

Konformationsänderungen im katalytischen Zyklus
der RNA-Helikase YxiN –
Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
in einzelnen Molekülen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat –
der Fakultät Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Diplom-Biochemikerin
Bettina Theißen

Bayreuth 2006

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth zur Erlangung des akademischen Grades - Doktor der Naturwissenschaften - genehmigten Dissertation.

Diese Arbeit wurde von März 2003 bis Mai 2006 am Lehrstuhl für Experimentalphysik IV der Universität Bayreuth unter der Anleitung von Dr. Dagmar Klostermeier angefertigt.

Promotionsgesuch eingereicht am: 02. Mai 2006

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 20. Juli 2006

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. F.X. Schmid (Erster Gutachter)

Prof. Dr. Dagmar Klostermeier (Zweiter Gutachter)

Prof. Dr. Benedikt Westermann

Prof. Dr. Matthias Ullmann (Vorsitzender)

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | ii |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 RNA-Helikasen | 1 |
| 1.1.1 Zelluläre Funktion | 2 |
| 1.1.2 Aufbau von DEAD-Box Proteinen | 2 |
| 1.1.3 Modelle zur Entwindung von RNA durch RNA-Helikasen | 4 |
| 1.1.4 Die RNA-Helikase YxiN | 6 |
| 1.2 Einzelmolekül-Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer | 7 |
| 1.2.1 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer | 7 |
| 1.2.2 Einzelmolekül-FRET-Experimente | 8 |
| 1.2.3 Farbstoffe für Einzelmolekül-FRET-Experimente | 9 |
| 1.3 Zielsetzung | 11 |
| 2 Material und Methoden | 13 |
| 2.1 Material | 13 |
| 2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial | 13 |
| 2.1.2 Enzyme und Proteine | 14 |
| 2.1.3 Bakterienstämme und Plasmide | 14 |
| 2.1.4 Oligonukleotide | 15 |
| 2.1.5 Geräte | 17 |
| 2.1.6 Datenauswertung | 18 |
| 2.2 Elektrophorese | 18 |
| 2.2.1 Agarosegelelektrophorese | 18 |
| 2.2.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 19 |
| 2.2.3 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese | 20 |
| 2.2.4 Native RNA-Gelelektrophorese | 20 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.3 | Molekularbiologische Methoden | 20 |
| 2.3.1 | Kulturmedium | 20 |
| 2.3.2 | Einführung von Mutationen | 21 |
| 2.3.3 | Plasmidpräparation | 22 |
| 2.3.4 | Kontrolle der Mutagenesereaktion | 22 |
| 2.3.5 | Produktion und Fermentation von YxiN | 23 |
| 2.4 | Proteinreinigung | 23 |
| 2.4.1 | Reinigung produzierter Proteine | 23 |
| 2.4.2 | Hydrophobe Chromatographie zur Reinigung markierter Proteine | 26 |
| 2.5 | <i>in-vitro</i> -Transkription des RNA-Substrats | 26 |
| 2.6 | Spektroskopische Methoden | 28 |
| 2.6.1 | Absorptionsmessungen | 28 |
| 2.6.2 | Circulardichroismus | 30 |
| 2.6.3 | Fluoreszenzmessungen | 31 |
| 2.7 | Limitierte Proteolyse | 35 |
| 2.8 | Aktivität von YxiN | 35 |
| 2.8.1 | ATPase-Aktivität | 35 |
| 2.8.2 | RNA-Helikase-Aktivität | 37 |
| 2.9 | Fluoreszenzmarkierung | 38 |
| 2.9.1 | Farbstoffe | 38 |
| 2.9.2 | Markierungskinetik | 39 |
| 2.9.3 | Markierung mit einem Farbstoff | 39 |
| 2.9.4 | Markierung mit zwei Farbstoffen | 39 |
| 2.10 | Einzelmolekülexperimente | 41 |
| 2.10.1 | Aufbau | 41 |
| 2.10.2 | Messungen | 44 |
| 2.10.3 | Auswertung | 45 |
| 3 | Ergebnisse | 49 |
| 3.1 | Auswahl der Positionen zur Fluoreszenzmarkierung | 49 |
| 3.2 | Reinigung von YxiN Mutanten | 50 |
| 3.3 | <i>in-vitro</i> -Transkription | 52 |
| 3.4 | Proteinfluoreszenz von wildtypischem YxiN | 52 |
| 3.5 | Substratbindung | 54 |
| 3.5.1 | Nukleotidbindung | 54 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.5.2 | RNA-Bindung | 56 |
| 3.6 | Thermische Stabilität | 57 |
| 3.7 | Reaktivität der Cysteine | 58 |
| 3.7.1 | Zugänglichkeit für Ellmans Reagenz | 59 |
| 3.7.2 | Zugänglichkeit für Farbstoffe | 60 |
| 3.8 | Aktivität | 61 |
| 3.8.1 | ATPase-Aktivität | 61 |
| 3.8.2 | Helikase-Aktivität | 64 |
| 3.9 | Fluoreszenzmarkierung | 70 |
| 3.9.1 | Markierung mit einem Farbstoff | 71 |
| 3.9.2 | Markierung mit zwei Farbstoffen | 72 |
| 3.10 | Bestimmung des Förster-Abstands | 79 |
| 3.11 | Einzelmolekülexperimente | 81 |
| 3.11.1 | Schwierigkeiten bei Einzelmolekülmessungen | 81 |
| 3.11.2 | Korrekturparameter | 82 |
| 3.11.3 | Optimierung von Messparametern | 83 |
| 3.11.4 | Messungen an YxiN-Mutanten | 86 |
| 4 | Diskussion | 97 |
| 4.1 | Biochemische Charakterisierung von YxiN | 97 |
| 4.1.1 | Rekombinantes YxiN kann in nativer Form aus <i>Escherichia coli</i> gerei- nigt werden | 98 |
| 4.1.2 | YxiN bindet RNA und Adenin-Nukleotide | 98 |
| 4.1.3 | YxiN ist eine RNA-abhängige ATPase | 100 |
| 4.1.4 | YxiN ist eine ATP-abhängige RNA-Helikase | 100 |
| 4.2 | Markierung von YxiN mit Alexa488 und TMR | 102 |
| 4.2.1 | Die Entfernung der zugänglichen Cysteine in YxiN führt zu einer re- duzierten Stabilität und Aktivität | 102 |
| 4.2.2 | Das Homologiemodell eignet sich nur bedingt zur Auswahl oberflä- chenexponierter Positionen | 103 |
| 4.2.3 | DTNB ist keine geeignete Referenz für die Reaktivität von Cysteinen mit farbstoffgekoppeltem Maleimid. | 103 |
| 4.2.4 | Die Einführung von Cysteinen führt nur zu geringen Änderungen der Stabilität und Aktivität von YxiN. | 104 |
| 4.2.5 | YxiN kann mit zwei verschiedenen Farbstoffen markiert werden | 105 |

