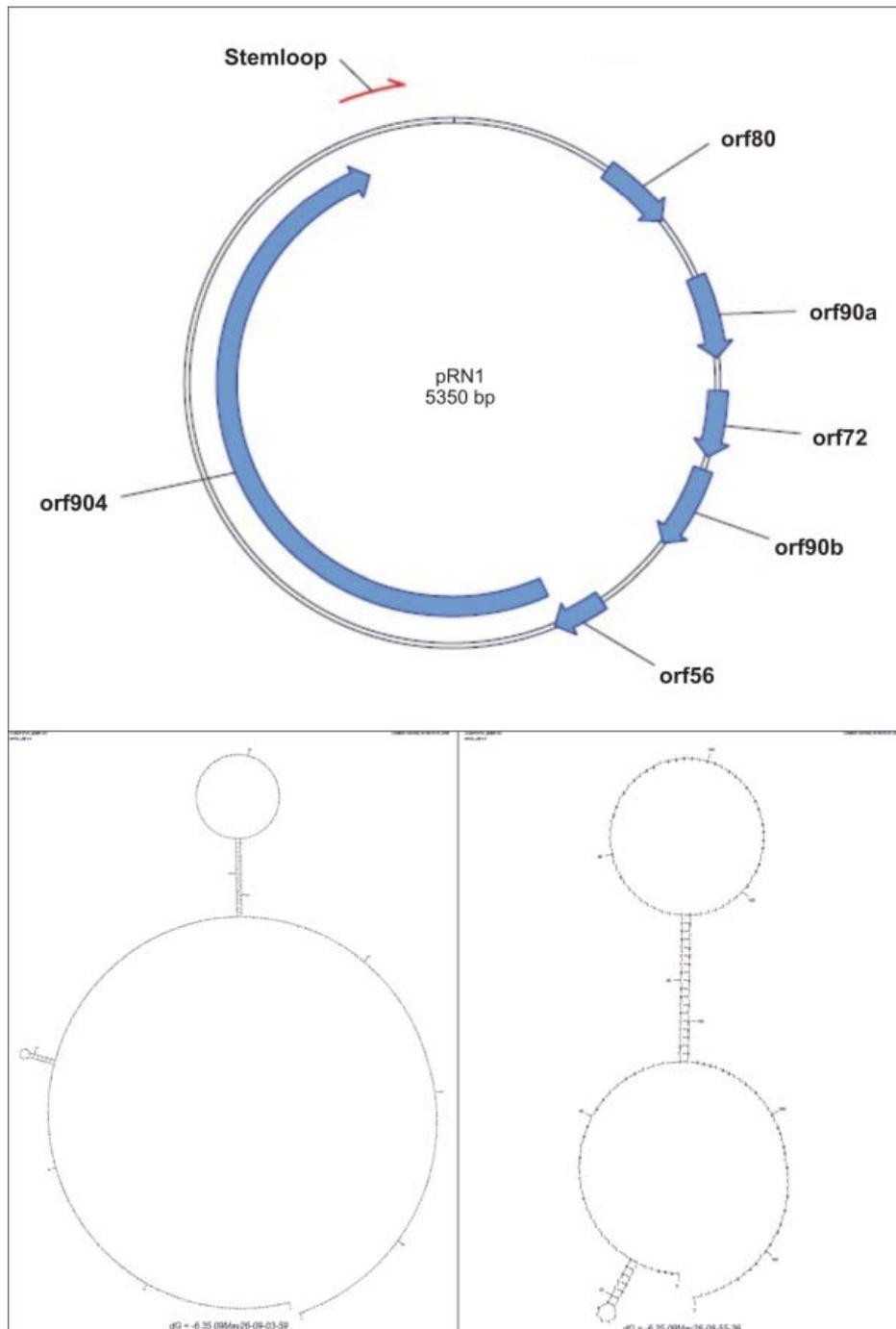


Abbildung 3-38 Der vermutete Replikationsursprung von pRN1. (a) Position der essentiellen *Stemloop*-Region in pRN1. (b) Sekundärstruktur der *Stemloop*-Region im Kontext von pRN1 (Kontext = + 100 bp 5' und 3' vom PCR-Produkt). (c) Sekundärstruktur des für die *Footprint*-Analysen verwendeten PCR-Produkts der *Stemloop*-Region (191 bp). Die Sekundärstruktur wurde mit Mfold ($T = 60^{\circ}\text{C}$; 100 mM NaCl; 10 mM MgCl_2) bestimmt.

Unter der Voraussetzung, dass das Wt-Protein bzw. die Deletionsmutanten sequenzspezifisch an den Replikationsursprung von pRN1 binden, sollte es durch limitierenden DNase-I-Verdau (Connaghan-Jones *et al.*, 2008) möglich sein, etwaige Basen, die durch die Proteinbindung vor dem Verdau geschützt waren, auf einem Sequenzigel zu identifizieren und so die Bindungsstelle des Proteins und den möglichen Replikationsursprung aufzuklären.

Für SV40 L Tag (ohne ATP) konnte die Bindung an den Replikationsursprung mittels DNase-I-*Footprint* bestätigt und durch die SF3-Helikase-geschützten Basen identifiziert werden (DeLucia *et al.*, 1983; Sanders & Stenlund, 1998). In Abbildung 3-39 ((a) u. (b)) ist der DNase-I-*Footprint* für den Wt, die Helikasedomäne N371 und die Winged-Helix-DNA-Bindedomäne K752G844 mit dem 191 bp langen PCR-Produkt der *Stemloop*-Region zu sehen.

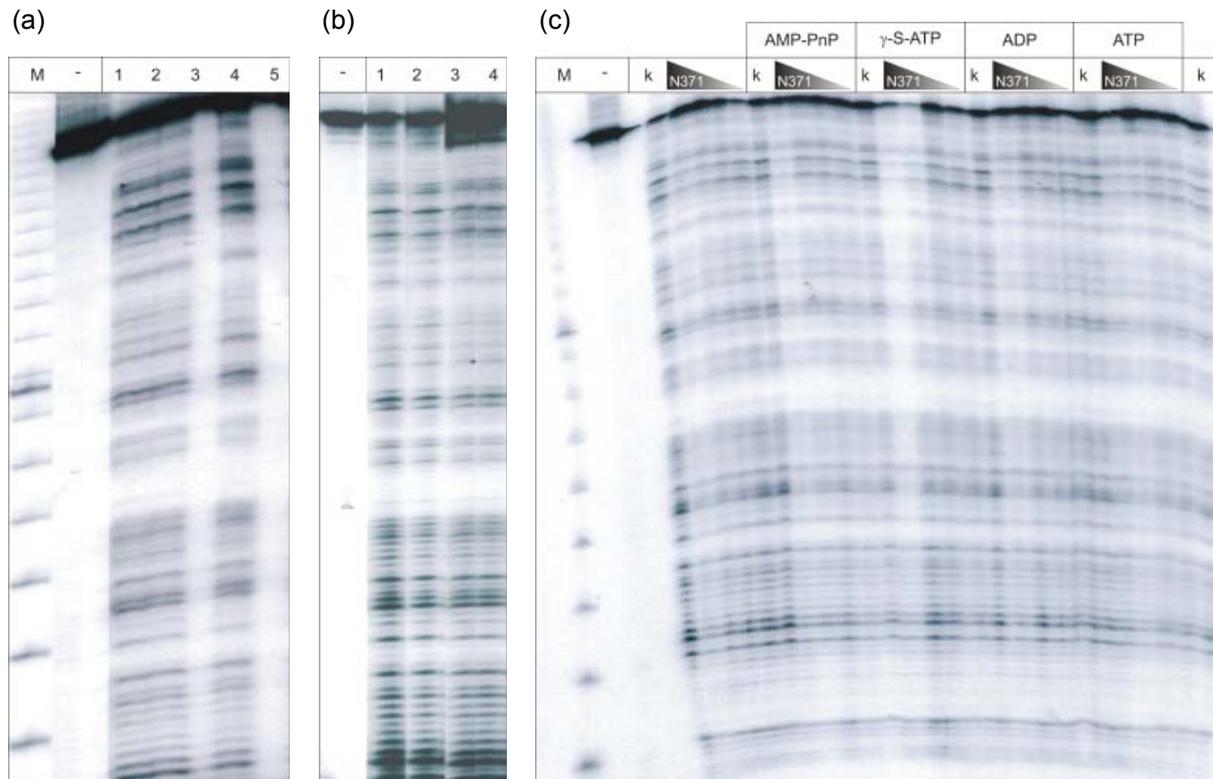


Abbildung 3-39: DNase-I-Nuklease-*Footprint*-Experimente mit dem PCR-Produkt der *Stemloop*-Region von pRN1. (a) Mit ^{32}P markiertes PCR-Produkt wurde mit 500 bzw. 50 nM ORF904 bzw N371 in 1x Reaktionspuffer für 10 min bei 60°C inkubiert. Durch Zugabe von DNase-I-Puffer und 0,01 U/μl DNase I erfolgte der Nukleaseverdau für 1,5 min bei RT. Als Kontrollen dienten das PCR-Produkt und DNase-I-verdautes PCR-Produkt in Abwesenheit von Protein. Zu sehen sind in Spur M: Invitrogen 10 bp DNA-Leiter; Spur -: PCR-Produkt; Spur 1: PCR-Produkt + 1,5 min DNase I; Spur 2: PCR-Produkt + 50 nM ORF904 + 1,5 min DNase I; Spur 3: PCR-Produkt + 500 nM ORF904 + 1,5 min DNase I; Spur 4: PCR-Produkt + 50 nM N371 + 1,5 min DNase I und Spur 5: PCR-Produkt + 500 nM N371 + 1,5 min DNase I.

(b) wie (a) aber mit 50 nM K752G844. Der Verdau wurde mit 0,25 U/μl DNase I für 1 bzw. 2 min durchgeführt. Zu sehen sind in Spur -: PCR-Produkt; Spur 1: PCR-Produkt + 1 min DNase I; Spur 2: PCR-Produkt + 2 min DNase I; Spur 3: PCR-Produkt + Protein + 1 min DNase I; Spur 4: PCR-Produkt + Protein + 2 min DNase I.

(c) DNase-I-Nuklease-*Footprint* mit dem PCR-Produkt der *Stemloop*-Region von pRN1 und N371 in Gegenwart unterschiedlicher ATP-Analoga. Mit ^{32}P markiertes PCR-Produkt wurde mit 100, 200, 300 bzw. 400 nM Protein in 1x Reaktionspuffer mit 1 mM des entsprechenden ATP-Analogons für 10 min bei 60°C inkubiert. Durch Zugabe von DNase-I-Puffer und 0,01 U/μl DNase I erfolgte der Nukleaseverdau für 1,5 min bei RT. Als Kontrollen dienten das PCR-Produkt und DNase-I-verdautes PCR-Produkt in Abwesenheit von Protein. Zu sehen sind in Spur M: Invitrogen 10 bp DNA-Leiter; Spur -: PCR-Produkt; Spur k: PCR-Produkt + 1 mM entsprechendes ATP-Analogon + 1,5 min DNase I und Steigungsdreieck: sinkende Konzentration an N371 + 1mM entsprechendes ATP-Analogon + 1,5 min DNase I.

In den Gelen ist kein Unterschied zwischen der Kontrollspur (mit DNase I verdautes PCR-Produkt) und den Probenspuren (mit DNase I verdautes PCR-Produkt in Gegenwart von Protein) zu erkennen. Unter den experimentellen Bedingungen konnte keine sequenzspezifische Bindung für das Vollängenprotein oder die isolierten Domänen nachgewiesen werden.

Für BPV E1 konnte eine deutliche Änderung des DNase-I-Verdaumusters in Gegenwart von E2 und ATP aber nicht von ADP oder AMP-PnP festgestellt werden, weswegen davon ausgegangen wird, dass die Aufschmelzung des Replikationsursprungs die Hydrolyse von ATP voraussetzt (Gillette *et al.*, 1994; Sanders & Stenlund, 1998). Abbildung 3-39 (c) zeigt das *Footprint*-Experiment für die Helikasedomäne N371 in Gegenwart von ATP und ATP-Analoga. Aber auch in diesem Gel ist kein Unterschied zwischen der Kontrollspur (mit DNase I verdautes PCR-Produkt) und den Probenspuren (mit DNase I verdautes PCR-Produkt in Gegenwart von Protein) zu sehen. Möglicherweise scheiterte ein Nachweis der Bindung an den vermeintlichen Replikationsursprung auf Grund des Fehlens von weiteren für die spezifische Erkennung und Bindung relevanten Proteinen.

Generell ließ sich für die beiden SV40 L Tag und BPV E1 zeigen, dass Wiederholungssequenzen im Bereich des Replikationsursprungs als Erkennungsstelle dienen. Diese konnten im vermeintlichen Replikationsursprung von pRN1 nicht ausgemacht werden.

3.3.2 KMnO₄-Footprint

Für E1 und SV40 L Tag konnten die aus den DNase-I-*Footprints* erhaltenen Daten durch KMnO₄-*Footprints* bestätigt werden (Schuck & Stenlund, 2007; Kumar *et al.*, 2007). Mit Hilfe des Oxidationsmittels KMnO₄ ist es möglich, Thymidinreste in der DNA in Thyminglykol zu überführen (Spicuglia *et al.*, 2004). Die DNA ist dann nach der Modifikation an dieser Stelle mit Piperidin spaltbar. Voraussetzung für eine effiziente Oxidationsreaktion ist allerdings eine gute Zugänglichkeit der Thyminbasen. Sind diese durch die Bindung eines Proteins geschützt, unterbleibt die Oxidationsreaktion oder findet weniger ausgeprägt statt. Bei anschließender limitierender Hydrolyse der modifizierten DNA mit Piperidin lassen sich die geschützten Basen auf einem Sequenziergel identifizieren. Mit Hilfe von *Footprint*-Experimenten konnte für AAV Rep78 (ohne ATP) gezeigt werden, dass die palindromische terminale *Loop*-Region für eine stabile Bindung an die ITR (*Inverted Terminal Repeats*)-Sequenzen des Replikationsursprungs nicht notwendig ist (Chiorini *et al.*, 1994). Für den KMnO₄-*Footprint* wurde deshalb ein PCR-Produkt verwendet, das sich auf die 100 bp direkt stromabwärts von *orf904* ohne die *Stemloop*-Struktur beschränkte.

In Abbildung 3-40 ist das Ergebnis des KMnO₄-*Footprints* für den Wt, die Helikasedomäne N371 und die Winged-Helix-DNA-Bindedomäne K752G844 zu sehen. Es ist zu erkennen, dass die Signale in den Kontrollspuren schwächer ausfallen als in den Probenspuren. Das liegt vermutlich daran, dass sich beim Auftragen wahrscheinlich ein Teil der Proben nicht in den Taschen sammelte.

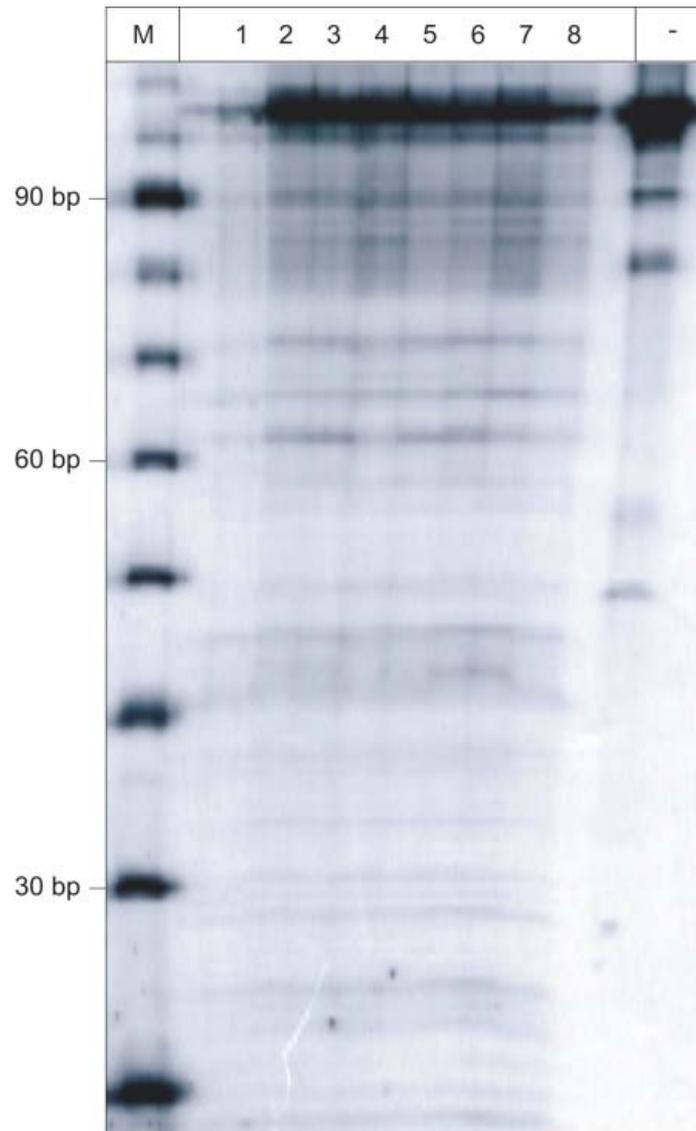


Abbildung 3-40: KMnO_4 -Footprint mit dem PCR-Produkt der Sequenz direkt stromabwärts von *orf904*, ORF904, N371 und K752G844. Mit ^{32}P markiertes PCR-Produkt wurde mit 250 bzw. 500 nM Protein in 1x Reaktionspuffer für 10 min bei 60°C inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation mit 6 mM KMnO_4 für 2 min bei RT, anschließend eine Inkubation mit KMnO_4 -Footprint-Stoppuffer für 20 min bei 30°C . Nach Extraktion der DNA wurde diese in einer 1 M Piperidinlösung für 25 min bei 90°C inkubiert. Als Kontrollen dienten das PCR-Produkt und mit KMnO_4 prozessiertes PCR-Produkt in Abwesenheit von Protein. Zu sehen sind in Spur M: Invitrogen 10 bp DNA-Leiter; Spur 1: prozessiertes PCR-Produkt; Spur 2: PCR-Produkt + 500 nM ORF904; Spur 3: PCR-Produkt + 500 nM N371; Spur 4: PCR-Produkt + 500 nM K752G844; Spur 5: PCR-Produkt + 250 nM ORF904; Spur 6: PCR-Produkt + 250 nM N371; Spur 7: PCR-Produkt + 250 nM K752G844; Spur 8: prozessiertes PCR-Produkt und Spur -: nicht prozessiertes PCR-Produkt.