| | | |
|-------|--|------------|
| 4.2.6 | Limitierte Proteolyse bietet eine schnelle Methode, die Orientierung der Markierungsreaktion zu überprüfen | 105 |
| 4.2.7 | Die Orientierung von Fluorophoren in YxiN ist vor allem von den beteiligten Positionen abhängig | 106 |
| 4.2.8 | Markierungseffizienz und -orientierung sind entscheidend für Einzelmolekül-FRET-Experimente | 107 |
| 4.2.9 | Der Förster-Abstand hängt von der Position von Alexa488 in YxiN ab | 107 |
| 4.3 | Einzelmolekül-FRET-Experimente zum katalytischen Zyklus von YxiN | 108 |
| 4.3.1 | Einzelmolekül-FRET-Experimente ermöglichen die Beobachtung von Konformationsänderungen in YxiN | 108 |
| 4.3.2 | Ein modifiziertes Destabilisierungsmodell für den Mechanismus der RNA-Helikase YxiN | 109 |
| 4.4 | Ausblick | 112 |
| | Zusammenfassung | 115 |
| | Summary | 117 |
| | Abkürzungsverzeichnis | 119 |
| | Literaturverzeichnis | 121 |

Kapitel 1

Einleitung

Für die Funktionalität biologischer Makromoleküle ist die korrekte dreidimensionale Struktur eine entscheidende Voraussetzung. Sowohl RNA als auch Proteine können ihre jeweilige Funktion nur erfüllen, wenn sie korrekt gefaltet vorliegen. Ein aktives Ribosom z.B. enthält RNAs, die die korrekte Anordnung besitzen und mit den richtigen Proteinen wechselwirken müssen, die ebenfalls korrekt gefaltet sein müssen. Daher ist es nicht erstaunlich, dass im Laufe der Evolution Mechanismen entstanden sind, um die Bildung der korrekten Strukturen dieser Makromoleküle sicherzustellen. Enzyme, die bei der Faltung von Proteinen helfen, werden als Chaperone bezeichnet. Als RNA-Helikasen werden die Proteine zusammengefasst, die RNA-Sekundärstrukturen aufheben oder verändern beziehungsweise Wechselwirkungen zwischen RNA und Proteinen lösen.

1.1 RNA-Helikasen

Helikasen werden anhand von konservierten Motiven in drei Superfamilien (SF) und zwei kleinere Familien eingeteilt (Gorbalenya und Koonin, 1993). DNA-Helikasen gibt es in allen Superfamilien. RNA-Helikasen gehören meist zur SF 2, einige virale RNA-Helikasen gehören zur SF 1 (Silverman *et al.*, 2003). Die größte Familie in SF 2 sind die erstmals von Linder *et al.* (1989) beschriebenen DEAD-Box Proteine, die nach der Sequenz eines ihrer konservierten Motive benannt sind (Asp-Glu-Ala-Asp, entspricht im Ein-Buchstaben-Code DEAD). Die ebenfalls zur SF 2 gehörenden RNA-Helikasen der DEAH und DExH Familien zeigen entsprechende Abwandlungen in diesem Motiv. In dieser Arbeit wird die RNA-Helikase YxiN, ein DEAD-Box-Protein aus *Bacillus subtilis*, untersucht.

1.1.1 Zelluläre Funktion

RNA spielt in einer Reihe zellulärer Prozesse eine wichtige Rolle. In allen diesen Prozessen konnten RNA-Helikasen identifiziert werden (Lüking *et al.*, 1998; Cordin *et al.*, 2005).

Bei der Transkription sind RNA-Helikasen wie das eukaryotische Protein p68 an der Regulation beteiligt (Bates *et al.*, 2005a). Bei der Bildung (Xu *et al.*, 2004) und dem Abbau (Arenas und Abelson, 1997) des Spleißosoms sowie der eigentlichen Reaktion des Spleißens (Lüking *et al.*, 1998) spielen RNA-Helikasen eine wichtige Rolle. Auch an dem Export von mRNA durch die Kernmembran sind DEAD-Box Proteine wie z.B. Dbp5 beteiligt. Ihre genaue Funktion ist unklar. Es wird vermutet, dass sie die Interaktion der mRNA mit anderen am Export beteiligten Proteinen aufheben oder die Sekundärstruktur der mRNA für den Transport auflösen (Cordin *et al.*, 2005). Bei dem Abbau von mRNA wurden ebenfalls DEAD-Box Proteine nachgewiesen, z.B. RhlB in *Escherichia coli* (Carpousis, 2002).

Bei der Translation wird die Sequenz der mRNA von dem RNA-Protein-Komplex des Ribosoms in eine Aminosäuresequenz und damit ein Protein übersetzt. Es gibt verschiedene DEAD-Box Proteine, für die eine Beteiligung an der Biogenese der Ribosomen nachgewiesen wurde, z.B. Has1p aus *Saccharomyces cerevisiae* (Emery *et al.*, 2004), oder vorhergesagt wird. Das am ausführlichsten untersuchte Mitglied der DEAD-Box Familie ist ein eukaryotischer Initiationsfaktor der Translation, eIF4A (Rogers *et al.*, 2002).

Aufgrund ihrer Bedeutung in vielen Schritten des mRNA-Stoffwechsels sind RNA-Helikasen auch an der Regulation der Genexpression beteiligt, z.B. in der Zelldifferenzierung (Abdelhaleem, 2005).

1.1.2 Aufbau von DEAD-Box Proteinen

DEAD-Box Helikasen enthalten in zwei Kern-Domänen von zusammen 350 bis 400 Aminosäuren neun konservierte Motive, die an der RNA-Bindung und Entwindung sowie der ATP-Bindung und Hydrolyse beteiligt sind. Ihre Sequenz ist in Abbildung 1.1 gezeigt.

Die Motive I und II entsprechen den Walker A und B Motiven, die auch in vielen anderen NTP-hydrolysierenden Enzymen gefunden wurden (Walker *et al.*, 1982). Motiv I ist essentiell für die Bindung und Hydrolyse von ATP (gezeigt z.B. für eIF4A von Rozen *et al.* (1989)). Das namensgebende Motiv II ist an der Bindung von Magnesium und ATP und der Hydrolyse von ATP beteiligt. Die Interaktion der Aminosäuren dieses Motivs mit den Motiven I, III und VI könnte die Voraussetzung für die korrekte Bildung der ATP-Bindungstasche und damit für die ATP-Hydrolyse sein (Cordin *et al.*, 2005). Motiv III koppelt die Hydrolyse von ATP an die Entwindung von RNA: Durch Mutationen in diesem Motiv wird die Helikase-Aktivität

| Q-Motiv | Motiv I | Ia | Ib | II | III | IV | V | VI |
|------------------|----------|--------|-------|------|-----|-----------|-----------|----------|
| F-(16)-GaccPohlQ | AxTGoGKT | PTRELA | TPGRI | DEAD | SAT | llFhxTccx | TdVuARGID | HRIGRTGR |

Abbildung 1.1: Sequenz der konservierten Motive in DEAD-Box Proteinen (Cordin et al., 2005). x: beliebige Aminosäure; o: Aminosäuren mit Hydroxyl-Gruppe (S,T); l: I,L,V; h: hydrophobe Aminosäuren (A,F,G,I,L,M,P,V,W,Y), a: aromatische Aminosäuren (F,W,Y); c: geladene Aminosäuren (D,E,H,K); u: A,G. Die blau unterlegten Motive sind an der Bindung und Hydrolyse von ATP beteiligt, die grün unterlegten an der Bindung von Nukleinsäure. Das türkis markierte SAT-Motiv (Motiv III) ist an der Kopplung von ATP-Hydrolyse und RNA-Bindung beteiligt. Motiv VI wechselwirkt vermutlich sowohl mit RNA als auch mit ATP. Die Funktion der einzelnen Motive ist im Text erläutert.

reduziert, die RNA-stimulierte ATP-Hydrolyse bleibt erhalten (gezeigt z.B. für eIF4A von Pause und Sonenberg (1992) und für Has1p aus Hefe von Rocak *et al.* (2005)). Die Funktion der Motive Ia, Ib, IV und V ist nicht geklärt. In Kristallstrukturen von RNA-Helikasen im Komplex mit DNA-Oligonukleotiden sind die Motive Ia, Ib und IV an der Bindung der Nukleinsäure beteiligt, z.B. bei NS3 aus dem Hepatitis C Virus (Kim *et al.*, 1998). Motiv V bildet eine Reihe von Kontakten mit anderen konservierten Motiven aus (vgl. für eIF4A Caruthers *et al.* (2000) und Shi *et al.* (2004) für das menschliche Protein UAP56) und könnte daher an der intramolekularen Koordination von ATP-Hydrolyse und RNA-Entwindung beteiligt sein (Cordin *et al.*, 2005). Motiv VI ist sowohl an der ATP-Hydrolyse als auch an der Interaktion mit RNA beteiligt (für eIF4A vgl. Pause *et al.* (1993)). Das Q-Motiv war bei der ursprünglichen Einteilung der RNA-Helikasen noch nicht bekannt, ist jedoch in den DEAD-Box Proteinen konserviert. Es formt spezifische Wechselwirkungen mit Adenin und interagiert mit Motiv I. Daher wird vermutet, dass das Q-Motiv über die Interaktion mit Motiv I die Spezifität für ATP gegenüber anderen Nukleotiden festlegt (Cordin *et al.*, 2005).

Die beiden Helikasedomänen zeigen in allen bekannten Strukturen eine RecA-ähnliche Faltung (Bird *et al.*, 1998). Die Motive IV, V und VI liegen in der C-terminalen Domäne, die restlichen Motive in der N-terminalen Domäne. Alle Motive befinden sich an der Oberfläche der Domänen. Diese sind durch einen flexiblen Linker verbunden und in verschiedenen Kristallstrukturen unterschiedlich zueinander orientiert, so dass bei der Substratbindung und Katalyse vermutlich eine Bewegung der Domänen erfolgt (Lorsch und Herschlag, 1998).

Viele DEAD-Box-Proteine besitzen zusätzliche Domänen. Eine solche ist z.B. bei YxiN aus *Bacillus subtilis* für die Substratspezifität verantwortlich (Kossen *et al.*, 2002). Die Regulation der Aktivität kann auch durch Interaktionspartner erfolgen (Silverman *et al.*, 2003). So wird z.B. wird die Aktivität von eIF4A *in vitro* durch den Initiationsfaktor eIF4B stark stimuliert (Rozen *et al.*, 1990).

1.1.3 Modelle zur Entwindung von RNA durch RNA-Helikasen

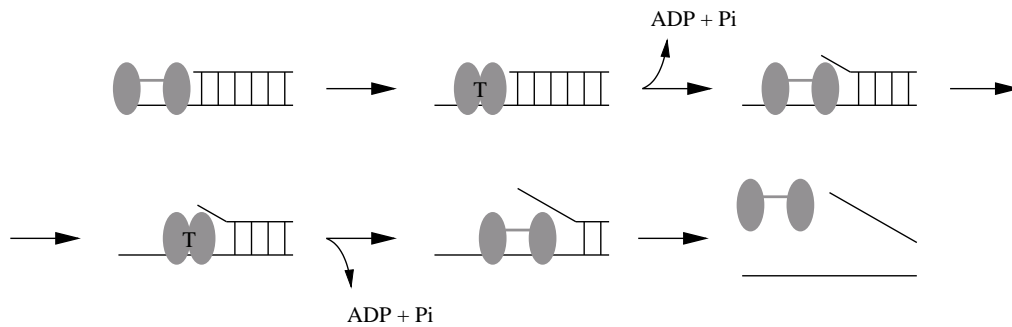
DEAD-Box-Proteine können prozessiv RNA-Doppelhelices auflösen, z.B. p68 (Hirling *et al.*, 1989), kurze Doppelstränge ohne Prozessivität destabilisieren und damit entwinden, wie für eIF4A beobachtet (Rogers *et al.*, 1999), oder RNA-Protein-Wechselwirkungen aufheben, z.B. NPH II (Jankowsky *et al.*, 2001). Ein Nachweis der Helikase-Aktivität gelang *in vitro* bislang nur für wenige DEAD-Box-Proteine. Die meisten untersuchten RNA-Helikasen brauchen einen einzelsträngigen Bereich in Nachbarschaft zu dem zu entwindenden Doppelstrang. Die Orientierung ist dabei meist unwichtig und die Entwindung erfolgt sowohl in 3'-5'-Richtung als auch in 5'-3'-Richtung. Für DbpA aus *Escherichia coli* wurde jedoch gezeigt, dass der Doppelstrang am 5'-Ende einer einzelsträngigen RNA liegen muss (Diges und Uhlenbeck, 2005). Eine Substratspezifität ist nur in wenigen Fällen gezeigt worden und bedarf zusätzlicher Domänen oder Interaktionspartner (Kossen *et al.*, 2002; Silverman *et al.*, 2003).