Die Spuren 2 und 3 mit den hohen Proteinkonzentrationen von ORF904 und N371 zeigen im Vergleich zu den Spuren 5 und 6 mit den niedrigeren Proteinkonzentrationen generell für alle Banden ein etwas schwächeres Signal. Dies ist auf eine unspezifische DNA-Bindung von ORF904 und N371 in Gegenwart hoher Proteinkonzentrationen zurückzuführen.

Ganz anders bei den Spuren 4 und 7. Zwar sind auch hier die Signale bei hohen Proteinkonzentrationen auf Grund unspezifischer DNA-Bindung von K752G844 generell etwas

schwächer, darüber hinaus ist aber zwischen 80 und 90 bp zusätzlich ein deutlich schwächeres Signal zu erkennen. Und auch zwischen 60 und 70 bp sind drei deutlich schwächere Signale und somit geschützte Basen zu sehen. Um welche Basen es sich hier genau handelt, lässt sich anhand dieses Gels nur sehr schwer sagen. Dazu wären weitere *Footprint*-Analysen notwendig. Die gefundenen Signale liefern aber unter Umständen erste Hinweise darauf, dass ORF904 den Replikationsursprung möglicherweise durch seine potentielle Winged-Helix-DNA-Bindedomäne eigenständig erkennt. Dies scheint plausibel, da Winged-Helix-DNA-Bindeproteine unter den plasmidären, viralen und chromosomalen Replikationsinitiatoren stark vertreten sind (Giraldo, 2003). Außerdem ist interessant, dass sich im Bereich der durch K752G844 geschützten Basen auch ein GTG-Motiv befindet, das als Erkennungssequenz für die Prim/Pol-Domäne dienen könnte, um die Bindung an dsDNA zu verstärken. Dies würde mit den Ergebnissen aus den Fluoreszenzanisotropiemessungen im Einklang stehen.

Möglicherweise scheiterte die eindeutige Aufklärung des Replikationsursprungs daran, dass noch weitere Proteine an seiner Erkennung beteiligt sind und erst durch ihr Wechselwirken mit ORF904 dessen spezifische Affinität zur Doppelstrang-DNA genügend erhöht wird, um ein Aufschmelzen des Replikationsursprungs nachweislich zu gewährleisten. So wie es für das E1- und E2-Protein des Papillomavirus oder bei der weitaus komplexeren eukaryotischen und archaealen chromosomalen Replikationsinitiation der Fall ist, bei der die DNA-Beladung mit dem MCM-Protein mit Hilfe von z.B. ORC und Cdc6 erfolgt (Gaudier *et al.*, 2007; Giraldo, 2003; Jenkinson & Chong, 2003; Liu *et al.*, 2000)

4 Zusammenfassende Diskussion

4.1 Strukturinformationen zur Helikase von ORF904

In dieser Arbeit wurde die Helikaseaktivität von ORF904 genauer untersucht. Helikasen sind Proteine, die unter NTP- oder dNTP-Verbrauch doppelsträngige DNA entwinden können. Diese Enzyme sind in den Reichen der Bakterien, Eukaryoten und Archaea für die Replikationsinitiation sowie die Replikation an sich essentiell. ORF904 ist den Superfamilie 3 (SF3)-Helikasen zuzuordnen. Bei Mitgliedern dieser Superfamilie handelt es sich vor allem um virale Helikasen. Ebenso wie die SF4-, 5- und 6-Helikasen bilden SF3-Helikasen hexamere Ringstrukturen aus, womit sie sich von den SF1- und SF2-Helikasen unterscheiden, die als Monomere oder Dimere ihre Funktion erfüllen. Alle SF3-Helikasen haben einen modifizierten AAA⁺-Kernbereich gemeinsam, der die Nukleotidbindemotive in den zentralen β -Strängen trägt, sowie mehrere integrierte *Loops*, die an der DNA-Bindung oder Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt sind (Singleton *et al.*, 2007).

Für alle Helikasen konnten das Walker A Motiv, Walker B Motiv und ein Argininfinger gefunden werden, die an der Koordination und Hydrolyse von ATP beteiligt sind. Ein Sequenzvergleich mit dem P4 α -Protein und dem Poxvirus D5-Protein ließen auch für ORF904 das Walker A Motiv und den Argininfinger erkennen. Erst ein Homologiemodell von ORF904 mit den SF3-Helikasen des Papillomavirus Typ 18, des Adeno-assoziierten Virus 2 und des Simianvirus 40 ermöglichte es, weitere für SF3-Helikasen spezifische Sequenzmotive zu identifizieren. Zu diesen zählten das Motiv C, welches vermutlich an der ATP-Hydrolyse beteiligt ist, ein potentieller „Lysinfinger“ der die Nukleotidbindetasche in *trans* kontaktiert, das für die Verknüpfung von DNA-Bindung und ATP-Hydrolyse verantwortliche Walker B' Motiv und der β -Hairpin, der in die zentrale Pore des hexameren Rings ragt und den Kontakt zur DNA herstellt. Der Sequenzvergleich des C-terminalen Bereichs von ORF904 (Aminosäuren 752-844) mit den Replikationsproteinen von Plasmiden der pRN-Familie, der DNA-Bindedomäne des P4 α -Proteins und des eukaryotischen Transkriptionsregulators Rfx ließen für ORF904 zusätzlich eine Winged-Helix-DNA-Bindedomäne erkennen. Generell zeigt ORF904 in seiner Domänenorganisation große Ähnlichkeit zum P4 α -Protein, das auch eine N-terminale Primase-Domäne, eine zentrale AAA⁺-Helikasedomäne und eine C-terminale Winged-Helix-DNA-Bindedomäne besitzt (Ziegelin *et al.*, 1995). Und auch zum MCM, das den SF6-Helikasen zuzuordnen ist, und sich von den SF3-Helikasen durch das Vorliegen eines β - α - β Inserts in Helix 2 zwischen Walker A Motiv und Walker B Motiv unterscheidet sind Ähnlichkeiten zu erkennen. Hier folgt auf die AAA⁺-Helikasedomäne eine wHTH (*winged Helix Turn Helix*) DNA-Bindedomäne (Jenkinson & Chong, 2006).

Wie für andere SF3-Helikasen auch wurden in den Sequenzmotiven von ORF904 kritische Aminosäurereste mutiert und deren Relevanz für die Funktionen der Helikase untersucht sowie Deletionsmutanten zur Identifikation des Minimalmotivs der Helikase- und der Winged-Helix-DNA-Bindedomäne analysiert. Die Walker A-Mutante K586E war bereits untersucht worden und zeigte wie erwartet keinerlei ATPase-Aktivität (Lipps *et al.*, 2003). Dies war für die weitere Charakterisierung von ORF904 von Interesse, da sämtliche Varianten des Wt identisch aufgereinigt wurden und so ausgeschlossen werden konnte, dass eine Verunreinigung durch eine *E. coli*-ATPase vorlag.

Anhand von CD-Messungen und thermischen Denaturierungen konnte gezeigt werden, dass sich das Volllängenprotein und die Deletionsmutanten der Primase/Polymerasedomäne N40C370 (Aminosäuren 40-370), der Helikasedomäne N371 (Aminosäuren 371-904), der Helikasedomäne beginnend im Kernbereich N527 (Aminosäuren 527-904), der Helikasedomäne ohne Winged-Helix-DNA-Bindedomäne N371K752 (Aminosäuren 371-752) und der Winged-Helix-DNA-Bindedomäne K752G844 (Aminosäuren 752-844) in eigenständige stabile Domänen falten. Die Ermittlung des α -helikalen Anteils von ORF904 mit etwa 33% stimmt gut mit dem aus der Summe der α -helikalen Anteile der isolierten Domänen unter Berücksichtigung der Aminosäurezahl überein. Im Vergleich hierzu, haben die SF3-Helikasen E1 aus BPV einen α -helikalen Anteil von 36% (Rocque *et al.*, 2000) und SV40 L Tag einen α -helikalen Anteil von etwa 46%. Die Unterschiede in der Sekundärstruktur ergeben sich durch Regionen, die außerhalb des Helikasekernbereichs liegen, der bei allen SF3-Helikasen die gleiche Topologie aufweist. Die Schmelztemperaturen von ORF904 und seinen Varianten liegen mit etwa 85-89°C recht dicht beieinander. Die Ausnahme bildet die isolierte Primasedomäne mit einem Schmelzpunkt von etwa 100°C. Dies ist möglicherweise darin begründet, dass die isolierte Primasedomäne vermutlich kompakter vorliegt als in Verbindung mit den anderen Domänen zusammen und dadurch ihre Oberfläche verkleinert ist. Die hohen Schmelztemperaturen unterstreichen für alle Proteine zweifellos deren thermophilen Charakter (Kumar & Nussinov, 2001) und deuten mit den CD-Spektren darauf hin, dass sie sich in eigenständige stabile Domänen falten.

Um Aufschluss über die Quartärstruktur von ORF904 zu erlangen, wurden Sedimentationsanalysen durchgeführt. Im Glyceringradienten lag ORF904 selbst in Gegenwart von ATP und DNA in Lösung als Monomer vor (Lipps, unveröffentlicht). Für die SF3-Helikase E1 konnte hingegen gezeigt werden, dass sie in Gegenwart von unspezifischer DNA hexamerisiert (Sedman & Stenlund, 1998). Um auszuschließen, dass die Prim/Pol-Domäne eine Hexamerisierung im Gradienten erschwert oder möglicherweise verhindert, wurde die Helikasedomäne ohne Prim/Pol-Domäne (N371) einer Ultrazentrifugation unterzogen. Zusätzlich sollte ein chemischer *Crosslink* mittels Glutaraldehyd (0,15%) unter limitierenden Bedingungen die Hexamerisierung von N371 in Gegenwart von ATP und DNA stabilisieren. Auch das Glutaraldehyd im Glyceringradienten sollte zu einer Stabilisierung des Multimers beitragen. Für N371 konnte wie auch für das Volllängenprotein nur das Monomer in Lösung nachgewiesen werden. Für die SF3-Helikase AAV Rep68 konnte erst in Gegenwart eines DNA-Substrats, welches die Replikationsursprungssequenz trägt, ein Multimer im Gradienten nachgewiesen werden (Mansilla-Soto *et al.*, 2009). Möglicherweise verhält es sich mit ORF904 und N371 ähnlich, und erst ein DNA-Substrat mit der Replikationsursprungssequenz von pRN1 gewährleistet eine spezifische, stabile Bindung an die DNA. Um die Multimerisierung weiter zu untersuchen, wurde ein *Crosslink* von N371 in Gegenwart von 0,2% Glutaraldehyd durchgeführt und auf einem PAA-Gel analysiert. Das Vorhandensein von DNA, ATP oder ATP-Analoga in den Ansätzen hatte keinen Einfluss auf die Bildung der nur schwach erkennbaren Dimere, Trimere und höheren Oligomerisierungszustände. *Crosslink*-Experimente mit den SF3-Helikasen BPV E1 und AAV Rep78 haben gezeigt, dass sie nur in Gegenwart von DNA-Substraten mit Replikationsursprungssequenz deutlich sichtbare Oligomere ausbilden (Fouts *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1997). Unter Umständen bildet das Vorliegen von Replikationsursprungs-DNA wie für die Sedimentationsanalysen die Voraussetzung für die Ausbildung von Hexameren. Dies konnte jedoch nicht weiter untersucht werden, da der

Replikationsursprung von pRN1 nicht bekannt ist. Einen deutlichen Hinweis für die Ausbildung von hexameren Strukturen lieferten letztlich die TEM- und Cryo-TEM-Aufnahmen von ORF904 und N371. In Gegenwart des ATP-Analogons AMP-PnP und dsDNA bildeten die beiden Proteine 15 nm große Partikel aus. Diese waren für N527 bzw. bei Fehlen von DNA im Ansatz nicht zu sehen. Dies deutet darauf hin, dass die Region vor dem Kernbereich von ORF904, wie für andere SF3-Helikasen auch (Hickman & Dyda, 2005), bei der Multimerisierung eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Für HPV E1 und SV40 L Tag konnte gezeigt werden, dass der Verlust der Region vor dem AAA⁺-Kernbereich die Ausbildung eines Hexamers verhindert (Abbate *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2003).

Die Hexamerisierung von ORF904 erfolgt offensichtlich nur in Gegenwart von DNA und ATP bzw. einem ATP-Analogon. Für die SF3-Helikase SV40 L Tag wurde gezeigt, dass sie in Gegenwart von ADP oder AMP-PnP (ohne DNA) 12 nm große Partikel bildet, die bei Überlagerung einzelner mit Uranylformiat kontrastierter Partikel, wie bei ORF904 und N371 auch, Sechsfachsymmetrie aufweisen (San Martin *et al.*, 1997). Für die SF3-Helikase BPV E1 konnten mittels Elektronenmikroskopie 14,5 nm große Partikel mit einer Sechsfachsymmetrie gezeigt werden. Diese bildeten sich in Gegenwart von DNA (ohne ATP) aus (Fouts *et al.*, 1999). Die Ausbildung einer hexameren Struktur haben alle SF3-Helikasen gemeinsam, die Voraussetzungen dafür sind aber für jede Helikase individuell.

An dieser Stelle ist aber auch zu erwähnen, dass neueste Erkenntnisse aus Sedimentationsanalysen und elektronenmikroskopischen Aufnahmen der SF3-Helikase AAV Rep68 darauf hinweisen, in Gegenwart von ssDNA oder dsDNA mit 3'-Überhang doppeloktamere Strukturen auszubilden (Mansilla-Soto *et al.*, 2009).

4.2 Charakterisierung der enzymatischen Aktivitäten der Helikasedomäne

4.2.1 ATPase-Aktivität

Die ATP-Hydrolyse stellt die Grundvoraussetzung für die Translokation der Helikasen und für die Entwindung der DNA dar. Mit γ -[³²P]-ATP wurde das Hydrolysevermögen von ORF904 untersucht. Es war bereits bekannt, dass die ATPase-Aktivität von ORF904 durch Doppelstrang-DNA stark (10fach), durch Einzelstrang-DNA nur schwach (2-3fach) und durch RNA gar nicht stimuliert wird (Lipps *et al.*, 2003). Die SF3-Helikase AAV Rep40 zeigt ähnlich wie ORF904 eine 8fach erhöhte ATPase-Aktivität in Gegenwart von dsDNA, die für Rep40, aber auch für ssDNA, gezeigt werden konnte (Yoon-Robarts *et al.*, 2004). Die SF3-Helikase E1 aus BPV wird durch ssDNA stimuliert (2,5fach), durch dsDNA aber gar nicht (Santucci *et al.*, 1995). Die SF6-Helikase MCM aus *M. thermautotrophicus* zeigt in Gegenwart von Φ X174-ssDNA eine etwa 13fach erhöhte und in Gegenwart von kurzer ssDNA und dsDNA eine etwa 11fach erhöhte ATPase-Aktivität (Kelman *et al.*, 1999). Das eukaryotische MCM4,6,7 zeigt hingegen in Gegenwart von dsDNA so gut wie keine Erhöhung seiner ATPase-Aktivität (Ishimi, 1997). Und die SF4-Helikase T7g4p ist in Gegenwart von ssDNA 10mal stärker aktiv als ohne oder mit dsDNA (Bernstein & Richardson, 1989).

Der Vergleich von ORF904 mit anderen SF3-Helikasen und Helikasen anderer Superfamilien veranschaulicht, dass die ATPase-Aktivität stimulierenden Nukleinsäuresubstrate von Helikasen, selbst wenn sie derselben Superfamilie angehören, ganz unterschiedlich sein können.