Der Mechanismus der RNA-Entwindung ist nicht geklärt. Es existieren jedoch verschiedene Modelle, die in Abbildung 1.2 gezeigt sind. Im *inchworm*-Modell bewegt sich die Helikase durch wiederholtes Öffnen und Schließen der beiden Domänen schrittweise ATP-abhängig auf der einzelsträngigen RNA und verdrängt dabei entweder passiv durch die Bindung des Einzelstrangs oder aktiv durch Wechselwirkung mit dem Doppelstrang den zweiten Strang. Die mit dem Öffnen und Schließen verbundene Konformationsänderung führt zu großen intramolekularen Abstandsänderungen.

Die Entwindung nach einem *active-rolling*-Mechanismus erfordert eine dimere oder multimerere Helikase. Die Untereinheiten zeigen abhängig vom gebundenen Nukleotid unterschiedliche Affinität für einzelsträngige und doppelsträngige RNA. In der von Cordin *et al.* (2005) vorgeschlagenen Variante (in Abbildung 1.2 dargestellt) bindet die ATP-gebundene Untereinheit einzelsträngige RNA, die ADP-gebundene Untereinheit kann keine RNA binden. ATP-Bindung und Hydrolyse führt damit abwechselnd zur Bindung und Freisetzung von RNA. Damit verbundene Konformationsänderungen führen zu einer Ausrichtung der Untereinheiten und ermöglichen damit eine gezielte Bewegung und damit die Verdrängung des zweiten RNA-Stranges. Ein ähnliches Modell wurde von Tuteja und Tuteja (2004) für DNA-Helikasen vorgeschlagen. In beiden Varianten vertauschen die beiden Untereinheiten zyklisch Position und Funktion.

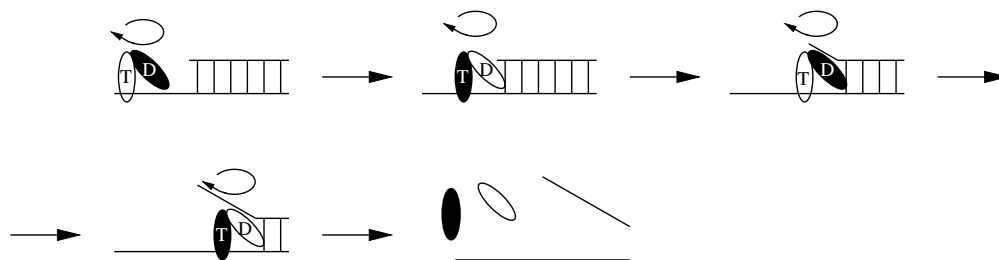
Beide beschriebenen Modelle sollten eine prozessive Helikase-Aktivität ermöglichen, die jedoch bei RNA-Helikasen im Allgemeinen nicht beobachtet werden kann. Eine mögliche Ursache wäre eine sehr geringe Affinität für RNA, so dass das Protein nach einem oder wenigen Zyklen wieder von der RNA dissoziiert. Eine alternative Erklärung bietet

Inchworm-Modell



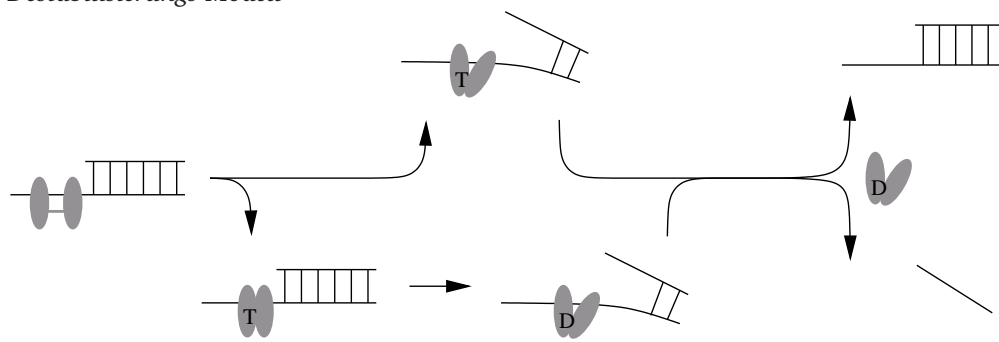
Die Helikase bindet in einer offenen Konformation an die RNA. Bei der Bindung von ATP findet eine Bewegung im Protein statt, die zu einer geschlosseneren Konformation führt. ATP-Hydrolyse bzw. ADP- oder Phosphat-Freisetzung führt zu einer Rückkehr zur offenen Konformation an einer Bindungsstelle, die auf der RNA weitergewandert ist. Mehrmalige Wiederholung des Zyklus führt zu einer Wanderung auf der RNA. Durch diese Bewegung wird der zweite Strang verdrängt.

Active-Rolling-Modell



Zwei verschiedene Untereinheiten einer dimeren oder multimeren Helikase (schwarz und weiß dargestellt) zeigen abhängig von dem gebundenen Nukleotid (angezeigt durch T für ATP und D für ADP) unterschiedliche Affinität für die einzelsträngige und doppelsträngige RNA. Ändert sich die Affinität der Untereinheiten durch Hydrolyse und Nukleotidaustausch, so dreht sich das Dimer und entwindet dabei den Doppelstrang.

Destabilisierungs-Modell



Die Helikase bindet an den einzelsträngigen Bereich der RNA. Konformationsänderungen bei der ATP-Bindung (oben) oder der ATP-Hydrolyse (unten) führen zur Destabilisierung einiger benachbarter Basenpaare, so dass ein kurzer Doppelstrang dissoziieren kann.

Abbildung 1.2: Modelle für den Mechanismus der RNA-Helikasen (Cordin et al., 2005). Konformationsänderungen bei der Bindung und Hydrolyse von ATP führen auf unterschiedlichen Wegen zur Entwindung der RNA.

das Destabilisierungs-Modell. Dabei bindet das Protein an den einzelsträngigen Bereich der RNA. ATP-Bindung oder Hydrolyse führen dann zu einer Konformationsänderung im Protein, durch die die ersten Basenpaare eines unmittelbar benachbarten doppelsträngigen Bereiches destabilisiert werden. Ist die Helix kurz genug, reicht diese Destabilisierung aus, damit der Doppelstrang dissoziieren kann. Ist die Helix jedoch länger, werden sich die Basenpaare einfach wieder zurückbilden (Rogers *et al.*, 2001). Da die RNA-bindenden Motive an der Oberfläche zwischen den beiden Helikasedomänen angeordnet sind, besteht die Konformationsänderung, die zur Stabilisierung führt, vermutlich aus einer geänderten Orientierung der beiden Helikasedomänen zueinander. Eine solche Bewegung würde deutliche Änderungen in den Abständen zwischen verschiedenen Positionen in den beiden Domänen erzeugen.

Das *active-rolling*-Modell erfordert eine Dimerisierung der Helikase. Das *inchworm*-Modell und das Destabilisierungsmodell sagen beide deutliche Konformationsänderungen im katalytischen Zyklus der Helikase voraus. Die Koordination dieser Konformationsänderungen mit der ATP-Bindung und Hydrolyse ist nicht geklärt. Erste Hinweise auf unterschiedliche Konformationen lieferten z.B. Experimente mit limitierter Proteolyse, wie sie mit DbpA aus *Escherichia coli* (Henn *et al.*, 2002) oder eIF4A (Lorsch und Herschlag, 1998) durchgeführt wurden. Limitierte Proteolyse kann durch inter- und intramolekulare Konformationsänderungen beeinflusst werden. Änderungen in der Fluoreszenz, wie sie für DbpA bei RNA- und ADP-Bindung gezeigt wurden (Henn *et al.*, 2002), sind eher auf intramolekulare Konformationsänderungen zurückzuführen. Die genaue Natur dieser Konformationsänderungen ist bisher unbekannt.

1.1.4 Die RNA-Helikase YxiN

Das in dieser Arbeit untersuchte DEAD-Box Protein YxiN aus *Bacillus subtilis* besteht aus 479 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 54 kDa. RNA-abhängige ATPase-Aktivität und ATP-abhängige RNA-Helikase-Aktivität wurden nachgewiesen (Kossen und Uhlenbeck, 1999). Die beiden N-terminalen Helikasedomänen des Proteins enthalten die konservierten Motive der DEAD-Box Familie. YxiN bindet wie das homologe Protein DbpA aus *Escherichia coli* an Helix 92 der 23S rRNA und entwindet doppelhelikale Bereiche in der Umgebung. Experimente mit chimären Proteinen und den einzelnen Domänen von YxiN haben gezeigt, dass für diese Spezifität ausschließlich die dritte, C-terminale Domäne mit etwa 80 Aminosäuren verantwortlich ist (Kossen *et al.*, 2002; Karginov *et al.*, 2005). Die Struktur dieser Domäne ähnelt dem sogenannten *RNA recognition motif*, das in vielen RNA-bindenden Proteinen gefunden wurde (Wang *et al.*, 2006).

Für DbpA wurde gezeigt, dass die Entwindung von RNA immer in 3'-5'-Richtung erfolgt, so dass der doppelhelikale Bereich an das 5'-Ende des einzelsträngigen Bereichs anschließen muss. Die spezifische Bindungsstelle kann jedoch in 3' oder 5'-Richtung von der zu entwindenden Sequenz liegen (Diges und Uhlenbeck, 2005). DbpA und YxiN entwinden *in vivo* vermutlich fehlgefaltete RNA-Strukturen in der näheren Umgebung dieser Bindungsstelle. Die genaue zelluläre Funktion dieser Helikasen ist nicht bekannt, wird aber in der Biogenese der Ribosomen vermutet. Grundlage dafür ist die Beobachtung, dass die ATPase-Aktivität von DbpA zwar von denaturierten Ribosomen, ribosomaler RNA und RNA-Fragmenten mit Helix 92, nicht aber von intakten Ribosomen stimuliert werden kann (Tsu und Uhlenbeck, 1998).

1.2 Einzelmolekül-Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer

Die Unterscheidung und Untersuchung von unterschiedlichen Konformationen und Konformationsänderungen in Proteinen ist schwierig. Eine vielversprechende Methode zur Verfolgung von Konformationsänderungen in Echtzeit sind Einzelmolekül-Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer-Experimente. Energietransfer zwischen zwei Farbstoffen, die an das Protein gekoppelt sind, kann als Maß für den Abstand dieser Farbstoffe und damit die Konformation in einzelnen Molekülen beobachtet werden. Das ermöglicht die Unterscheidung verschiedener Zustände und eventuell sogar die Beobachtung von zeitlichen Änderungen.

1.2.1 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer

Der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) ermöglicht die Bestimmung von Abständen zwischen zwei fluoreszierenden Gruppen. Für den Energietransfer muss ein Donorfärbstoff angeregt werden. Wenn sich ein geeigneter Akzeptorfärbstoff in der Nähe befindet, kann die Energie des angeregten Zustands strahlungslos auf diesen übertragen werden. Voraussetzung dafür ist, dass das Fluoreszenzspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappt. Die Theorie zu FRET wurde von Förster (1959) erstmals beschrieben und geht von einer Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen den beiden Fluorophoren aus. Die Effizienz des Transfers E ist stark vom Abstand der Fluorophore abhängig; es gilt:

$$E = \frac{R_0^6}{R^6 + R_0^6}. \quad (1.1)$$

R_0 , der sogenannte Förster-Abstand, ist dabei der Abstand, bei dem die Transfereffizienz

0,5 beträgt. Der Wert von R_0 liegt typischerweise zwischen 2 nm und 6 nm (Selvin, 2000) und hängt von den spektralen Eigenschaften der Farbstoffe und der relativen Orientierung der Dipole der Farbstoffe sowie dem Brechungsindex der Lösung ab. Je nach Farbstoffpaar eignet sich FRET zur Untersuchung von Abständen zwischen 1 nm und 10 nm.

1.2.2 Einzelmolekül-FRET-Experimente

Ensemble-FRET-Experimente ermöglichen die Bestimmung statischer Abstände und bei geeigneter Synchronisation auch die Beobachtung von Abstandsänderungen, z. B. in *Stopped-Flow*-Experimenten zur Proteinfaltung. Dabei wird jedoch immer ein Mittelwert gemessen, verschiedene Zustände können nicht unterschieden werden. Ebenso können dynamische Fluktuationen in der Proteinkonformation und nicht identisch ablaufende Prozesse nach der Synchronisation auf diese Weise nicht unterschieden werden. Eine Möglichkeit, verschiedene Zustände in einer Lösung zu unterscheiden, bieten zeitaufgelöste FRET-Experimente. Dabei werden die Fluoreszenzlebenszeiten des Donorfluorophors bestimmt. Eine Identifizierung unterschiedlicher Lebenszeiten ist aufgrund des quasi-statischen Verhaltens auf der sehr kurzen Zeitskala der Anregung, die mit Pikosekunden-Pulsen erfolgt, möglich. Da die Lebenszeit durch Energietransfer verringert wird, können Zustände mit unterschiedlichen FRET-Effizienzen und daher unterschiedlichen Konformationen unterschieden werden (Klostermeier und Millar, 2002).