Alle diese Helikasen bilden hexamere Ringstrukturen um die DNA aus. Diese Ringstrukturen sind aber auch bei anderen an der Replikation beteiligten Proteinen zu finden und bieten den Vorteil, dass das Protein mit der DNA einen geschlossenen Komplex bildet, was die Dissoziation des Proteins von der DNA erschwert. In Wechselwirkung mit der entsprechenden Polymerase kann der Protein-DNA-Komplex die Prozessivität der Polymerase erhöhen. Eine hohe Prozessivität ist gerade bei der Replikation von entscheidender Bedeutung. Um die Prozessivität von ORF904 zu untersuchen, wurde das ATP-Hydrolysevermögen von ORF904 in Gegenwart langer (8311 bp) und kurzer (49 bp) linearer und zirkulärer DNA-Substrate unter limitierenden Bedingungen untersucht. Es stellte sich jedoch heraus, dass unter den experimentellen Bedingungen, die langen Substrate, auf denen eine prozessive Translokation möglich ist, gegenüber den kurzen Substraten nicht bevorzugt wurden, sondern beide Substrate die ATPase-Aktivität gleichermaßen stimulierten. Dies legt nahe, dass es sich bei ORF904 wahrscheinlich nicht um eine prozessive Helikase handelt, im Gegensatz zu MCM und den SF3-Helikasen SV40 L Tag und AAV Rep68, die imstande sind, Substrate mit einer Länge von 500, 1200 und 1371 Basenpaaren zu entwinden (Shechter *et al.*, 2000; Wiekowski *et al.*, 1988; Zhou *et al.*, 1999).

Die zeitabhängigen Untersuchungen der ATPase-Aktivität von ORF94 erlaubten es, die biochemischen Parameter K_M und k_{cat} für ATP und DNA zu ermitteln. In Gegenwart von dsDNA konnte der K_M für ATP zu 0,4 mM und der k_{cat} zu $0,7 \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden. Der K_M für DNA betrug bei konstanter ATP-Konzentration 70 nM.

Die Untersuchung der ATPase-Aktivität der Deletionsmutanten von ORF904 ließ Parallelen zur Domänenorganisation des P4 α -Proteins und anderer SF3-Helikasen erkennen. Wie für das P4 α -Protein konnte für N371 gezeigt werden, dass trotz Verlust der Primasedomäne die ATPase-Aktivität erhalten bleibt (Ziegelin *et al.*, 1995; Ziegelin *et al.*, 1997). Ebenso wie für N371K752, für das ein sehr starker Rückgang der ATPase-Aktivität zu verzeichnen war, wurde bei der Untersuchung der Deletionsmutanten des P4 α -Proteins ohne die C-terminalen ori-Bindedomäne der Verlust der ATPase-Aktivität festgestellt (Ziegelin *et al.*, 1997). Und auch der Verlust des Bereiches vor dem Helikasekernbereich (N527) führt sowohl bei ORF904 als auch bei dem P4 α -Protein zu einem Verlust der ATPase-Aktivität (Ziegelin *et al.*, 1997). Dies ist vermutlich auf das Fehlen der Hexamerisierungsdomäne zurückzuführen, die bei SF3-Helikasen in dieser Region liegt (Hickman & Dyda, 2005). Die Ergebnisse stehen im Einklang mit dem Translokationsmechanismus von SF3-Helikasen, bei denen die Hexamerisierung die Voraussetzung für die Argininfinger bildet, entscheidend an der ATP-Hydrolyse in benachbarten Untereinheiten mitzuwirken (Enemark & Joshua-Tor, 2008; Ogura *et al.*, 2004) um eine Translokation auf der DNA zu ermöglichen.

Die Untersuchung der Punktmutanten von ORF904 ließen weitere Parallelen zu SF3-Helikasen erkennen und bekräftigten die Ergebnisse aus den Deletionsmutantenanalysen. Wie für ORF904 und seine Punktmutanten des „Lysinfingers“ K574A und des Argininfingers R690A wurde auch für die Mutationen des homologen „Lysin-“ und Argininfingers der SF3-Helikase SV40 L Tag eine starke Abnahme der ATPase-Aktivität gefunden (Greenleaf *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2007). Dies lässt sich durch die Tatsache erklären, dass die beiden Aminosäurereste die Nukleotidbindetasche in *trans* kontaktieren. Bei der Alaninmutante der Aminosäure R689 von ORF904 wurde eine ATPase-Restaktivität beobachtet. Der starke Rückgang der ATPase-Aktivität ist hier vermutlich auf die

räumliche Nähe zum tatsächlichen Argininfinger R690 zurückzuführen. In Gegenwart von dsDNA zeigten die Mutationen des β -Hairpins von ORF904 K656A, K657A, K656/657A und R659A sowie die Mutationen im β -Hairpin von SV40 L Tag keinen großen Einfluss auf die ATPase-Aktivität (Greenleaf *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007). Dies lässt sich durch die räumliche Entfernung dieser Aminosäurereste zur Nukleotidbindetasche erklären.

Interessanterweise war jedoch die ATPase-Aktivität der β -Hairpin-Mutanten in Gegenwart von ssDNA deutlich erhöht. Wie bereits erwähnt, bildet die Hexamerisierung um die DNA die Voraussetzung für die Argininfinger, mit dem ATP einer benachbarten Untereinheit in Kontakt zu treten, um die ATP-Hydrolyse zu ermöglichen. Offensichtlich kann bereits der Austausch einer einzigen Aminosäure im β -Hairpin die Hexamerisierung in Gegenwart von ssDNA und die daraus folgende ATP-Hydrolyse bedeutend beeinflussen. Der kumulative Effekt des Austauschs von sechs Aminosäuren im Bereich der zentralen Pore scheint für dieses Phänomen verantwortlich zu sein.

Um zu untersuchen, welchen Effekt die Mutation des Argininfingers auf die Kooperativität der Untereinheiten von ORF904 bei der ATP-Hydrolyse hat, wurde die Komplementation des Wt-Proteins durch die Argininfingermutante R690A analysiert. Dabei nahm die ATPase-Aktivität des Wildtyps bei Zunahme des Anteils der ATPase-defekten Punktmutante im Ansatz linear ab. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis liefert das *probabilistic model*, bei dem trotz Vorliegen defekter Untereinheiten im Multimer auf Grund eines hohen Maßes an Flexibilität des Enzyms seine Funktion, wenn auch mit einer geringeren Umsatzrate, weiterhin gewährleistet ist, wie man z.B. für die hexamere AAA⁺-Protease ClpX zeigen konnte (Martin *et al.*, 2005). Eine andere Erklärung liefern die Beobachtungen die für die SF3-Helikase E1 gemacht wurden. Hier konnten mittels Gelfiltrationschromatographieexperimenten gezeigt werden, dass bereits die Mutation eines einzigen Aminosäurerests im Kernbereich der Helikasedomäne die Hexamerisierung der Helikase empfindlich stören kann (Castella *et al.*, 2006a).

4.2.2 Translokationsaktivität

Anhand einzelsträngiger biotinylierter und radioaktiv markierter Oligodesoxynukleotide, die mit Streptavidin abgesättigt waren, wurde das Vermögen von ORF904 untersucht, das Streptavidin zu verdrängen. Dies sollte Aufschluss über die Translokationsaktivität und Polarität von ORF904 geben.

Generell kann eine Helikase 3'-5'- oder 5'-3'-Polarität besitzen, abhängig davon, in welcher Richtung sie sich auf dem Nukleinsäurestrang bewegt. Für alle SF3-Helikasen, wie z.B. SV40 L Tag (Morris *et al.*, 2002) oder das P4 α -Protein (Ziegelin *et al.*, 1993), wurde 3'-5'-Polarität nachgewiesen. Auch ORF904 und die isolierte Helikasedomäne N371 weisen 3'-5'-Polarität auf, was einen weiteren Beleg für die Zugehörigkeit zu den SF3-Helikasen liefert. Die hexamere SF6-Helikase MCM aus *M. thermautotrophicus* zeigt ebenfalls 3'-5'-Polarität (Kelman & Kelman, 2003).

Für MCM konnte auch gezeigt werden, dass es auf dsDNA transloziert, jedoch die Beladung der DNA mit MCM einen 3'-Überhang voraussetzt (Shin *et al.*, 2003). Auch für ORF904 hätte man auf Grund seiner hohen ATPase-Aktivität in Gegenwart von dsDNA erwartet, dass es das Streptavidin auf einem biotinylierten doppelsträngigen Oligodesoxynukleotiden verdrängt. Eine Translokation auf dsDNA konnte mit diesem Experiment nicht, mit Entwindungsexperimenten jedoch schon nachgewiesen werden. Bei Translokation von ORF904 auf dem Doppelstrang ist vermutlich die Bindung des

Streptavidins an das Biotin zu stark ($K_D 10^{-14} \text{ M}^{-1}$), als dass dieses verdrängt werden könnte. Möglicherweise ändert ORF904 auf dem Doppelstrang-Substrat seine Richtung, wenn es auf das Streptavidin trifft, indem es Kontakt zum gegenüberliegenden DNA-Strang aufnimmt oder einfach abdissoziiert. Dies würde zumindest erklären, warum man kein Signal für die Translokation auf dsDNA erhält.

Eine 5'-3'-Aktivität konnte für ORF904 und N371 nur in geringem Maß nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich vermutlich um eine unspezifische und spontane Aktivität der beiden Proteine. Generell ist die Aktivität von N371 höher als vom Wt, was im Einklang mit seiner erhöhten ATPase-Aktivität steht. Die Verdrängung des Streptavidins konnte für beide Proteine nur in Gegenwart von ATP, jedoch nicht in Abwesenheit von ATP nachgewiesen werden. Dies macht deutlich, dass die Translokation ATP-abhängig ist. Die Helikase beginnend mit dem AAA^+ -Kernbereich N527 ist translokationsdefizient. Wie für die fehlende ATPase-Aktivität ist auch dies vermutlich auf das Fehlen der vermeintlichen Hexamerisierungsdomäne vor dem AAA^+ -Kernbereich zurückzuführen (Hickman & Dyda, 2005).

Bei den Punktmutanten zeigte sich, dass der Aminosäurerest K574 trotz seines relativ starken Einflusses auf die ATPase-Aktivität nur einen geringen Einfluss auf die Translokationsaktivität hat. Es ist daher anzunehmen, dass es sich bei K574 nicht um den eigentlichen „Lysinfinger“ handelt.

Die Mutation von basischen Aminosäureresten im β -Hairpin führte bei der SF3-Helikase AAV Rep40 zu einem Verlust der DNA-Bindung (Yoon-Robarts *et al.*, 2004). Ebenso führten bei ORF904 die Mutationen von K656, K657 und K656/57 zu einem starken Rückgang der Translokationsaktivität, der für K657A und K656/57A stärker ausgeprägt war. Dies lässt die Annahme zu, dass es sich bei K657A um das Lysin im β -Hairpin handelt, welches den Kontakt zur DNA herstellt. Der Rückgang der Translokationsaktivität für R659A lässt sich durch die räumliche Nähe zu K657 erklären. Die Mutation stört vermutlich direkt oder indirekt die Funktion von K657. Die Translokationsaktivität der Alaninpunktmutanten des Argininfingers R690, von R689 und der Doppelmutante R689/90 ging gegen Null, was mit deren fehlender ATPase-Aktivität im Einklang steht.

Anhand der zeitabhängigen Untersuchung der Translokationsaktivität wurde die Translokationsrate von ORF904 zu etwa $6,2 \cdot 10^{-4} \text{ b s}^{-1}$ bestimmt. Die Translokationsrate von ORF904 konnte auf Grund der Thermoinstabilität des Substrats nur bei 50°C statt optimalen 80°C gemessen werden. Es ist anzunehmen, dass die Translokationsgeschwindigkeit von ORF904 höher liegt. Dennoch deuten die niedrigen Werte zusammen mit den Ergebnissen der Prozessivität darauf hin, dass es sich bei der Translokation vermutlich nur um eine Hintergrundaktivität handelt.

4.2.3 Entwindungsaktivität

Wie bereits erwähnt, sind die Hauptaufgaben von SF3-Helikasen, den Replikationsursprung zu erkennen, diesen aufzuschmelzen und die Entwindung der DNA einzuleiten. Um diese Aktivitäten von ORF904 zu untersuchen, wurde das Protein mit und ohne ATP in Gegenwart des replikationsursprungstragenden Plasmids pUC_pRN1 inkubiert. Die durch die Entwindung frei werdenden Einzelstrangbereiche sollten dem einzelstrangverdauenden Enzym S1 Nuklease zugänglich werden und so den Anteil an linearisierter Plasmid-DNA im Ansatz erhöhen. Eine Zunahme linearisierter Plasmid-DNA konnte nicht beobachtet werden. Es konnte jedoch gezeigt

werden, dass ORF904 die Plasmid-DNA vor dem Verdau schützt. Ob es zu einer Entwindung kam und ORF904 die frei werdenden Einzelstrangbereiche gebunden oder die dsPlasmid-DNA von vornherein der S1 Nuklease unzugänglich gemacht hat, lässt sich nicht sagen.

Die eigentliche Entwindungsaktivität von ORF904 wurde mit kurzen radioaktiv markierten Oligodesoxynukleotiden nachgewiesen. Ein DNA-Substrat mit 3'- und 5'-Überhang stellt das bevorzugte Substrat ringförmiger Helikasen wie der SF3-Helikasen dar. Dessen Entwindung wurde unter anderem für SV40 L Tag (Wang *et al.*, 2007), BPV E1 (Sedman & Stenlund, 1998), P4 α -Protein (Ziegelin *et al.*, 1993), AAV Rep (Zhou *et al.*, 1999) und auch MCM aus *M. thermautotrophicus* (Sakakibara *et al.*, 2008) nachgewiesen. ORF904 zeigt für dieses Substrat die höchste Aktivität. Wie die SF3-Helikase BPV E1 könnte ORF904 an eine der Einzelstrangregionen des Substrates binden und dann die Einzelstrang-DNA aktiv durch die zentrale Pore transportieren (Enemark & Joshua-Tor, 2006). Der andere Strang der DNA würde dabei sterisch ausgeschlossen werden, was zu einer Entwindung des Doppelstrangbereichs des Substrats führen würde.

Für ein dsSubstrat mit glatten Enden konnte ebensowenig eine Aktivität nachgewiesen werden wie für ein Substrat mit 3'- oder 5'-Überhang. Möglicherweise verhält es sich bei ORF904 wie bei SV40 L Tag oder AAV Rep, bei denen das dsSubstrat mit den glatten Enden nur bei Vorliegen der Replikationsursprungssequenz gezeigt werden konnte (Wang *et al.*, 2007). Bei dem Substrat mit dem 3'-Überhang transloziert die Helikase vermutlich erst auf dem Einzelstrangbereich, um dann auf den Doppelstrang zu wechseln, wie es für die Ringhelikase MCM4,6,7 bereits gezeigt wurde (Kaplan *et al.*, 2003). Das Unvermögen von ORF904, das Substrat mit dem 5'-Überhang zu entwinden, steht im Zusammenhang mit seiner 3'-5'-Polarität. Die Entwindung dieses Substrats konnte bis jetzt für keine SF3-Helikase gezeigt werden. Dies zeigt, dass ORF904 eine ähnliche Präferenz bei der Entwindung von DNA-Substraten wie die SF3-Helikasen besitzt und die Entwindung wahrscheinlich nach dem *strand exclusion model* erfolgt.

Um die Translokation auf dsDNA und deren Entwindung zu untersuchen, wurde ein dsSubstrat mit internem 5'-Überhang verwendet. Um den internen 5'-Überhang sterisch auszuschließen, musste ORF904 erst auf dem Doppelstrang translozieren. Wie die hexamere Ringhelikase MCM aus *M. thermautotrophicus* (Shin & Kelman, 2006b) konnte auch ORF904 dieses Substrat entwinden und lieferte somit einen weiteren Hinweis für seine Bevorzugung von dsDNA. Die Entwindungsaktivität konnte auch für ein DNA-Substrat gezeigt werden, welches einer Holliday-Struktur nachempfunden war. Dabei konnten keinerlei Intermediate gefunden werden, so dass anzunehmen ist, dass ORF904 auf der dsDNA transloziert, den Verzweigungspunkt auflöst und die dabei frei werdenden Strukturen mit 3'- und 5'-Überhang weiter entwindet. Für MCM4,6,7 konnte ebenfalls eine Entwindung von Holliday-Strukturen gezeigt werden (Kaplan *et al.*, 2003; Kaplan & O'Donnell, 2004). MCM4,6,7 benötigt aber im Gegensatz zu ORF904 einen 3'-Überhang für die initiale Bindung. ORF904 verhält sich für dieses Substrat also eher wie UvrD (SF1-Helikase) oder RuvAB (SF6-Helikase), die keinen Überhang für die initiale Bindung benötigen. Die Translokation und Entwindung von dsDNA-Substraten durch ORF904 wurde durch die Entwindung einer Triple-Helix, bestehend aus einem Oligodesoxynukleotid und linearisierter pMJ5-Plasmid-DNA (Firman & Szczelkun, 2000) nochmals bestätigt. Bei diesem Substrat musste die hexamere Helikase die dsPlasmid-DNA umschließen und auf ihr translozieren, um das Oligodesoxynukleotid sterisch ausschließen zu können. ORF904 zeigte

für sämtliche DNA-Substrate mit Ausnahme des Triple-Helix-Substrats auch Entwindungsaktivität in Abwesenheit von ATP. Dies ist vermutlich auf die Prim/Pol-Domäne zurückzuführen, die unter anderem durch Bindung an Einzelstrangbereiche die Substrate destabilisiert. Für die Helikasedomäne N371 konnte ausschließlich in Gegenwart von ATP Entwindungsaktivität gezeigt werden. Die Ergebnisse machen deutlich, dass die Entwindung der DNA durch die Helikase ein ATP-abhängiger Prozess ist.

Zeitabhängige Untersuchungen der Entwindungsaktivitäten ließen erkennen, dass das Substrat mit 3'- und 5'-Überhang am schnellsten entwunden wird, gefolgt von der Triple-Helix- und der Holliday-Struktur. Dies lässt sich dadurch erklären, dass das Substrat mit 3'- und 5'-Überhang das bevorzugte Substrat von SF3-Helikasen darstellt. Hier zeigte ORF904 eine höhere Aktivität als N371, was möglicherweise auf die substratdestabilisierende Prim/Pol-Domäne zurückzuführen ist, die eine scheinbar höhere Entwindung hervorruft. Die leicht höheren Werte von N371 für die Holliday-Struktur und die Triple-Helix gegenüber dem Wt liegt vermutlich in der leicht höheren ATPase-Aktivität von N371 begründet. Die Entwindungsgeschwindigkeit für die Holliday-Struktur ist die langsamste. Dies liegt in der Tatsache begründet, dass das Protein in zwei aufeinander folgenden Reaktionen an die DNA bindet und diese entwunden muss. In der ersten Reaktion muss die Holliday-Struktur, in der zweiten müssen die daraus resultierenden Substrate mit 3'- und 5'-Überhang aufgelöst werden. Hierbei stellt die erste Reaktion vermutlich den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar, da im Experiment keine Zwischenprodukte gefunden wurden.

Die Entwindungsgeschwindigkeiten liegen für ORF904 und N371 je nach Substrat zwischen 1,0 und $7,2 \cdot 10^{-4}$ bp s⁻¹. Die SF3-Helikasen SV40 L Tag bzw. AAV Rep68 weisen Entwindungsraten von 2,4 bp s⁻¹ (Wiekowski *et al.*, 1988) bzw. 5,75 bp s⁻¹ (Zhou *et al.*, 1999) auf. Die hohen Werte spiegeln den viralen Charakter der Proteine wider, die eine schnelle Replikation im Wirt ermöglichen.

Für MCM aus *M. thermautotrophicus* wurde eine Entwindungsgeschwindigkeit zwischen $48 \cdot 10^{-4}$ bp s⁻¹ (Shechter *et al.*, 2000) und 148 bp s⁻¹ (Sakakibara *et al.*, 2008) ermittelt. Damit liegen die Werte der archaealen Proteine von OR904 und MCM in der gleichen Größenordnung. Der Unterschied zu den SF3-Helikasen SV40 L Tag und AAV Rep68 ist mitunter in der Reaktionstemperatur zu suchen. Im Gegensatz zu SV40 L Tag und AAV Rep68 lag diese für ORF904 und MCM mit 60°C bzw. 45°C deutlich unter dem Optimum von 80°C. Die Werte für die archaealen Proteine liegen vermutlich höher. Obwohl für das archaeale MCM die Entwindungsraten auch relativ klein sind, kann im Gegensatz zu ORF904 auf Grund der hohen Prozessivität (Shechter *et al.*, 2000) davon ausgegangen werden, dass es sich beim MCM um die replikative Helikase handelt.

Zusammen mit den Ergebnissen der Translokation und der Prozessivität von ORF904 ist es dennoch wahrscheinlicher, dass die Helikase bei der Entwindung lokal beschränkt, und so wie das Orc1-Protein (Dueber *et al.*, 2007; Gaudier *et al.*, 2007) vornehmlich am Aufschmelzen des Replikationsursprungs beteiligt ist.

ORF904 ist in der Lage, verschiedene Nukleosidtriphosphate bzw. Desoxynukleosidtriphosphate als Energiequelle für die Translokation und Entwindung zu nutzen. ATP, CTP und alle dNTPs werden mit etwa gleicher Effizienz genutzt. UTP und GTP scheinen hingegen für ORF904 weniger geeignet zu sein. Sowohl die SF3-Helikasen SV40 L Tag (Wiekowski *et al.*, 1988), AAV Rep (Zhou *et al.*, 1999) und BPV E1 (Yang *et al.*, 1993) als auch die hexamere Helikase MCM aus *M. thermautotrophicus*

zeigen bezüglich rNTPs und dNTPs ganz unterschiedliche Präferenzen. Für die Helikaseaktivität haben die hexameren Helikasen, selbst wenn sie der gleichen Superfamilie angehören, ihre eigenen Spezifitäten bezüglich der Nutzung von rNTPs bzw. dNTPs. ATP scheint aber dennoch die bevorzugte Energiequelle zu sein oder zumindest immer unter den am besten genutzten Nukleosidtriphosphaten und Desoxynukleosidtriphosphaten zu liegen.

4.2.4 DNA-Bindung

Unter Verwendung von kurzen (49 bp), radioaktiv markierten Oligodesoxynukleotiden wurde die DNA-Bindung von ORF904 und seiner Deletionsmutanten in EMSA-Experimenten untersucht. Da auf Grund der Kürze der DNA-Substrate nur wenige Proteinmoleküle binden konnten und bei schwacher Bindung ein Abdissoziieren der Proteine während des Gellaufs möglich ist, konnte keine Bindung an die DNA nachgewiesen werden.

Mit einem pUC_pRN1-RsaI-Verdau konnte ein verzögertes Laufverhalten aller Fragmente im Agarosegel und somit die unspezifische Bindung von ORF904, K752 und dem Minimalmotiv der Winged-Helix-DNA-Bindedomäne K752G844 gezeigt werden. Eine spezifische Bindung an das Fragment mit der ori-Sequenz, wie sie für das P4 α -Protein nachgewiesen wurde (Ziegelin *et al.*, 1993), blieb ohne Erfolg. Im Fall von BPV E1 wurde eine schwache Bindung an dsDNA nachgewiesen (Hu *et al.*, 2006), die in Gegenwart der ori-Sequenz deutlich zunahm und durch die Bindung des E2-Proteins noch erheblich verstärkt wurde (Sanders & Stenlund, 1998). Möglicherweise verhält es sich bei ORF904 genauso, und weitere Proteine vermitteln erst die spezifische Bindung an den Replikationsursprung.

Für ein 200 bp langes DNA-Fragment konnte die Bindung von ORF904, N371 und K752G844 nochmals deutlich gezeigt werden. Die Verzögerung im Laufverhalten stimmte mit den Molekulargewichten der Proteine überein, wobei die Bindung ebenso wie für MCM aus *S. solfataricus* (Pucci *et al.*, 2007) für das Vollängenprotein und die isolierte Helikasedomäne stärker war als für die Winged-Helix-DNA-Bindedomäne, bei der ein leichter Schmier zu erkennen war, der vermutlich auf die nicht allzu starke Bindung des Proteins zurückzuführen ist. Im Gegensatz zu SV40 L Tag und AAV Rep68, bei denen das Vorliegen der ori-Sequenz für eine spezifische Bindung ausreicht (Kumar *et al.*, 2007), konnte dies für ORF904 nicht gezeigt werden, und wahrscheinlich sind weitere Proteine, wie es bei BPV E1 der Fall ist, notwendig.

Anhand von Fluoreszenzanisotropiemessungen wurde für N371 die DNA-Bindung für einzelsträngige und doppelsträngige DNA in Abhängigkeit von ATP und ATP-Analoga gemessen. Die Bindung war für dsDNA (K_D 590-660 nM) stärker als für Einzelstrang-DNA (K_D 800-920 nM) und nahm in Gegenwart von ATP für ssDNA (K_D 270-390 nM) und dsDNA (K_D 290-300 nM) am stärksten zu. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der ATPase-Aktivität, die für dsDNA etwas stärker ist als für ssDNA, und der Induzierbarkeit der Translokations- und Entwindungsaktivität durch ATP. Parallelen sind hier zur SF3-Helikase SV40 L Tag zu finden, die ebenfalls dsDNA (K_D 110nM) stärker bindet als ssDNA (K_D 180nM). Und auch hier wird die Bindung durch ein ATP-Analogon (γ -S-ATP) für ssDNA (K_D 65nM) und dsDNA (K_D 95nM) verstärkt (Greenleaf *et al.*, 2008). Sowohl für ORF904 und als auch für SV40 L Tag wurden Hill-Koeffizienten zwischen 1 und 2 gefunden, was auf eine Kooperativität der Untereinheiten bei der Ausbildung des Hexamers um die DNA hindeutet. Obwohl es den Anschein

hat, dass die DNA-Bindung hexamerer Helikasen generell durch ATP verstärkt wird, ist dies wie für die hexamere Helikase MCM aus *M. thermautotrophicus* für ssDNA mit einem K_D von 132 nM in Abwesenheit von ATP und einem K_D von 189 nM in Gegenwart von ATP nicht der Fall (Sakakibara *et al.*, 2008).

Für die Winged-Helix-DNA-Bindedomäne wurde sowohl für die Bindung an Einzelstrang- (K_D 1500-1600 nM) als auch an Doppelstrang-DNA (K_D 1700-2100 nM) ein Hill-Koeffizient von 1-2 gefunden, der auf eine Kooperativität zwischen den Monomeren des Proteins hindeutet. Dies steht im Einklang mit dem Vorfinden des Dimers im Proteingel. Interessanterweise wird bei HPV E1 die Dimerisierung der DNA-Bindedomäne für die spezifische Erkennung und Bindung des Replikationsursprungs verantwortlich gemacht (Titolo *et al.*, 2003a). Und auch für den eukaryotischen transkriptionalen Aktivator Rfx (Gajiwala *et al.*, 2000) und die *Origin*-Bindedomäne des P4 α -Proteins (Yeo *et al.*, 2002) wird ein ähnlicher Mechanismus der Replikationsursprungserkennung und -bindung durch ein Dimer angenommen. Möglicherweise erfolgt die Replikationsursprungserkennung und -bindung durch ORF904 in analoger Weise zu der von E1, Rfx und dem P4 α -Protein.

Die Helikasedomäne ohne Winged-Helix-DNA-Bindedomäne N371K752 zeigt für dsDNA (K_D 1700-1900 nM) eine stärkere Bindung als für ssDNA (K_D 2400-2700 nM), die in Gegenwart von ATP für ssDNA (K_D 430-460 nM) stärker als für dsDNA (K_D 820-900 nM) zunimmt. Dies steht im Einklang mit der leicht erhöhten ATPase-Aktivität für ssDNA gegenüber dsDNA. Dass die Bindung generell weniger stark erfolgt als für die Helikasedomäne N371, die auch eine höhere ATPase-Aktivität aufweist, ist vermutlich auf das Fehlen der Winged-Helix-DNA-Bindedomäne zurückzuführen. Somit verbessert diese Domäne nicht nur die DNA-Bindung, sondern sie scheint auch einen positiven Einfluss auf die ATP-Hydrolyse zu haben. Ähnliche Ergebnisse, wie man sie auch für das P4 α -Protein findet, bei dem eine Deletion der Winged-Helix-DNA-Bindedomäne zu einem Verlust der ATPase- und Helikaseaktivität führt, weswegen angenommen wird, dass die Helikasedomäne mit der DNA-Bindedomäne überlappt oder einen Teil der Helikasedomäne darstellt (Ziegelin *et al.*, 1997).

Die Prim/Pol-Domäne N40C370 synthetisiert in Gegenwart von ssDNA einen Primer (Beck & Lipps, 2007), weswegen die stärkere Bindung von ssDNA (K_D 720-780 nM) gegenüber dsDNA (K_D 4270-4300 nM) mit der Funktion dieser Domäne gut übereinstimmt. ATP reduziert generell die DNA-Bindung dieser Domäne extrem. Die Gründe hierfür sind jedoch nicht bekannt. Bei Vorliegen des GTG-Bindemotivs der Prim/Pol-Domäne wurde die Bindung an ssDNA (K_D 225-230 nM) und dsDNA (K_D 950-1040 nM) deutlich verstärkt. In Gegenwart von ATP nahm die Bindung für ssDNA (K_D 90-110) weiter zu, während dsDNA (K_D 2100-2500) schlechter gebunden wurde. Dennoch fiel der Effekt für dsDNA nicht so stark aus wie ohne GTG-Bindemotiv. Dies zeigt, dass das Vorliegen des GTG-Bindemotivs zum einen die DNA-Bindung der Prim/Pol-Domäne auch für dsDNA erhöht und zum anderen, dass ATP diesen Effekt für den Einzelstrang bei Vorliegen des GTG-Motivs noch weiter verstärkt. Dies steht im Einklang mit dem Befund, einen Primer beginnend mit einem ATP zu synthetisieren (Beck & Lipps, 2007) und lässt vermuten, dass bei Vorliegen der Erkennungssequenz die Prim/Pol-Domäne die Helikasedomäne bei der Bindung an die Doppelstrang-DNA unterstützt.

In Gegenwart von ATP bindet ORF904 im Gegensatz zu N371 ssDNA besser als dsDNA, wobei der Wt im Vergleich zu N371 eine geringere Affinität für dsDNA wie auch für ssDNA besitzt. Es scheint, dass bei Nichtvorliegen der Erkennungssequenz die Prim/Pol-Domäne in der Lage ist, die DNA-

Bindungsstelle der Helikasedomäne in Gegenwart von ATP zu verdecken, um möglicherweise eine unspezifische Bindung an die DNA zu erschweren. Wie für N371 lässt sich auch für ORF904 und die übrigen Deletionsmutanten ein Hill-Koeffizient zwischen 1 und 2 finden. Dies deutet darauf hin, dass bei der DNA-Bindung und somit auch der Hexamerisierung zwischen den Untereinheiten des Wt bzw. der Deletionsmutanten positive Kooperativität herrscht, wie sie auch für andere SF3-Helikasen gezeigt wurde.

Wie bei Rep68 (Mansilla-Soto *et al.*, 2009) ergänzen sich auch bei ORF904 die Dissoziationskonstanten der isolierten Domänen in der Art und Weise, dass sie sich der Dissoziationskonstante des Volllängenproteins annähern. Die Ergebnisse machen darüber hinaus auch klar, dass DNA-Bindung, Translokation und DNA-Entwindung miteinander zusammenhängende und ATP-abhängige Prozesse sind.

4.3 Bestimmung des Replikationsursprungs von pRN1

Um die Sequenz des Replikationsursprungs zu identifizieren, wurde ein 200 bp langes PCR-Fragment in DNase-I-*Footprint*-Analysen mit ORF904, N371 und K752G844 eingesetzt. Von der Sequenz des PCR-Produkts war bekannt, dass die Sequenz für die Plasmidreplikation essentiell ist (Berkner & Lipps, unveröffentlicht) und eine *Stemloop*-Struktur ausbildet (Keeling *et al.*, 1996).

Für die SF3-Helikasen SV40 L Tag (DeLucia *et al.*, 1983), BPV E1 (Sanders & Stenlund, 1998) und AAV Rep78 (Chiorini *et al.*, 1994) sowie für den Replikationsinitiator Orc1 (Gaudier *et al.*, 2007) konnte mittels DNase-I-*Footprint*-Experimenten die Bindung von Wiederholungssequenzen im Bereich des Replikationsursprungs gezeigt werden. Dies gelang für ORF904 und seine Varianten unter den experimentellen Bedingungen jedoch nicht.

Da für AAV Rep78 (ohne ATP) mittels KMnO_4 -*Footprint* gezeigt werden konnte, dass die palindromische terminale *Loop*-Region für eine stabile Bindung an die ITR-Sequenzen (*Inverted Terminal Repeats*) des Replikationsursprungs nicht notwendig ist (Chiorini *et al.*, 1994), wurde für die KMnO_4 -*Footprints* von ORF904, N371 und K752G844 ein PCR-Produkt verwendet, das sich auf die 100 bp direkt stromabwärts von *orf904* ohne die *Stemloop*-Struktur beschränkte.

Footprints mit dem Oxidationsmittel KMnO_4 erlaubten letztlich die Identifizierung von Nukleotiden, die durch die Winged-Helix-DNA-Bindedomäne geschützt werden. Hierbei handelt es sich um Nukleotide, die etwa 60 bis 90 Nukleotide stromabwärts von *orf904* liegen. Ebenso wie bei vielen plasmidären, viralen und chromosomalen Replikationsinitiatoren (Giraldo, 2003) scheint die Winged-Helix-DNA-Bindedomäne von ORF904 möglicherweise den Replikationsursprung von pRN1 eigenständig zu erkennen.

Interessanterweise befindet sich in diesem Bereich auch ein GTG-Motiv, das als Erkennungssequenz für die Prim/Pol-Domäne dienen könnte, um die Bindung an dsDNA zu verstärken, was im Einklang mit den Ergebnissen aus den Fluoreszenzanisotropiemessungen stehen würde. Unter Umständen scheiterte die eindeutige Aufklärung des Replikationsursprungs daran, dass noch weitere Proteine an seiner Erkennung beteiligt sind, so wie es für das E1- und E2-Protein des Papillomavirus gezeigt wurde.

4.4 Möglicher Mechanismus der Replikationsinitiation durch ORF904

Wie bereits erwähnt, ist das α -Protein des Bakteriophagen P4 funktionell ähnlich organisiert wie ORF904. Beide Proteine besitzen N-terminal eine Domäne mit Primaseaktivität. Das α -Protein hat eine bakterielle Primasedomäne (DnaG) und ORF904 eine Prim/Pol-Domäne. Darauf folgen die Superfamilie-3-Helikasedomäne und eine Winged-Helix-DNA-Bindedomäne. Die Organisation dieser drei Funktionen in einer einzigen Polypeptidkette in zwei evolutiv entfernten Replikons ist bemerkenswert und lässt vermuten, dass diese Organisation für den konzertierten molekularen Mechanismus der Replikationsinitiation von Vorteil ist. Möglicherweise bilden diese Art Proteine mit weiteren Wirtsproteinen, z.B. Einzelstrangbindeproteinen, eine vereinfachte Version eines Orisoms, welches die DNA für die Bildung der Replikationsgabel vorbereitet.