Eine alternative Möglichkeit bieten Einzelmolekülexperimente. Dabei wird jeweils nur ein einzelnes Molekül beobachtet, so dass unterschiedliche Zustände nicht gleichzeitig, sondern nur nacheinander auftreten und so unterschieden werden können. Die Beobachtung der zeitlichen Entwicklung und konformationellen Dynamik so ist ohne Synchronisation möglich.

Für Einzelmoleküluntersuchungen gibt es verschiedene Methoden. In Weitfeld-Experimenten werden viele Moleküle gleichzeitig angeregt und mit einer CCD-Kamera detektiert. Das ermöglicht die gleichzeitige Beobachtung vieler Moleküle und die Verfolgung von Bewegungen. Konfokale Mikroskopie und optische Nahfeldmikroskopie erlauben die Betrachtung eines kleinen Volumens mit besserer Zeitauflösung und Sensitivität; zur Detektion werden in diesem Fall *Avalanche* Photodioden (APDs) eingesetzt (Ha, 2001). Das Prinzip der in dieser Arbeit eingesetzten konfokalen Mikroskopie ist in Abbildung 1.3 gezeigt. Nur in einem sehr kleinen Volumen (einige Femtoliter) wird Fluoreszenz angeregt und detektiert. Zusätzlich werden sehr kleine Farbstoffkonzentrationen gewählt, typischerweise zwischen 10 pM und 100 pM. Dadurch befindet sich im zeitlichen Mittel weniger als ein Molekül im Detektionsvolumen. Das Fluoreszenzlicht wird mit dem gleichen Objektiv gesammelt, mit dem

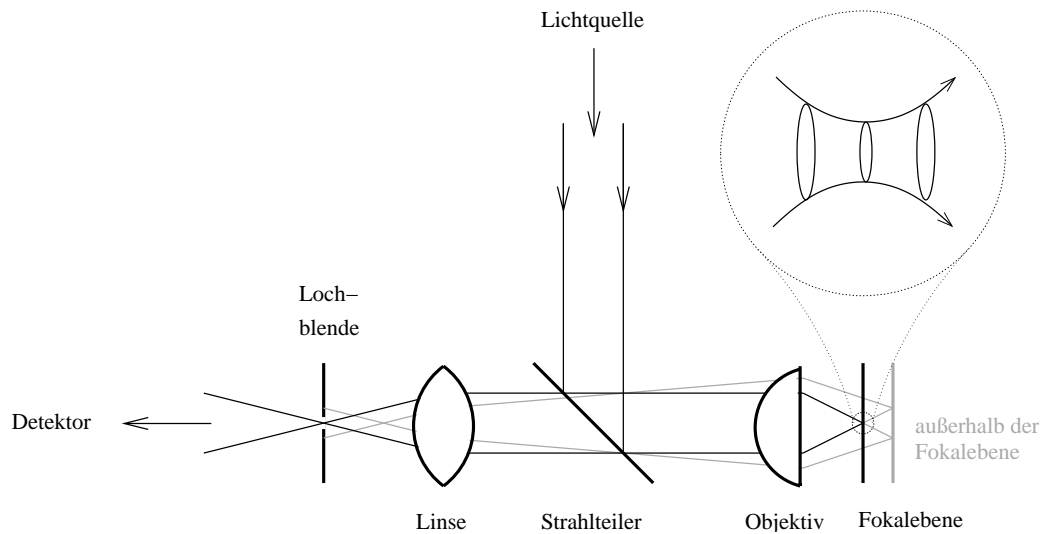


Abbildung 1.3: Prinzip der konfokalen Mikroskopie. Paralleles Laserlicht wird von einem Objektiv in einer Ebene fokussiert. In dieser Ebene ist der Strahldurchmesser sehr gering. Licht, das von dieser Ebene emittiert wird, wird vom Objektiv gesammelt und durch einen dichroitischen Strahlteiler auf eine Linse gelenkt, die den Strahl bündelt. Direkt im Fokus dieser Linse steht eine Lochblende. Licht, das nicht aus der fokalen Ebene emittiert wird, wird von der Linse vor oder hinter die Lochblende fokussiert. Dadurch wird der größte Teil des Lichts von der Lochblende abgefangen. Nur Licht aus der fokalen Ebene kann die Blende komplett passieren und wird detektiert. Das dadurch insgesamt beobachtete Volumen beträgt typischerweise einige Femtoliter.

das Anregungslicht fokussiert wird. Hinter einer Lochblende wird der Strahl durch einen dichroitischen Strahlteiler in zwei Kanäle für Donor und Akzeptor aufgeteilt und getrennt detektiert.

Seit den ersten Einzelmolekül-FRET-Experimenten an immobilisierten Biomolekülen von Ha *et al.* (1996) oder an frei diffundierender DNA von Deniz *et al.* (1999) wurde eine Vielzahl von Experimenten an verschiedenen Systemen durchgeführt. So konnten z.B. neue Informationen über die Faltung des Kälteschockproteins erhalten werden (Schuler *et al.*, 2002). Die Faltung und Katalyse von Ribozymen konnte beobachtet werden (Zhuang *et al.*, 2000). Auch Konformationsänderungen im katalytischen Zyklus von Enzymen konnten z.B. in der Dihydrofolat-Reduktase verfolgt werden (Antikainen *et al.*, 2005). Die kombinierte Messung mehrerer Parameter wie FRET, Lebenszeit und Anisotropie ermöglicht eine genauere Analyse und Interpretation der Ergebnisse (Margittai *et al.*, 2003).

1.2.3 Farbstoffe für Einzelmolekül-FRET-Experimente

Für FRET-Experimente müssen die zu untersuchenden Proteine mit geeigneten Fluorophoren markiert werden. Diese Farbstoffe müssen einen großen Extinktionskoeffizienten sowie eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute besitzen, um eine möglichst hohe Fluoreszenzen-

sitivität zu erreichen. Diese Eigenschaften sollten nach Möglichkeit gegenüber geringen Änderungen in der Umgebung unempfindlich sein. Ebenfalls wichtig ist eine hohe Photostabilität, um lange Beobachtungszeiten zu ermöglichen. Das Fluoreszenzspektrum des Donors muss mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen. Gleichzeitig soll aber der Akzeptor bei der Wellenlänge, die zur Anregung des Donors verwendet wird, nicht mehr anregbar sein. Daher ist eine große Stokes-Verschiebung, also eine deutliche Trennung von Absorption und Fluoreszenz, im Donor von Vorteil. Die Trennung von Donor- und Akzeptorfluoreszenz in der Messung ist erleichtert, wenn die beiden Fluoreszenzspektren spektral deutlich getrennt sind, wenn also auch der Akzeptor eine große Stokes-Verschiebung zeigt (Kapanidis und Weiss, 2002).