Jüngst wurden die Strukturen zweier archaealer Replikationsinitiationsproteine Cdc6/Orc1 im Komplex mit ihrer Replikationsursprungs-DNA aufgeklärt (Dueber *et al.*, 2007; Gaudier *et al.*, 2007). Diese Proteine besitzen eine AAA⁺-ATPase-Domäne gefolgt von einer Winged-Helix-DNA-Bindedomäne. Überraschenderweise binden diese Proteine die DNA nicht nur über ihre Winged-Helix-DNA-Bindedomäne, sondern bilden über eine helikale Insertion in der AAA⁺-Domäne (*steric wedge*) einen weiteren Kontakt zur DNA aus (Erzberger *et al.*, 2006). Diese Insertion ist spezifisch für die chromosomalen Replikationsinitiationsproteine von Bakterien, Archaea und Eukaryoten und ist zwischen dem Walker A und B Motiv der AAA⁺-Domäne lokalisiert. Im Gegensatz dazu besitzen die Superfamilie-3-Helikasen diese Insertion zweier α -Helices nicht, dafür aber den bereits erwähnten β -Hairpin, der zwischen dem Walker B und C Motiv liegt (Iyer *et al.*, 2004). Dieser β -Hairpin ist in den MCM-Proteinen und den SF3-Helikasen zu finden. Es wird angenommen, dass der β -Hairpin am gerichteten Transport der DNA durch die zentrale Pore der hexameren Proteine beteiligt ist. Interessanterweise befinden sich die helikale Insertion der chromosomalen Initiatorproteine, z.B. DnaA und Cdc6/Orc1, und der β -Hairpin der SF3- und MCM-Proteine auf derselben Seite des Proteins (Abbildung 3-41).

Möglicherweise stellt das monomere Replikationsprotein ORF904 den ersten Kontakt zur DNA über die Winged-Helix-DNA-Bindedomäne und den β -Hairpin der AAA⁺-Domäne her. Eine Unterstützung der Bindung könnte die Helikase durch die Bindung der Prim/Pol-Domäne an ein GTG-Motiv im Bereich des Replikationsursprungs erfahren. Konformationsänderungen des Replikationsproteins, möglicherweise durch die ATP-Hydrolyse unterstützt, könnten zu einer Destabilisierung des DNA-Duplex am Replikationsursprung führen. In darauf folgenden Schritten könnte das Replikationsprotein um die DNA-Einzelstränge multimerisieren und so die Assemblierung der Replikationsgabel am Replikationsursprung einleiten. Dieses Modell könnte die hohe ATPase-Aktivität des Replikationsproteins in Gegenwart von Doppelstrang-DNA und seine langsame Translokationsrate auf dieser erklären.

In diesem Modell wird ATP nicht nur während des DNA-Transports durch die zentrale Pore hydrolysiert, sondern auch, wenn multimere Proteinverbände an Doppelstrang-DNA binden und die chemische Energie zum Aufschmelzen der Doppelstrang-DNA nutzen.

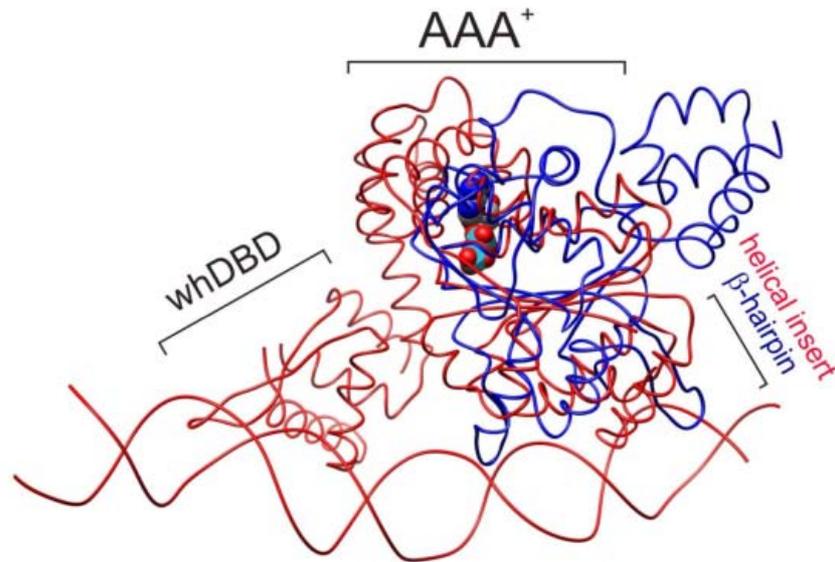


Abbildung 3-41: Überlagerung von Orc1/Cdc6 aus *Sulfolobus solfataricus* mit dem Replikationsprotein des Adeno-assoziierten Virus 2. Die Kernbereiche der AAA⁺-Domänen der beiden Proteine wurden überlagert. Das ADP-Molekül ist als Kugel-Modell dargestellt. Das replikationsursprungsbindende Protein von *Sulfolobus* (PDB 2QBY, rot) stellt den Kontakt zur DNA über die helikale Insertion und die C-terminale Winged-Helix-DNA-Bindedomäne her. Der β -Hairpin der Superfamilie-3-Helikase (PDB 1S9H, blau) besetzt räumlich eine sehr ähnliche Position wie die helikale Insertion. Das Replikationsprotein ORF904 besitzt C-terminal zum Kernbereich der AAA⁺-Domäne eine vermutete Winged-Helix-DNA-Bindedomäne. Das Modell wurde von G. Lipps erstellt.

5 Zusammenfassung

ORF904 ist ein multifunktionelles Enzym, welches durch das kryptische Plasmid pRN1 codiert wird. Das Protein besitzt Primase-, DNA-Polymerase- und ATPase-Aktivität. Die Primase- und Polymeraseaktivitäten lassen sich dem aminoterminalen Teil, die ATPase-Aktivität dem carboxyterminalen Teil des Proteins zuordnen. Eine Linkerregion, vermutlich für die Multimerisierung verantwortlich, verbindet diese beiden Teile. Im Gegensatz zur Primase/Polymerase-Domäne von ORF904, die bereits eingehend biochemisch und strukturell charakterisiert worden ist, wurde die molekulare Funktion der ATPase/Helikasedomäne noch nicht untersucht.

Sequenzanalysen der Helikasedomäne ermöglichten ORF904 als eine Superfamilie-3-Helikase zu klassifizieren, und für die ATPase- und Translokationsaktivität relevante Sequenzmotive zu identifizieren. Darüberhinaus konnte zusätzlich eine Winged-Helix-DNA-Bindedomäne am C-Terminus der Helikasedomäne identifiziert werden.

Im Laufe der Arbeit wurden verschiedene Deletions- und Punktmutanten des Replikationsproteins konstruiert. Diese erlaubten es die Beteiligung der Proteindomänen an unterschiedlichen Funktionen des Enzyms zu untersuchen. Anhand von CD-Messungen konnte gezeigt werden, dass die Winged-Helix-DNA-Bindedomäne sowie die anderen Deletionsmutanten strukturiert vorlagen. Die thermische Denaturierung der Mutanten unterstreicht den thermophilen Charakter des Proteins ($T_M \approx 85-100^\circ\text{C}$).

Erste Hinweise auf eine Multimerisierung konnten anhand von *Crosslink*-Experimenten mit Glutaraldehyd gefunden werden. Der endgültige Nachweis für eine Hexamerisierung des Proteins in Gegenwart von DNA und AMP-PnP wurde schließlich mit der Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie erbracht.

Es war bereits bekannt, dass die ATPase-Aktivität von ORF904 durch RNA gar nicht, durch Einzelstrang-DNA nur schwach und durch Doppelstrang-DNA sehr stark stimuliert wird. Eine spezifische Zunahme der ATPase-Aktivität in Gegenwart von pRN1 konnte nicht beobachtet werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass doppelsträngige zirkuläre Plasmid-DNA sowie kurze doppelsträngige Substrate im Vergleich zu einzelsträngigen langen und einzelsträngigen kurzen DNA-Substraten die ATPase-Aktivität um den Faktor 7 erhöhten. Eine Bevorzugung der längeren Plasmid-DNA unter limitierenden Bedingungen konnte nicht beobachtet werden, weswegen von einer wahrscheinlich niedrigen Prozessivität der Helikase auszugehen ist. Mit zeitabhängigen ATPase-Experimenten konnten die Wechselzahl und der K_M für ATP zu $0,7 \text{ s}^{-1}$ und $0,4 \text{ mM}$ bestimmt werden.

Die ATPase-Aktivität der Deletionsmutanten von ORF904 gaben Hinweise auf die Wichtigkeit der Region direkt N-terminal vor dem Helikaskernbereich. Es wird angenommen, dass diese Region für die Hexamerisierung des Proteins von Bedeutung ist.

Die Analyse der Punktmutanten von ORF904 in den konservierten Bereichen gab Aufschluss über für die ATPase-Aktivität relevante Aminosäurereste. Der Argininrest R690 konnte als Argininfinger identifiziert werden, der in *trans* an der ATP-Hydrolyse beteiligt ist. Der potentielle „Lysinfinger“ K574 konnte nicht als solcher identifiziert werden. Wie zu erwarten war, zeigten die Mutanten des β -Hairpins eine vernachlässigbare Abnahme in Gegenwart von dsDNA.

Translokationsexperimente mit einem Biotin-Streptavidin-Verdrängungsversuch ermöglichten es, für die Helikase eine durch ATP induzierbare Translokation mit 3'-5'-Polarität auf Einzelstrang-DNA

nachzuweisen. Darüber hinaus erlaubten die Translokationsexperimente, K657 als das Lysin im β -Hairpin zu identifizieren, welches vermutlich den direkten Kontakt zur DNA herstellt.

Anhand der zeitabhängigen Untersuchung der Translokationsaktivität wurde die Translokationsrate von ORF904 zu etwa $6,2 \cdot 10^{-4}$ b s⁻¹ bestimmt. Da während des Experiments die Reaktionstemperatur weit unter der Optimaltemperatur der Helikase liegen musste, ist anzunehmen, dass der Wert für die Translokationsrate von ORF904 vermutlich höher liegt. Dennoch lässt der niedrige Wert zusammen mit den Ergebnissen der Prozessivität vermuten, dass es sich bei OF904 nicht um eine prozessive Helikase handelt. Vielmehr scheint ORF904 am Aufschmelzen des Replikationsursprungs beteiligt zu sein.

In der Vergangenheit konnte keine Entwindung von komplett doppelsträngigen Helikasesubstraten oder Substraten mit 5'- oder 3'-Überhang auf der Basis von M13-DNA gezeigt werden. Für weitere Untersuchungen wurden deshalb kurze DNA-Substrate auf der Basis von Oligodesoxynukleotiden verwendet. Auch hier konnte keine Entwindung für komplett doppelsträngige Substrate oder Substrate mit 3' oder 5'-Überhang gezeigt werden. Die Helikase ist aber in der Lage, ein DNA-Substrat mit 3'- und 5'-Überhang, ein Doppelstrangsubstrat mit internem 5'-Überhang, eine Holliday-Struktur sowie eine Triple-Helix ATP-abhängig zu entwinden. Mittels der letzten drei Substrate wurde auch die Translokation auf Doppelstrang-DNA nachgewiesen.

Die Entwindungsraten für die Helikase liegen abhängig vom Substrat zwischen 1,0 und $7,2 \cdot 10^{-4}$ bp s⁻¹. Die Werte für die Entwindungsraten liegen vermutlich höher, da auch in diesem Experiment die Reaktionstemperatur weit unter der Optimaltemperatur der Helikase liegen musste. Die Ergebnisse der Entwindungsexperimente untermauern nochmals die Ergebnisse der Translokationsexperimente. DNA-Bindungsexperimente auf der Basis von Fluoreszenzanisotropiemessungen bestätigten die DNA-Bindung der carboxyterminalen DNA-Bindedomäne und der Helikase. Die DNA-Bindung der Helikasedomäne nahm in Gegenwart von ATP zu. Darüber hinaus scheint es, dass die Prim/Pol-Domäne in der Lage ist, die Helikasedomäne in Gegenwart von ATP und Abwesenheit des GTG-Bindemotivs zu maskieren, um so unter Umständen eine unspezifische DNA-Bindung zu erschweren. In Gegenwart des GTG-Bindemotivs bindet die Prim/Pol-Domäne Einzelstrang-DNA sowie Doppelstrang-DNA stärker. Dieser Effekt wird für Einzelstrang-DNA durch ATP weiter verstärkt. Möglicherweise unterstützt die Prim/Pol-Domäne die DNA-Bindung der Helikase bei Vorliegen des GTG-Bindemotivs im Bereich des Replikationsursprungs.

Um den Replikationsursprung zu bestimmen, wurden mit einem für die Replikation essentiellen Sequenzabschnitt stromabwärts von *orf904 Footprint*-Analysen durchgeführt. Diese erlaubten es, Nukleotide in einer Region 60 bis 90 Nukleotide stromabwärts von *orf904* zu identifizieren, die durch die Winged-Helix-DNA-Bindedomäne scheinbar geschützt werden. Interessanterweise befindet sich in diesem Bereich auch ein GTG-Motiv, das als Erkennungssequenz für die Prim/Pol-Domäne dienen könnte, um die Bindung des Proteins an den vermeintlichen Replikationsursprung zu verstärken.

Im Ganzen deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Winged-Helix-DNA-Bindedomäne zusammen mit der Helikasedomäne den Replikationsursprung erkennt. Nach der initialen Bindung multimerisiert ORF904 und destabilisiert, unter ATP-Verbrauch, den Replikationsursprung. Letztlich synthetisiert die Prim/Pol-Domäne in einem hoch sequenzspezifischen Prozess den ersten Primer in der Replikationsblase. In diesem Modell ist ORF904 nur an der Replikationsinitiation beteiligt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits publiziert:

Sanchez,M., Drechsler,M., Stark,H., Lipps,G. (2009) DNA translocation activity of the multifunctional replication protein ORF904 from the archaeal plasmid pRN1. *Nucleic Acids Res.*, 1-18.

6 Summary

ORF904 is a multifunctional protein encoded by the cryptic plasmid pRN1. The protein has primase, DNA polymerase and ATPase activities. The primase and polymerase activities are located in the N-terminal half and the ATPase activity is located in the C-terminal half of the protein. A linker region, probably responsible for multimerization, connects the C- and N-terminal halves of the protein. While the primase/polymerase domain has already been characterized biochemically and structurally in great detail, the molecular function of the ATPase/helicase domain in replication has not been addressed yet.

Sequence analysis of the helicase domain allowed to classify ORF904 as a superfamily 3 helicase and to identify critical residues for the ATPase and translocation activity. Furthermore, an additional winged helix DNA binding domain at the C-terminus of the helicase domain could be delineated.

In the course of the work several deletion mutants and point mutants of the replication protein were constructed, which allowed to investigate the participation of the protein domains at the various functions of the enzyme. On the basis of CD-measurements it could be shown that the winged helix DNA binding domain as well as the other deletion mutants of ORF904 were folded. The thermal denaturation of the mutants underscores the protein's thermophilic character ($T_M \approx 85-100^\circ\text{C}$).

First hints about the multimerization of the protein could be detected by crosslink experiments with glutaraldehyde. The final proof for hexamerization of the protein in the presence of DNA and AMP-PnP came from cryo-transmission electron microscopy experiments.

It was already known that the ATPase activity of ORF904 is not stimulated by RNA, only weakly by single-stranded DNA and strongly by double-stranded DNA. No specific increase of the ATPase activity in the presence of pRN1 could be observed, but it could be shown that double-stranded circular plasmid DNA, as well as short double-stranded DNA substrates, increased ATPase activity 7-fold in comparison to single-stranded long or short DNA substrates. No preference for the longer plasmid DNA under limiting conditions could be observed, suggesting that the processivity of the helicase is probably very low. In kinetic experiments the turnover number and the K_M for ATP were determined to be 0.7 s^{-1} and 0.4 mM , respectively.

The ATPase activity of a deletion mutant of ORF904 gave hints about the importance of the region located directly N-terminal to the core of the helicase domain. It is believed that this region is relevant for the hexamerization of the protein.

The analysis of the point mutants of ORF904 in the conserved regions revealed relevant residues for ATPase activity. The arginine residue R690 was identified to be the arginine finger which assists the ATP hydrolysis in trans. The potential "lysine finger" K574 could not be identified as such. As expected the mutants of the β -hairpin showed a negligible decrease in ATPase activity in the presence of double-stranded DNA.

Translocation experiments with a streptavidin displacement assay allowed proving an ATP-inducible translocation activity with 3'-5' polarity on single-stranded DNA for the helicase. In addition, the translocation experiments allowed the identification of K657 as the lysine in the β -hairpin which might directly interact with DNA.

In kinetic experiments the translocation activity of ORF904 was determined to be $6.2 \cdot 10^{-4} \text{ b s}^{-1}$. During the experimental procedure the reaction temperature had to be far below the optimal

temperature of the helicase. Therefore, the translocation rate is assumed to be higher. Nevertheless, the low value of the translocation rate together with the results from the processivity experiments suggest that ORF904 is not a processive helicase situated at the replication fork. Rather ORF904 might be involved in unwinding the replication origin.