Eine weitere wichtige Voraussetzung ist die Möglichkeit, den Fluorophor überhaupt in das zu untersuchende Molekül einzubringen. Für die Markierung von Proteinen gibt es mehrere Möglichkeiten. Die intrinsische Fluoreszenz von Tryptophan wird in Ensemble-Experimenten als Donor verwendet, ist jedoch aufgrund der geringen Sensitivität nicht für Einzelmolekülexperimente geeignet. Fluoreszierende Proteine wie GFP (*green fluorescent protein*) können als Fusionsprotein mit dem zu untersuchenden Protein erzeugt werden. Das macht sie besonders für *in vivo* Untersuchungen interessant, da sie dann *in situ*, in der Zelle produziert werden. Andererseits sind die fluoreszierenden Proteine relativ groß, so dass ihre Einführung in andere Proteine zu Änderungen in der Struktur und Funktion dieser Proteine führen kann. Zudem werden Abstandsbestimmungen durch die Ausdehnung und Beweglichkeit der fluoreszierenden Proteine schwierig (Kapanidis und Weiss, 2002).

Eine dritte Möglichkeit ist die Einführung von kleinen, extrinsischen Farbstoffen. Dies geschieht üblicherweise durch die chemische Reaktion mit einer geeigneten Gruppe im Protein, z.B. mit Aminogruppen. Allerdings besitzen die meisten Proteine eine Vielzahl an Aminogruppen, so dass eine spezifische Markierung nicht möglich ist. Eine andere Möglichkeit ist die Reaktion zwischen Cysteinen und thiol-reaktiven Gruppen wie z.B. Maleimid oder Iodacetamid, an die die gewünschten Fluorophore gekoppelt sind. Die Zahl der Cysteine ist in den meisten Proteinen gering. Werden die natürlichen Cysteine entfernt, so kann durch ortsgerechte Mutagenese die reaktive Gruppe an der gewünschten Stelle im Protein eingebracht und markiert werden. Die gezielte Einführung fluoreszierender Gruppen in einer *in vitro*-Translationsreaktion ist ebenfalls möglich. Allerdings können damit im Allgemeinen nur sehr geringe Mengen Protein hergestellt werden.

Für FRET-Experimente werden zwei verschiedene Farbstoffe benötigt. Die einfachste Möglichkeit ist die Einführung von zwei Cysteinen an der Oberfläche des zu untersuchenden Proteins durch ortsgerechte Mutagenese. Eine Markierung mit zwei Farbstoffen er-

zeugt dabei eine Mischung von Proteinen, die nicht nur die gewünschten Donor-Akzeptor-markierten Moleküle enthält, sondern auch solche, die nur Donor, nur Akzeptor oder Akzeptor und Donor in der umgekehrten Orientierung tragen. Die zweimal mit dem gleichen Farbstoff markierten Proteine lassen sich in Einzelmolekülexperimenten von den mit zwei verschiedenen Farbstoffen markierten Proteinen unterscheiden. Proteine mit den beiden Farbstoffen in beiden Orientierungen haben jedoch unter Umständen unterschiedliche spektrale Eigenschaften, können aber im Experiment nicht unterschieden werden. Eine Möglichkeit ist es in diesem Fall, die Richtung der Markierung durch Cysteine mit unterschiedlicher Reaktivität und einer entsprechenden Variation der Reaktionsbedingungen zu beeinflussen (Ratner *et al.*, 2002).

Eine Alternative bietet die chemische Ligation von Proteinfragmenten. Ein Peptid oder Protein mit einem C-terminalen Thioester reagiert mit einem zweiten Fragment mit einem N-terminalen Cystein und bildet dabei eine Peptidbindung. Eines oder beide Fragmente können vor der Reaktion mit Farbstoff markiert werden, um so die Orientierung der Fluorophore im Protein festzulegen. Die getrennte Expression der N-terminalen Helikase-Domäne und der beiden C-terminalen Domänen von YxiN und die anschließende Ligation zu einem aktiven Enzym konnte erfolgreich durchgeführt werden (Karow *et al.*, 2006). Ein Problem dieser Methode ist das für die Ligation notwendige Cystein, das ebenfalls mit den Farbstoffen reagieren kann. Versuche, die chemische Ligation *in vitro* mit Threonin oder Serin durchzuführen, wie es *in vivo* möglich ist, waren bisher nicht erfolgreich.

1.3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Konformationsänderungen im katalytischen Zyklus der RNA-Helikase YxiN mittels Einzelmolekül-FRET-Experimenten.

YxiN ist ein DEAD-Box Protein, das substratspezifisch und ATP-abhängig kurze RNA-Doppelhelices entwindet. Grundlegende Eigenschaften von YxiN wie ATP- und RNA-Bindung sowie die Aktivität sollten untersucht werden. Zur Untersuchung der Aktivität von RNA-Helikasen gibt es zwei Möglichkeiten. Die Geschwindigkeit der ATP-Hydrolyse in Abhängigkeit von RNA kann gemessen werden. Dafür existieren verschiedene etablierte Methoden; in dieser Arbeit wurde ein gekoppelter spektroskopischer Test nach Bessman (1963) verwendet. Die direkte Beobachtung der Entwindung von RNA-Doppelhelices erfolgt im Allgemeinen mit Hilfe radioaktiv markierter RNA, die in Acrylamidgelen in Einzelstrang und Doppelstrang getrennt wird. Für YxiN sollte ein alternativer, auf Fluoreszenz basierender Test entwickelt werden.

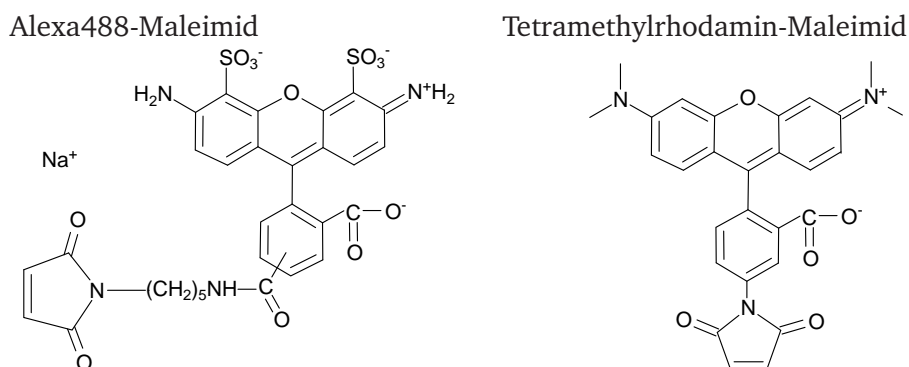


Abbildung 1.4: Die Fluorophore Alexa Fluor 488 (Alexa488) und Tetramethylrhodamin (TMR). Beide Farbstoffe sind mit dem thiol-reaktiven Maleimid verknüpft. Das Absorptionsmaximum von Alexa488 liegt bei 493 nm. Die Fluoreszenz mit einem Maximum bei 516 nm überlappt mit dem Absorptionsspektrum von TMR, das ein Maximum bei 541 nm hat. Das Fluoreszenzmaximum von TMR liegt bei 567 nm.