In the past no unwinding could be shown for completely double-stranded helicase substrates or substrates on the basis of M13 DNA with either a 3'- or 5'-overhang. Hence, for further investigations short DNA substrates on the basis of oligodeoxynucleotides were used. No unwinding could be shown for the completely double-stranded substrate or the substrates with either 3'- or 5'-overhang as well. However the helicase is able to unwind a DNA substrate with 3'- and 5'-overhang, a double-strand substrate with internal 5'-overhang, a substrate which resembles a Holliday junction as well as a DNA-triple-helix in an ATP-dependent manner. The latter three substrates were used to demonstrate the translocation on double-stranded DNA as well.

The unwinding rates of the helicase range from 1.0 to $7.2 \cdot 10^{-4}$ bp s⁻¹, depending on the substrate. The values of the unwinding rates are presumably higher, as the reaction temperature in the experiment also had to be far below the optimal temperature of the helicase. The results reinforce the translocation results.

DNA binding experiments based on fluorescence anisotropy measurements confirmed the DNA binding activity of the carboxy-terminal winged helix DNA binding domain and of the helicase. The DNA binding activity of the helicase increased in the presence of ATP. Furthermore, it seems that the prim/pol domain is capable of masking the helicase domain in the presence of ATP and the absence of the GTG binding motif, probably to impede unspecific binding. In the presence of the GTG binding motif the prim/pol domain binds single-stranded as well as double-stranded DNA more strongly. For single-stranded DNA this effect is increased in the presence of ATP. Probably the prim/pol domain facilitates the DNA binding of the helicase domain when a GTG binding motif is located close to the origin of replication.

In order to identify the origin of replication, footprint analysis were carried out with a section of DNA essential for replication located downstream of *orf904*. The footprints allowed the identification of nucleotides in a region 60 to 90 nucleotides downstream of *orf904*, which appeared to be protected by the winged helix DNA binding domain. Interestingly, a GTG motif which could be used by the prim/pol domain as a recognition sequence and that enhances the binding of the protein to the putative origin of replication was also found in this region.

In aggregate the data suggests that the winged-helix DNA binding domain recognizes together with the helicase domain the replication origin. After this initial binding event ORF904 multimerizes and destabilizes the origin of replication fuelled by ATP hydrolysis. Finally the prim/pol domain synthesized in a highly sequence-specific manner the first primers in the replication bubble. According to this model ORF904 only acts during the initiation of replication.

7 Abkürzungsverzeichnis

Allgemein

AAA ⁺	<i><u>A</u>TPases <u>A</u>ssociated With Diverse Cellular <u>A</u>ctivities</i>
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
AcOH, OAc	Essigsäure bzw. ihre Salze
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäure(n)
ASCE	<i><u>A</u>dditional <u>S</u>trand <u>C</u>atalytic <u>E</u></i>
ATP	Adenosintriphosphat
A _{XXX}	Alanin an Position XXX
A _{xxx}	Absorption bei xxx nm
b	Basen (einzelsträngige DNA)
Bio-dT	Thymin-Biotin-Derivat, welches anstelle von Thymin in ein Oligodesoxynukleotid eingebaut ist
BioTEG	Biotin-Derivat, welches über einen 15 Atome langen Abstandshalter kovalent intern an das 3'- oder 5'-Ende eines Oligodesoxynukleotids gebunden ist
bp	Basenpaare (doppelsträngige DNA)
BPV	Bovines Papillomavirus
BSA	Bovines Serumalbumin
ccc	<i><u>c</u>ovalently <u>c</u>losed <u>c</u>ircle</i>
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (<i><u>C</u>alf <u>I</u>ntestine <u>P</u>hosphatase</i>)
Cm	Chloramphenicol
cpm	detektierte radioaktive Zerfälle pro Minute (<i><u>c</u>ounts <u>p</u>er <u>m</u>inute</i>)
CTP	Cytidintriphosphat
Da	Dalton
dATP (A)	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP (C)	Desoxycytidintriphosphat
dGTP (G)	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP (T)	Desoxythymidintriphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE	Diethylaminoethyl
denat.	unter denaturierenden Bedingungen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	äquimolares Gemisch von dATP, dCTP, dGTP und dTTP
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	<u>E</u> lectrophoretic <u>M</u> obility <u>S</u> hift <u>A</u> ssay
Fa.	Firma
f.c.	Endkonzentration im Ansatz (<u>f</u> inal <u>c</u> oncentration)
Fluo	Fluorescein
FPLC	<u>F</u> ast <u>P</u> rotein <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography
g	bei Zentrifugation: Schwerebeschleunigung der Erde
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HPLC	<u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography
HPV	Humanes Papillomavirus
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
KXXX	Lysin an Positon XXX
kb	Kilobasenpaare
K _D	Dissoziationskonstante
KG	<u>K</u> inase- <u>G</u> TPase
Km	Kanamycin
LB	Luria Bertani (Medium)
L Tag	<u>L</u> arge <u>T</u> antigen
MCM	<u>M</u> ini <u>C</u> hromosome <u>M</u> aintenance
MM	Material und Methoden
<i>M. thermautotrophicus</i>	<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
MRV	<u>M</u> ean <u>R</u> esidue <u>W</u> eight
MWCO	<u>M</u> olecular <u>W</u> eight <u>C</u> ut <u>O</u> ff
NaAc	Natriumacetat
NH ₄ Ac	Ammoniumacetat
n.u.	nicht untersucht
oc	<u>o</u> pen <u>c</u> ircle
OD _{xxx}	Optische Dichte bei $\lambda = xxx$ nm
ORC	<u>O</u> rigine <u>R</u> ecognition <u>C</u> omplex
ori	Replikationsursprung (<u>o</u> rigine of replication)
p.a.	<i>pro analysis</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCNA	<u>P</u> roliferating <u>C</u> ell <u>N</u> uclear <u>A</u> ntigen
PCR	Polymerasekettenreaktion (<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

Pol	Polymerase
PS1BH	<i>Pre Sensor-1 β-Hairpin</i>
r	Anisotropie; rekombinant
RFC	<u>Replikations</u> Faktor <u>C</u>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rNTPs	äquimolares Gemisch von ATP, CTP, GTP und UTP
RT	Raumtemperatur
RPA	<u>Replikations</u> Protein <u>A</u>
RXXX	Arginin an Position XXX
S	Sedimentationskoeffizient
SAP	Phosphatase aus <i>Pandalus borealis</i> (<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>)
<i>S. cerevisiae</i>	Bäckerhefe: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SF	<u>Super</u> Familie
ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
<i>S. islandicus</i>	<i>Sulfolobus islandicus</i>
<i>S. solfataricus</i>	<i>Sulfolobus solfataricus</i>
SV	Simianvirus
T4-PNK	Polynukleotidkinase des Bakteriophagen T4
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TBE	Tris/Borat/EDTA
Tc	Tetracyclin
TE	Tris-EDTA
TEM	<u>Transmissions</u> <u>E</u> lektronen <u>M</u> ikroskopie
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TMAE	Trimethylaminoethyl
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit der enzymatischen Aktivität (<i>Unit</i>)
UE	Untereinheit
ün	über Nacht
ÜNK	Über-Nacht-Kultur
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolettstrahlung

Einheiten

A	Ampere
°C	Grad Celsius
cal	Kalorie
g	Gramm

h	Stunde
l	Liter
m	Meter
M	Molar (mol/l)
min	Minute(n)
sec	Sekunde(n)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
U	Unit (Einheit)
V	Volt
W	Watt

Vorsätze

k	kilo	10^3
m	milli	10^{-3}
μ	mikro	10^{-6}
n	nano	10^{-9}
p	pico	10^{-12}

Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil
N	A, C, G, T

8 Literaturverzeichnis

- Abbate, E.A., Berger, J.M. & Botchan, M.R. (2004) The X-ray structure of the papillomavirus helicase in complex with its molecular matchmaker E2. *Genes Dev.*, **18**, 1981-1996.
- Allison, T.J., Wood, T.C., Briercheck, D.M., Rastinejad, F., Richardson, J.P. & Rule, G.S. (1998) Crystal structure of the RNA-binding domain from transcription termination factor rho. *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 352-356.
- Auster, A.S. & Joshua-Tor, L. (2004) The DNA-binding domain of human papillomavirus type 18 E1. Crystal structure, dimerization, and DNA binding. *J. Biol. Chem.*, **279**, 3733-3742.
- Barry, E.R. & Bell, S.D. (2006) DNA replication in the archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **70**, 876-887.
- Beck, K. (2008) Charakterisierung des Replikationsproteins ORF904 des archaealen Plasmids pRN1. Universität Bayreuth.
- Beck, K. & Lipps, G. (2007) Properties of an unusual DNA primase from an archaeal plasmid. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 5635-5645.
- Bell, S.P. (2002) The origin recognition complex: from simple origins to complex functions. *Genes Dev.*, **16**, 659-672.
- Berkner, S., Grogan, D., Albers, S.V. & Lipps, G. (2007) Small multicopy, non-integrative shuttle vectors based on the plasmid pRN1 for *Sulfolobus acidocaldarius* and *Sulfolobus solfataricus*, model organisms of the (cren-)archaea. *Nucleic Acids Res.*, **35**, e88.
- Berkner, S. & Lipps, G. (2007) Characterization of the transcriptional activity of the cryptic plasmid pRN1 from *Sulfolobus islandicus* REN1H1 and regulation of its replication operon. *J. Bacteriol.*, **189**, 1711-1721.
- Bernstein, J.A. & Richardson, C.C. (1989) Characterization of the helicase and primase activities of the 63-kDa component of the bacteriophage T7 gene 4 protein. *J. Biol. Chem.*, **264**, 13066-13073.
- Bird, L.E., Pan, H., Soutanas, P. & Wigley, D.B. (2000) Mapping protein-protein interactions within a stable complex of DNA primase and DnaB helicase from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochemistry*, **39**, 171-182.
- Bochtler, M., Hartmann, C., Song, H.K., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D. & Huber, R. (2000) The structures of HslU and the ATP-dependent protease HslU-HslV. *Nature*, **403**, 800-805.
- Brewster, A.S., Wang, G., Yu, X., Greenleaf, W.B., Carazo, J.M., Tjajadia, M., Klein, M.G. & Chen, X.S. (2008) Crystal structure of a near-full-length archaeal MCM: functional insights for an AAA+ hexameric helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**, 20191-20196.
- Castella, S., Bingham, G. & Sanders, C.M. (2006a) Common determinants in DNA melting and helicase-catalysed DNA unwinding by papillomavirus replication protein E1. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 3008-3019.
- Castella, S., Burgin, D. & Sanders, C.M. (2006b) Role of ATP hydrolysis in the DNA translocase activity of the bovine papillomavirus (BPV-1) E1 helicase. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 3731-3741.
- Chiorini, J.A., Wiener, S.M., Owens, R.A., Kyostio, S.R., Kotin, R.M. & Safer, B. (1994) Sequence requirements for stable binding and function of Rep68 on the adeno-associated virus type 2 inverted terminal repeats. *J. Virol.*, **68**, 7448-7457.
- Clarey, M.G., Erzberger, J.P., Grob, P., Leschziner, A.E., Berger, J.M., Nogales, E. & Botchan, M. (2006) Nucleotide-dependent conformational changes in the DnaA-like core of the origin recognition complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**, 684-690.

- Connaghan-Jones, K.D., Moody, A.D. & Bain, D.L. (2008) Quantitative DNase footprint titration: a tool for analyzing the energetics of protein-DNA interactions. *Nat. Protoc.*, **3**, 900-914.
- Costa, A. & Onesti, S. (2008) The MCM complex: (just) a replicative helicase? *Biochem. Soc. Trans.*, **36**, 136-140.
- Crampton, D.J., Mukherjee, S. & Richardson, C.C. (2006) DNA-induced switch from independent to sequential dTTP hydrolysis in the bacteriophage T7 DNA helicase. *Mol. Cell*, **21**, 165-174.
- Daugeron, M.C., Kressler, D. & Linder, P. (2001) Dbp9p, a putative ATP-dependent RNA helicase involved in 60S-ribosomal-subunit biogenesis, functionally interacts with Dbp6p. *RNA*, **7**, 1317-1334.
- Davey, M.J., Fang, L., McInerney, P., Georgescu, R.E. & O'Donnell, M. (2002a) The DnaC helicase loader is a dual ATP/ADP switch protein. *EMBO J.*, **21**, 3148-3159.
- Davey, M.J., Jeruzalmi, D., Kuriyan, J. & O'Donnell, M. (2002b) Motors and switches: AAA+ machines within the replisome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 826-835.
- Del, S.G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, M.J., Espinosa, M. & az-Orejas, R. (1998) Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 434-464.
- DeLucia, A.L., Lewton, B.A., Tjian, R. & Tegtmeyer, P. (1983) Topography of simian virus 40 A protein-DNA complexes: arrangement of pentanucleotide interaction sites at the origin of replication. *J. Virol.*, **46**, 143-150.
- Dillingham, M.S. (2006) Replicative helicases: a staircase with a twist. *Curr. Biol.*, **16**, R844-R847.
- Dokudovskaya, S., Williams, R., Devos, D., Sali, A., Chait, B.T. & Rout, M.P. (2006) Protease accessibility laddering: a proteomic tool for probing protein structure. *Structure*, **14**, 653-660.
- Donaldson, J.R., Courcelle, C.T. & Courcelle, J. (2006) RuvABC is required to resolve Holliday junctions that accumulate following replication on damaged templates in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.*, **281**, 28811-28821.
- Donmez, I. & Patel, S.S. (2006) Mechanisms of a ring shaped helicase. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 4216-4224.
- Dueber, E.L., Corn, J.E., Bell, S.D. & Berger, J.M. (2007) Replication origin recognition and deformation by a heterodimeric archaeal Orc1 complex. *Science*, **317**, 1210-1213.
- Edgar, R.C. & Sjölander, K. (2004) COACH: profile-profile alignment of protein families using hidden Markov models. *Bioinformatics*, **20**, 1309-1318.
- Enemark, E.J., Chen, G., Vaughn, D.E., Stenlund, A. & Joshua-Tor, L. (2000) Crystal structure of the DNA binding domain of the replication initiation protein E1 from papillomavirus. *Mol. Cell*, **6**, 149-158.
- Enemark, E.J. & Joshua-Tor, L. (2006) Mechanism of DNA translocation in a replicative hexameric helicase. *Nature*, **442**, 270-275.
- Enemark, E.J. & Joshua-Tor, L. (2008) On helicases and other motor proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **18**, 243-257.
- Enemark, E.J., Stenlund, A. & Joshua-Tor, L. (2002) Crystal structures of two intermediates in the assembly of the papillomavirus replication initiation complex. *EMBO J.*, **21**, 1487-1496.
- Erauso, G., Marsin, S., bouzid-Rollet, N., Baucher, M.F., Barbeyron, T., Zivanovic, Y., Prieur, D. & Forterre, P. (1996) Sequence of plasmid pGT5 from the archaeon Pyrococcus abyssi: evidence for rolling-circle replication in a hyperthermophile. *J. Bacteriol.*, **178**, 3232-3237.

- Erzberger, J.P., Mott, M.L. & Berger, J.M. (2006) Structural basis for ATP-dependent DnaA assembly and replication-origin remodeling. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**, 676-683.
- Erzberger, J.P., Pirruccello, M.M. & Berger, J.M. (2002) The structure of bacterial DnaA: implications for general mechanisms underlying DNA replication initiation. *EMBO J.*, **21**, 4763-4773.
- Firman, K. & Szczelkun, M.D. (2000) Measuring motion on DNA by the type I restriction endonuclease EcoR124I using triplex displacement. *EMBO J.*, **19**, 2094-2102.
- Fodje, M.N., Hansson, A., Hansson, M., Olsen, J.G., Gough, S., Willows, R.D. & Al-Karadaghi, S. (2001) Interplay between an AAA module and an integrin I domain may regulate the function of magnesium chelatase. *J. Mol. Biol.*, **311**, 111-122.
- Fouts, E.T., Yu, X., Egelman, E.H. & Botchan, M.R. (1999) Biochemical and electron microscopic image analysis of the hexameric E1 helicase. *J. Biol. Chem.*, **274**, 4447-4458.
- Gai, D., Zhao, R., Li, D., Finkielstein, C.V. & Chen, X.S. (2004) Mechanisms of conformational change for a replicative hexameric helicase of SV40 large tumor antigen. *Cell*, **119**, 47-60.
- Gajiwala, K.S., Chen, H., Cornille, F., Roques, B.P., Reith, W., Mach, B. & Burley, S.K. (2000) Structure of the winged-helix protein hRFX1 reveals a new mode of DNA binding. *Nature*, **403**, 916-921.
- Garrett, R.A., Redder, P., Greve, B., Brugger, K., Chen, L. and She, Q. (2005) Archaeal Plasmids. In Funnel, B.E. and Phillips, G.J. (eds.), *Plasmid Biology*. ASM Press, Washington, D.C., pp. 377-392.
- Gaudier, M., Schuwirth, B.S., Westcott, S.L. & Wigley, D.B. (2007) Structural basis of DNA replication origin recognition by an ORC protein. *Science*, **317**, 1213-1216.
- Gaur, R.K. (2007) Helicase: mystery of progression. *Mol. Biol. Rep.*, **34**, 161-164.
- Gillette, T.G., Lusky, M. & Borowiec, J.A. (1994) Induction of structural changes in the bovine papillomavirus type 1 origin of replication by the viral E1 and E2 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 8846-8850.
- Giraldo, R. (2003) Common domains in the initiators of DNA replication in Bacteria, Archaea and Eukarya: combined structural, functional and phylogenetic perspectives. *FEMS Microbiol. Rev.*, **26**, 533-554.
- Golas, M.M., Sander, B., Will, C.L., Luhrmann, R. & Stark, H. (2003) Molecular architecture of the multiprotein splicing factor SF3b. *Science*, **300**, 980-984.
- Gorbalenya, A.E. & Koonin, E.V. (1993) Helicases: amino acid sequence comparison and structure-function relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **3**, 419-429.
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P. & Blinov, V.M. (1989) Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 4713-4730.
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V. & Wolf, Y.I. (1990) A new superfamily of putative NTP-binding domains encoded by genomes of small DNA and RNA viruses. *FEBS Lett.*, **262**, 145-148.
- Greenleaf, W.B., Shen, J., Gai, D. & Chen, X.S. (2008) Systematic study of the functions for the residues around the nucleotide pocket in simian virus 40 AAA+ hexameric helicase. *J. Virol.*, **82**, 6017-6023.
- Greve, B., Jensen, S., Brugger, K., Zillig, W. & Garrett, R.A. (2004) Genomic comparison of archaeal conjugative plasmids from *Sulfolobus*. *Archaea*, **1**, 231-239.

- Greve,B., Jensen,S., Phan,H., Brugger,K., Zillig,W., She,Q. & Garrett,R.A. (2005) Novel RepA-MCM proteins encoded in plasmids pTAU4, pORA1 and pTIK4 from *Sulfolobus neozealandicus*. *Archaea.*, **1**, 319-325.
- Guenther,B., Onrust,R., Sali,A., O'Donnell,M. & Kuriyan,J. (1997) Crystal structure of the delta' subunit of the clamp-loader complex of *E. coli* DNA polymerase III. *Cell*, **91**, 335-345.
- Gupta,R., Sharma,S., Sommers,J.A., Jin,Z., Cantor,S.B. & Brosh,R.M., Jr. (2005) Analysis of the DNA substrate specificity of the human BACH1 helicase associated with breast cancer. *J.Biol.Chem.*, **280**, 25450-25460.
- Hall,M.C. & Matson,S.W. (1999) Helicase motifs: the engine that powers DNA unwinding. *Mol.Microbiol.*, **34**, 867-877.
- Haney,P., Konisky,J., Koretke,K.K., Luthey-Schulten,Z. & Wolynes,P.G. (1997) Structural basis for thermostability and identification of potential active site residues for adenylate kinases from the archaeal genus *Methanococcus*. *Proteins*, **28**, 117-130.
- Hartman,T.R., Qian,S., Bolinger,C., Fernandez,S., Schoenberg,D.R. & Boris-Lawrie,K. (2006) RNA helicase A is necessary for translation of selected messenger RNAs. *Nat.Struct.Mol.Biol.*, **13**, 509-516.
- Haugland,G.T., Sakakibara,N., Pey,A.L., Rollor,C.R., Birkeland,N.K. & Kelman,Z. (2008) *Thermoplasma acidophilum* Cdc6 protein stimulates MCM helicase activity by regulating its ATPase activity. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 5602-5609.
- Heyduk,T., Ma,Y., Tang,H. & Ebright,R.H. (1996) Fluorescence anisotropy: rapid, quantitative assay for protein-DNA and protein-protein interaction. *Methods Enzymol.*, **274**, 492-503.
- Hickman,A.B. & Dyda,F. (2005) Binding and unwinding: SF3 viral helicases. *Curr.Opin.Struct.Biol.*, **15**, 77-85.
- Hopfner,K.P., Eichinger,A., Engh,R.A., Laue,F., Ankenbauer,W., Huber,R. & Angerer,B. (1999) Crystal structure of a thermostable type B DNA polymerase from *Thermococcus gorgonarius*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **96**, 3600-3605.
- Hu,Y., Clower,R.V. & Melendy,T. (2006) Cellular topoisomerase I modulates origin binding by bovine papillomavirus type 1 E1. *J.Virol.*, **80**, 4363-4371.
- Ilyina,T.V., Goralenya,A.E. & Koonin,E.V. (1992) Organization and evolution of bacterial and bacteriophage primase-helicase systems. *J.Mol.Evol.*, **34**, 351-357.
- Ishaq,M., Hu,J., Wu,X., Fu,Q., Yang,Y., Liu,Q. & Guo,D. (2008) Knockdown of cellular RNA helicase DDX3 by short hairpin RNAs suppresses HIV-1 viral replication without inducing apoptosis. *Mol.Biotechnol.*, **39**, 231-238.
- Ishimi,Y. (1997) A DNA helicase activity is associated with an MCM4, -6, and -7 protein complex. *J.Biol.Chem.*, **272**, 24508-24513.
- Iyer,L.M., Leipe,D.D., Koonin,E.V. & Aravind,L. (2004) Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *J.Struct.Biol.*, **146**, 11-31.
- Jain,C. (2008) The *E. coli* RhlE RNA helicase regulates the function of related RNA helicases during ribosome assembly. *RNA.*, **14**, 381-389.
- James,J.A., Aggarwal,A.K., Linden,R.M. & Escalante,C.R. (2004) Structure of adeno-associated virus type 2 Rep40-ADP complex: insight into nucleotide recognition and catalysis by superfamily 3 helicases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **101**, 12455-12460.

- James, J.A., Escalante, C.R., Yoon-Robarts, M., Edwards, T.A., Linden, R.M. & Aggarwal, A.K. (2003) Crystal structure of the SF3 helicase from adeno-associated virus type 2. *Structure.*, **11**, 1025-1035.
- Jenkinson, E.R. & Chong, J.P. (2003) Initiation of archaeal DNA replication. *Biochem. Soc. Trans.*, **31**, 669-673.
- Jenkinson, E.R. & Chong, J.P. (2006) Minichromosome maintenance helicase activity is controlled by N- and C-terminal motifs and requires the ATPase domain helix-2 insert. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 7613-7618.
- Jezewska, M.J., Rajendran, S. & Bujalowski, W. (1998) Complex of Escherichia coli primary replicative helicase DnaB protein with a replication fork: recognition and structure. *Biochemistry*, **37**, 3116-3136.
- Johnson, W.C., Jr. (1990) Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins*, **7**, 205-214.
- Kaplan, D.L., Davey, M.J. & O'Donnell, M. (2003) Mcm4,6,7 uses a "pump in ring" mechanism to unwind DNA by steric exclusion and actively translocate along a duplex. *J. Biol. Chem.*, **278**, 49171-49182.
- Kaplan, D.L. & O'Donnell, M. (2004) Twin DNA pumps of a hexameric helicase provide power to simultaneously melt two duplexes. *Mol. Cell*, **15**, 453-465.
- Kastner, B., Fischer, N., Golas, M.M., Sander, B., Dube, P., Boehringer, D., Hartmuth, K., Deckert, J., Hauer, F., Wolf, E., Uchtenhagen, H., Urlaub, H., Herzog, F., Peters, J.M., Poerschke, D., Luhrmann, R. & Stark, H. (2008) GraFix: sample preparation for single-particle electron cryomicroscopy. *Nat. Methods*, **5**, 53-55.
- Keeling, P.J., Klenk, H.P., Singh, R.K., Feeley, O., Schleper, C., Zillig, W., Doolittle, W.F. & Sensen, C.W. (1996) Complete nucleotide sequence of the Sulfolobus islandicus multicopy plasmid pRN1. *Plasmid*, **35**, 141-144.
- Kelman, L.M. & Kelman, Z. (2003) Archaea: an archetype for replication initiation studies? *Mol. Microbiol.*, **48**, 605-615.
- Kelman, Z. (2000) DNA replication in the third domain (of life). *Curr. Protein Pept. Sci.*, **1**, 139-154.
- Kelman, Z., Lee, J.K. & Hurwitz, J. (1999) The single minichromosome maintenance protein of Methanobacterium thermoautotrophicum DeltaH contains DNA helicase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 14783-14788.
- Kelman, Z. & O'Donnell, M. (1994) DNA replication: enzymology and mechanisms. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **4**, 185-195.
- Kelman, Z. & O'Donnell, M. (1995a) Structural and functional similarities of prokaryotic and eukaryotic DNA polymerase sliding clamps. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 3613-3620.
- Kelman, Z. & O'Donnell, M. (1995b) DNA polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine. *Annu. Rev. Biochem.*, **64**, 171-200.
- Khan, S.A. (1997) Rolling-circle replication of bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 442-455.
- Kim, J.L., Morgenstern, K.A., Griffith, J.P., Dwyer, M.D., Thomson, J.A., Murcko, M.A., Lin, C. & Caron, P.R. (1998) Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure.*, **6**, 89-100.

- Kletzin,A., Lieke,A., Ulrich,T., Charlebois,R.L. & Sensen,C.W. (1999) Molecular analysis of pDL10 from *Acidianus ambivalens* reveals a family of related plasmids from extremely thermophilic and acidophilic archaea. *Genetics*, **152**, 1307-1314.
- Koonin,E.V. (1993) A common set of conserved motifs in a vast variety of putative nucleic acid-dependent ATPases including MCM proteins involved in the initiation of eukaryotic DNA replication. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 2541-2547.
- Kopel,V., Pozner,A., Baran,N. & Manor,H. (1996) Unwinding of the third strand of a DNA triple helix, a novel activity of the SV40 large T-antigen helicase. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 330-335.
- Kornberg,A. & Baker,T. (1992) DNA Replication. *W.H. Freeman, New York*.
- Kumar,A., Meinke,G., Reese,D.K., Moine,S., Phelan,P.J., Fradet-Turcotte,A., Archambault,J., Bohm,A. & Bullock,P.A. (2007) Model for T-antigen-dependent melting of the simian virus 40 core origin based on studies of the interaction of the beta-hairpin with DNA. *J. Virol.*, **81**, 4808-4818.
- Kumar,S. & Nussinov,R. (2001) How do thermophilic proteins deal with heat? *Cell Mol. Life Sci.*, **58**, 1216-1233.
- Kumar,S., Tsai,C.J. & Nussinov,R. (2000) Factors enhancing protein thermostability. *Protein Eng.*, **13**, 179-191.
- Leipe,D.D., Koonin,E.V. & Aravind,L. (2003) Evolution and classification of P-loop kinases and related proteins. *J. Mol. Biol.*, **333**, 781-815.
- Leipe,D.D., Wolf,Y.I., Koonin,E.V. & Aravind,L. (2002) Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J. Mol. Biol.*, **317**, 41-72.
- Lenzen,C.U., Steinmann,D., Whiteheart,S.W. & Weis,W.I. (1998) Crystal structure of the hexamerization domain of N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein. *Cell*, **94**, 525-536.
- Li,D., Zhao,R., Lilyestrom,W., Gai,D., Zhang,R., DeCaprio,J.A., Fanning,E., Jochimiak,A., Szakonyi,G. & Chen,X.S. (2003) Structure of the replicative helicase of the oncoprotein SV40 large tumour antigen. *Nature*, **423**, 512-518.
- Lipps,G. (2006) Plasmids and viruses of the thermoacidophilic crenarchaeote *Sulfolobus*. *Extremophiles.*, **10**, 17-28.
- Lipps,G. (2004) The replication protein of the *Sulfolobus islandicus* plasmid pRN1. *Biochem. Soc. Trans.*, **32**, 240-244.
- Lipps,G. (2009) Molecular biology of the pRN1 plasmid from *Sulfolobus islandicus*. *Biochem. Soc. Trans.*, **37**, 42-45.
- Lipps,G., Ibanez,P., Stroessenreuther,T., Hekimian,K. & Krauss,G. (2001a) The protein ORF80 from the acidophilic and thermophilic archaeon *Sulfolobus islandicus* binds highly site-specifically to double-stranded DNA and represents a novel type of basic leucine zipper protein. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 4973-4982.
- Lipps,G., Rother,S., Hart,C. & Krauss,G. (2003) A novel type of replicative enzyme harbouring ATPase, primase and DNA polymerase activity. *EMBO J.*, **22**, 2516-2525.
- Lipps,G., Stegert,M. & Krauss,G. (2001b) Thermostable and site-specific DNA binding of the gene product ORF56 from the *Sulfolobus islandicus* plasmid pRN1, a putative archaeal plasmid copy control protein. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 904-913.
- Lipps,G., Weinzierl,A.O., von,S.G., Buchen,C. & Cramer,P. (2004) Structure of a bifunctional DNA primase-polymerase. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 157-162.

- Liu, J., Smith, C.L., DeRyckere, D., DeAngelis, K., Martin, G.S. & Berger, J.M. (2000) Structure and function of Cdc6/Cdc18: implications for origin recognition and checkpoint control. *Mol. Cell*, **6**, 637-648.
- Lundgren, M., Andersson, A., Chen, L., Nilsson, P. & Bernander, R. (2004) Three replication origins in *Sulfolobus* species: synchronous initiation of chromosome replication and asynchronous termination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 7046-7051.
- Lupas, A.N. & Martin, J. (2002) AAA proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **12**, 746-753.
- MacPherson, P., Thorner, L., Parker, L.M. & Botchan, M. (1994) The bovine papilloma virus E1 protein has ATPase activity essential to viral DNA replication and efficient transformation in cells. *Virology*, **204**, 403-408.
- Mansilla-Soto, J., Yoon-Robarts, M., Rice, W.J., Arya, S., Escalante, C.R. & Linden, R.M. (2009) DNA structure modulates the oligomerization properties of the AAV initiator protein Rep68. *PLoS Pathog.*, **5**, e1000513.
- Marians, K.J. (1992) Prokaryotic DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.*, **61**, 673-719.
- Marrione, P.E. & Cox, M.M. (1995) RuvB protein-mediated ATP hydrolysis: functional asymmetry in the RuvB hexamer. *Biochemistry*, **34**, 9809-9818.
- Marsin, S. & Forterre, P. (1998) A rolling circle replication initiator protein with a nucleotidyl-transferase activity encoded by the plasmid pGT5 from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Mol. Microbiol.*, **27**, 1183-1192.
- Martin, A., Baker, T.A., Sauer, R.T. (2005) Rebuilt AAA+ motors reveal operating principles for ATP-fuelled machines. *Nature*, **437**, 1115-1120.
- Matson, S.W. & Richardson, C.C. (1983) DNA-dependent nucleoside 5'-triphosphatase activity of the gene 4 protein of bacteriophage T7. *J. Biol. Chem.*, **258**, 14009-14016.
- Matsunaga, F., Forterre, P., Ishino, Y. & Myllykallio, H. (2001) In vivo interactions of archaeal Cdc6/Orc1 and minichromosome maintenance proteins with the replication origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 11152-11157.
- Meinke, G., Phelan, P., Moine, S., Bochkareva, E., Bochkarev, A., Bullock, P.A. & Bohm, A. (2007) The crystal structure of the SV40 T-antigen origin binding domain in complex with DNA. *PLoS Biol.*, **5**, e23.
- Metcalf, W.W., Zhang, J.K., Apolinario, E., Sowers, K.R. & Wolfe, R.S. (1997) A genetic system for Archaea of the genus *Methanosarcina*: liposome-mediated transformation and construction of shuttle vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 2626-2631.
- Molnar, G.M., Crozat, A., Kraeft, S.K., Dou, Q.P., Chen, L.B. & Pardee, A.B. (1997) Association of the mammalian helicase MAH with the pre-mRNA splicing complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 7831-7836.
- Moreau, M.J., McGeoch, A.T., Lowe, A.R., Itzhaki, L.S. & Bell, S.D. (2007) ATPase site architecture and helicase mechanism of an archaeal MCM. *Mol. Cell*, **28**, 304-314.
- Morris, P.D., Byrd, A.K., Tackett, A.J., Cameron, C.E., Tanega, P., Ott, R., Fanning, E. & Raney, K.D. (2002) Hepatitis C virus NS3 and simian virus 40 T antigen helicases displace streptavidin from 5'-biotinylated oligonucleotides but not from 3'-biotinylated oligonucleotides: evidence for directional bias in translocation on single-stranded DNA. *Biochemistry*, **41**, 2372-2378.
- Morris, P.D. & Raney, K.D. (1999) DNA helicases displace streptavidin from biotin-labeled oligonucleotides. *Biochemistry*, **38**, 5164-5171.

- Morris,P.D., Tackett,A.J. & Raney,K.D. (2001) Biotin-streptavidin-labeled oligonucleotides as probes of helicase mechanisms. *Methods*, **23**, 149-159.
- Mott,M.L. & Berger,J.M. (2007) DNA replication initiation: mechanisms and regulation in bacteria. *Nat.Rev.Microbiol.*, **5**, 343-354.
- Mullis,K., Faloona,F., Scharf,S., Saiki,R., Horn,G. & Erlich,H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.*, **51 Pt 1**, 263-273.
- Myllykallio,H. & Forterre,P. (2000) Mapping of a chromosome replication origin in an archaeon: response. *Trends Microbiol.*, **8**, 537-539.
- Neuwald,A.F. (1999) The hexamerization domain of N-ethylmaleimide-sensitive factor: structural clues to chaperone function. *Structure.*, **7**, R19-R23.
- Neuwald,A.F., Aravind,L., Spouge,J.L. & Koonin,E.V. (1999) AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.*, **9**, 27-43.
- Newlon,C.S. & Theis,J.F. (1993) The structure and function of yeast ARS elements. *Curr.Opin.Genet.Dev.*, **3**, 752-758.
- Ng,W.V., Ciufu,S.A., Smith,T.M., Bumgarner,R.E., Baskin,D., Faust,J., Hall,B., Loretz,C., Seto,J., Slagel,J., Hood,L. & DasSarma,S. (1998) Snapshot of a large dynamic replicon in a halophilic archaeon: megaplasmid or minichromosome? *Genome Res.*, **8**, 1131-1141.
- Ogura,T., Whiteheart,S.W. & Wilkinson,A.J. (2004) Conserved arginine residues implicated in ATP hydrolysis, nucleotide-sensing, and inter-subunit interactions in AAA and AAA+ ATPases. *J.Struct.Biol.*, **146**, 106-112.
- Ogura,T. & Wilkinson,A.J. (2001) AAA+ superfamily ATPases: common structure-diverse function. *Genes Cells*, **6**, 575-597.
- Patel,S.S. & Donmez,I. (2006) Mechanisms of helicases. *J.Biol.Chem.*, **281**, 18265-18268.
- Patel,S.S. & Picha,K.M. (2000) Structure and function of hexameric helicases. *Annu.Rev.Biochem.*, **69**, 651-697.
- Peng,X., Holz,I., Zillig,W., Garrett,R.A. & She,Q. (2000) Evolution of the family of pRN plasmids and their integrase-mediated insertion into the chromosome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J.Mol.Biol.*, **303**, 449-454.
- Pucci,B., De,F.M., Rocco,M., Esposito,F., De,F.M., Esposito,L., Rossi,M. & Pisani,F.M. (2007) Modular organization of the *Sulfolobus solfataricus* mini-chromosome maintenance protein. *J.Biol.Chem.*, **282**, 12574-12582.
- Putnam,C.D., Clancy,S.B., Tsuruta,H., Gonzalez,S., Wetmur,J.G. & Tainer,J.A. (2001) Structure and mechanism of the RuvB Holliday junction branch migration motor. *J.Mol.Biol.*, **311**, 297-310.
- Robinson,N.P., Dionne,I., Lundgren,M., Marsh,V.L., Bernander,R. & Bell,S.D. (2004) Identification of two origins of replication in the single chromosome of the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Cell*, **116**, 25-38.
- Rocque,W.J., Porter,D.J., Barnes,J.A., Dixon,E.P., Lobe,D.C., Su,J.L., Willard,D.H., Gaillard,R., Condreay,J.P., Clay,W.C., Hoffman,C.R., Overton,L.K., Pahel,G., Kost,T.A. & Phelps,W.C. (2000) Replication-associated activities of purified human papillomavirus type 11 E1 helicase. *Protein Expr.Purif.*, **18**, 148-159.

- Russell,R.J., Ferguson,J.M., Hough,D.W., Danson,M.J. & Taylor,G.L. (1997) The crystal structure of citrate synthase from the hyperthermophilic archaeon *pyrococcus furiosus* at 1.9 Å resolution. *Biochemistry*, **36**, 9983-9994.
- Sakakibara,N., Kasiviswanathan,R., Melamud,E., Han,M., Schwarz,F.P. & Kelman,Z. (2008) Coupling of DNA binding and helicase activity is mediated by a conserved loop in the MCM protein. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 1309-1320.
- Sakakibara,N., Kelman,L.M. & Kelman,Z. (2009) How is the archaeal MCM helicase assembled at the origin? Possible mechanisms. *Biochem.Soc.Trans.*, **37**, 7-11.
- Salminen,T., Teplyakov,A., Kankare,J., Cooperman,B.S., Lahti,R. & Goldman,A. (1996) An unusual route to thermostability disclosed by the comparison of *Thermus thermophilus* and *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatases. *Protein Sci.*, **5**, 1014-1025.
- San Martin,M.C., Gruss,C. & Carazo,J.M. (1997) Six molecules of SV40 large T antigen assemble in a propeller-shaped particle around a channel. *J.Mol.Biol.*, **268**, 15-20.
- Sander,B., Golas,M.M. & Stark,H. (2003) Corrim-based alignment for improved speed in single-particle image processing. *J.Struct.Biol.*, **143**, 219-228.
- Sanders,C.M. & Stenlund,A. (1998) Recruitment and loading of the E1 initiator protein: an ATP-dependent process catalysed by a transcription factor. *EMBO J.*, **17**, 7044-7055.
- Sanger,F., Nicklen,S. & Coulson,A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **74**, 5463-5467.
- Santucci,S., Androphy,E.J., Bonne-Andrea,C. & Clertant,P. (1990) Proteins encoded by the bovine papillomavirus E1 open reading frame: expression in heterologous systems and in virally transformed cells. *J.Virol.*, **64**, 6027-6039.
- Santucci,S., Bonne-Andrea,C. & Clertant,P. (1995) Bovine papillomavirus type 1 E1 ATPase activity does not depend on binding to DNA nor to viral E2 protein. *J.Gen.Virol.*, **76 (Pt 5)**, 1129-1140.
- Sawaya,M.R., Guo,S., Tabor,S., Richardson,C.C. & Ellenberger,T. (1999) Crystal structure of the helicase domain from the replicative helicase-primase of bacteriophage T7. *Cell*, **99**, 167-177.
- Schägger,H. & von Jagow G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* Nov 1, **166**, 368-379.
- Scheffzek,K., Ahmadian,M.R., Kabsch,W., Wiesmuller,L., Lautwein,A., Schmitz,F. & Wittinghofer,A. (1997) The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science*, **277**, 333-338.
- Schmid,F.X. (1997) Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. *Protein structure: a practical approach. IRL Press, Oxford*, 261-297.
- Schuck,S. & Stenlund,A. (2005) Assembly of a double hexameric helicase. *Mol.Cell*, **20**, 377-389.
- Schuck,S. & Stenlund,A. (2007) ATP-dependent minor groove recognition of TA base pairs is required for template melting by the E1 initiator protein. *J.Virol.*, **81**, 3293-3302.
- Sedman,J. & Stenlund,A. (1998) The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. *J.Virol.*, **72**, 6893-6897.
- Seo,Y.S., Muller,F., Lusky,M. & Hurwitz,J. (1993) Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **90**, 702-706.

- Shechter,D.F., Ying,C.Y. & Gautier,J. (2000) The intrinsic DNA helicase activity of Methanobacterium thermoautotrophicum delta H minichromosome maintenance protein. *J.Biol.Chem.*, **275**, 15049-15059.
- Shen,J., Gai,D., Patrick,A., Greenleaf,W.B. & Chen,X.S. (2005) The roles of the residues on the channel beta-hairpin and loop structures of simian virus 40 hexameric helicase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **102**, 11248-11253.
- Shin,J.H., Jiang,Y., Grabowski,B., Hurwitz,J. & Kelman,Z. (2003) Substrate requirements for duplex DNA translocation by the eukaryal and archaeal minichromosome maintenance helicases. *J.Biol.Chem.*, **278**, 49053-49062.
- Shin,J.H. & Kelman,Z. (2006b) The replicative helicases of bacteria, archaea, and eukarya can unwind RNA-DNA hybrid substrates. *J.Biol.Chem.*, **281**, 26914-26921.
- Shin,J.H. & Kelman,Z. (2006a) DNA unwinding assay using streptavidin-bound oligonucleotides. *BMC.Mol.Biol.*, **7**, 43.
- Singleton,M.R., Dillingham,M.S. & Wigley,D.B. (2007) Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annu.Rev.Biochem.*, **76**, 23-50.
- Singleton,M.R., Sawaya,M.R., Ellenberger,T. & Wigley,D.B. (2000) Crystal structure of T7 gene 4 ring helicase indicates a mechanism for sequential hydrolysis of nucleotides. *Cell*, **101**, 589-600.
- Skarstad,K. & Boye,E. (1994) The initiator protein DnaA: evolution, properties and function. *Biochim.Biophys.Acta*, **1217**, 111-130.
- Smith,R.H., Spano,A.J. & Kotin,R.M. (1997) The Rep78 gene product of adeno-associated virus (AAV) self-associates to form a hexameric complex in the presence of AAV ori sequences. *J.Virol.*, **71**, 4461-4471.
- Soding,J. (2005) Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics.*, **21**, 951-960.
- Soding,J., Biegert,A. & Lupas,A.N. (2005) The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res.*, **33**, W244-W248.
- Soyfer,V.N. & Potaman,V.N. (1996) Triple-Helical Nucleic Acids. *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg und New York*.
- Spicuglia,S., Kumar,S., Chasson,L., Payet-Bornet,D. & Ferrier,P. (2004) Potassium permanganate as a probe to map DNA-protein interactions in vivo. *J.Biochem.Biophys.Methods*, **59**, 189-194.
- Stewart,A.R., Lednicky,J.A., Benzick,U.S., Tevethia,M.J. & Butel,J.S. (1996) Identification of a variable region at the carboxy terminus of SV40 large T-antigen. *Virology*, **221**, 355-361.
- Stillman,B. (1994) Smart machines at the DNA replication fork. *Cell*, **78**, 725-728.
- Takahashi,T.S., Wigley,D.B. & Walter,J.C. (2005) Pumps, paradoxes and ploughshares: mechanism of the MCM2-7 DNA helicase. *Trends Biochem.Sci.*, **30**, 437-444.
- Tang,X.F., Shen,Y., Matsui,E. & Matsui,I. (2004) Domain topology of the DNA polymerase D complex from a hyperthermophilic archaeon Pyrococcus horikoshii. *Biochemistry*, **43**, 11818-11827.
- Timmins,J. & McSweeney,S. (2006) XPB: An essential helicase involved in both transcription and repair of DNA. *Mol.Cell*, **22**, 149-150.
- Titolo,S., Brault,K., Majewski,J., White,P.W. & Archambault,J. (2003a) Characterization of the minimal DNA binding domain of the human papillomavirus e1 helicase: fluorescence anisotropy studies and characterization of a dimerization-defective mutant protein. *J.Virol.*, **77**, 5178-5191.

- Titolo,S., Welchner,E., White,P.W. & Archambault,J. (2003b) Characterization of the DNA-binding properties of the origin-binding domain of simian virus 40 large T antigen by fluorescence anisotropy. *J.Virol.*, **77**, 5512-5518.
- Toth,E.A., Li,Y., Sawaya,M.R., Cheng,Y. & Ellenberger,T. (2003) The crystal structure of the bifunctional primase-helicase of bacteriophage T7. *Mol.Cell*, **12**, 1113-1123.
- Tye,B.K. & Sawyer,S. (2000) The hexameric eukaryotic MCM helicase: building symmetry from nonidentical parts. *J.Biol.Chem.*, **275**, 34833-34836.
- van Heel,M. & Frank,J. (1981) Use of multivariate statistics in analysing the images of biological macromolecules. *Ultramicroscopy*, **6**, 187-194.
- van Heel,M., Harauz,G., Orlova,E.V., Schmidt,R. & Schatz,M. (1996) A new generation of the IMAGIC image processing system. *J.Struct.Biol.*, **116**, 17-24.
- van Heel,M. & Stofferl-Meilicke,M. (1985) Characteristic views of E. coli and B. stearotherophilus 30S ribosomal subunits in the electron microscope. *EMBO J.*, **4**, 2389-2395.
- Velankar,S.S., Soutanas,P., Dillingham,M.S., Subramanya,H.S. & Wigley,D.B. (1999) Crystal structures of complexes of PcrA DNA helicase with a DNA substrate indicate an inchworm mechanism. *Cell*, **97**, 75-84.
- Venkatesan,M. & Nossal,N.G. (1982) Bacteriophage T4 gene 44/62 and gene 45 polymerase accessory proteins stimulate hydrolysis of duplex DNA by T4 DNA polymerase. *J.Biol.Chem.*, **257**, 12435-12443.
- Vetter,I.R. & Wittinghofer,A. (1999) Nucleoside triphosphate-binding proteins: different scaffolds to achieve phosphoryl transfer. *Q.Rev.Biophys.*, **32**, 1-56.
- von Öhsen,N., Sommer,I., Zimmer,R. (2003) Profile-Profile Alignment: A Powerful Tool for Protein Structure Prediction. *Pacific Symposium on Biocomputing*, **8**, 252-263
- Walker,J.E., Saraste,M., Runswick,M.J. & Gay,N.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.*, **1**, 945-951.
- Wang,W., Manna,D. & Simmons,D.T. (2007) Role of the hydrophilic channels of simian virus 40 T-antigen helicase in DNA replication. *J.Virol.*, **81**, 4510-4519.
- Wiekowski,M., Schwarz,M.W. & Stahl,H. (1988) Simian virus 40 large T antigen DNA helicase. Characterization of the ATPase-dependent DNA unwinding activity and its substrate requirements. *J.Biol.Chem.*, **263**, 436-442.
- Woody,R.W. (1995) Circular dichroism. *Methods Enzymol.*, **246**, 34-71.
- Yamada,K., Miyata,T., Tsuchiya,D., Oyama,T., Fujiwara,Y., Ohnishi,T., Iwasaki,H., Shinagawa,H., Ariyoshi,M., Mayanagi,K. & Morikawa,K. (2002) Crystal structure of the RuvA-RuvB complex: a structural basis for the Holliday junction migrating motor machinery. *Mol.Cell*, **10**, 671-681.
- Yang,L., Mohr,I., Fouts,E., Lim,D.A., Nohaile,M. & Botchan,M. (1993) The E1 protein of bovine papilloma virus 1 is an ATP-dependent DNA helicase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **90**, 5086-5090.
- Ye,J., Osborne,A.R., Groll,M. & Rapoport,T.A. (2004) RecA-like motor ATPases-lessons from structures. *Biochim.Biophys.Acta*, **1659**, 1-18.
- Yeo,H.J., Ziegelin,G., Korolev,S., Calendar,R., Lanka,E. & Waksman,G. (2002) Phage P4 origin-binding domain structure reveals a mechanism for regulation of DNA-binding activity by homo- and heterodimerization of winged helix proteins. *Mol.Microbiol.*, **43**, 855-867.

- Yoon-Robarts,M., Blouin,A.G., Bleker,S., Kleinschmidt,J.A., Aggarwal,A.K., Escalante,C.R. & Linden,R.M. (2004) Residues within the B' motif are critical for DNA binding by the superfamily 3 helicase Rep40 of adeno-associated virus type 2. *J.Biol.Chem.*, **279**, 50472-50481.
- Zhang,X., Chaney,M., Wigneshweraraj,S.R., Schumacher,J., Bordes,P., Cannon,W. & Buck,M. (2002) Mechanochemical ATPases and transcriptional activation. *Mol.Microbiol.*, **45**, 895-903.
- Zhou,X., Zolotukhin,I., Im,D.S. & Muzyczka,N. (1999) Biochemical characterization of adeno-associated virus rep68 DNA helicase and ATPase activities. *J.Virol.*, **73**, 1580-1590.
- Ziegelin,G., Calendar,R., Lurz,R. & Lanka,E. (1997) The helicase domain of phage P4 alpha protein overlaps the specific DNA binding domain. *J.Bacteriol.*, **179**, 4087-4095.
- Ziegelin,G., Linderoth,N.A., Calendar,R. & Lanka,E. (1995) Domain structure of phage P4 alpha protein deduced by mutational analysis. *J.Bacteriol.*, **177**, 4333-4341.
- Ziegelin,G., Scherzinger,E., Lurz,R. & Lanka,E. (1993) Phage P4 alpha protein is multifunctional with origin recognition, helicase and primase activities. *EMBO J.*, **12**, 3703-3708.

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Die vorliegende Arbeit wurde vom September 2005 bis zum August 2009 am Lehrstuhl für Biochemie der Universität Bayreuth unter Leitung von Prof. Dr. Georg Lipps angefertigt. Bei ihm möchte ich mich für das interessante Thema, die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und die gewährten Freiheiten bei der Bearbeitung bedanken.

Bei Prof. Dr. Krauss möchte ich mich dafür bedanken, dass ich diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen durfte.

Dem Labor von Prof. Dr. F.X. Schmid sei an dieser Stelle für die Einführung am CD-Spektrometer und für dessen Benutzung gedankt.

Norbert Grillenbeck möchte ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Laborarbeit meinen Dank aussprechen.

Meinen Laborkolleginnen und -kollegen Kirsten Beck, Silvia Berkner, Kristina Kufner, Han Dong, und Linda Wenzel möchte ich für das angenehme Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft danken. Kirsten Beck sei an dieser Stelle nochmals herzlich für ihre Unterstützung gedankt.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei ebenfalls ein Dank für die Finanzierung dieses Projekts ausgesprochen.

Meiner Schwester Christina möchte ich an dieser Stelle dafür danken, dass sie diese Arbeit auf Formalia hin durchgesehen hat.

Meinen lieben Eltern, die mich stets nach besten Kräften unterstützt haben, gilt mein ganz besonderer Dank. Ohne sie hätte diese Arbeit nie realisiert werden können.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich weder an der Universität Bayreuth noch anderweitig versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung abzulegen.

Bayreuth, den 22. September 2009

A handwritten signature in black ink, consisting of several fluid, overlapping strokes that form a stylized representation of the name 'Martin Sanchez'.

(Martin Sanchez)