Für FRET-Experimente müssen zwei Farbstoffe in ein YxiN-Molekül eingeführt werden. Um geeignete Positionen zu finden, sollten anhand eines Homologiemodells ausgewählte Positionen auf ihre Eignung zur Markierung untersucht werden. Dabei musste sichergestellt werden, dass durch die Mutationen die Struktur und Aktivität von YxiN nicht beeinflusst wurde. Die beiden Farbstoffe Alexa Fluor 488 (Alexa488) und Tetramethylrhodamin (TMR) (vgl. Abbildung 1.4) sollten dann an zwei verschiedenen Stellen im Protein eingeführt werden.

Die verschiedenen Modelle zum Mechanismus der RNA-Entwindung durch RNA-Helikasen sagen Konformationsänderungen im katalytischen Zyklus der RNA-Helikasen voraus. Diese Konformationsänderungen, die vermutlich vor allem aus der Reorientierung der Domänen bestehen, können deutliche Abstandsänderungen innerhalb des Proteins verursachen. Einzelmolekül-FRET-Experimente eignen sich gut, um solche Abstandsänderungen in Proteinen zu untersuchen. Verschiedene Bedingungen der Messung wie YxiN-Konzentration und Anregungsleistung mussten zunächst optimiert werden. Experimente mit fluoreszenzmarkiertem YxiN in Abhängigkeit von RNA und Nukleotiden sollten durchgeführt werden, um Konformationsänderungen zu beobachten und dadurch ein besseres Verständnis des katalytischen Zyklus von RNA-Helikasen zu erhalten.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Ambion (Austin, US) T7 *Mega Shortscript* Kit für die *in-vitro*-Transkription

AppliChem (Darmstadt) L-Glutathion (reduziert)

Brand (Wertheim) Plastikkuvetten

Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) DNA-Standard GeneRulerTM 100 bp Leiter, RNA-Standard *low range*

GE Healthcare, früher Amersham Bioscience (Freiburg) NAP-5 und NAP-10 Gelfiltrationssäulen, NTP-Set (100 mM)

ICN Biomedicals Heparin Natriumsalz

Invitrogen (Carlsbad, US) Alexa Fluor 488 C₅ Maleimid, Tetramethylrhodamin-5-maleimid, Tris-(2-carboxyethyl)phosphin Hydrochlorid (TCEP)

Jena Biosciences (Jena) mant-ADP (2'/3'-O-(N-Methyl-anthraniloyl)-adenosin-5'-diphosphat)

Merck KGaA (Darmstadt) Aktivkohle (granuliert), Ammoniumacetat (reinst), L(+)-Ascorbinsäure, Dimethylsulfoxid, Essigsäure, Ethanol, Kaliumchlorid, Kaliumacetat (reinst), Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, Natriumhydroxid-Plätzchen, Isopropanol

Millipore (Molsheim, F) Mikrodialysemembranen 0,025 μm

Pharma Waldhof (Düsseldorf) Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP)

Qiagen GmbH (Hilden) QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAprep Spin Midiprep Kit, QIAquick Gelextraktionskit

- Roche (Basel, CH)** Complete EDTA-free Protease Inhibitoren Mix, Nicotinamidadenin-
nukleotid reduziert (NADH), Phosphoenolpyruvat (PEP)
- Sigma-Aldrich (Steinheim)** Polyethylenglykol 8000
- Spectrum Laboratories Inc (Broadwick St., US)** Spectra/Por Dialyseschlauch, MWCO 12-
14 kDa
- Vivascience AG (Hamburg)** Zentrifugalkonzentratoren Vivaspin (MWCO 10000); 500 μ l,
2 ml, 6 ml
- VWR (Darmstadt)** Glycerin 87 %

Alle weiteren Chemikalien wurden von Roth (Karlsruhe, D) bezogen und hatten, soweit nicht anders angegeben, den Reinheitsgrad p.A. Gereinigtes Wasser für Puffer und Lösungen wurde mit einer MilliQ Gradient Anlage (Millipore, Molsheim, F) hergestellt. Alle Puffer wurden durch 0,22 μ m Nylonmembranen (Millipore, Molsheim, F) filtriert.

2.1.2 Enzyme und Proteine

- Ambion (Austin, US)** T7-RNA-Polymerase
- Gerbu Biotechnik GmbH (Gaiberg)** Chymotrypsin und Trypsin aus Rinderpankreas
- Invitrogen (Carlsbad, US)** TEV-Protease
- New England BioLabs (Frankfurt a.M.)** *DpnI*, *NcoI*, *XhoI*
- peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)** *Taq*-Polymerase
- Promega (Madison, US)** *Pfu*-Polymerase
- Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)** Lactatdehydrogenase und Pyruvatkinase aus Ka-
ninchenmuskel
- Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg)** Katalase und Glukose-Oxidase aus *Aspergillus*
niger, Thermolysin

2.1.3 Bakterienstämme und Plasmide

- | | |
|---------------------------------------|--|
| <i>Escherichia coli</i> XL 1-Blue | <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r_K⁻m_K⁺) supE44 relA1</i> <i>λ⁻ lac [F'proAB lacI^q lacZΔM15 Tn 10 (Tet^R)]</i> (Stratagene, Heidelberg) |
| <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) RP | <i>E.coli B F⁻ dcm ompT hsdS(r_B⁻m_B⁻) Tet^r gal λ(DE3) endA</i> <i>Hte [argU proL Cm^r]</i> (Stratagene, Heidelberg) |
| <i>Escherichia coli</i> Rosetta | <i>E.coli F⁻ dcm ompT hsdS(r_B⁻m_B⁻) Tet^r gal pRARE (argU,</i> <i>argW, ileX, glyT, leuW, proL, Cm^r)</i> (Novagen, Darmstadt) |

Das Plasmid *yxiN_wt_pETM30* wurde als Grundlage für die Mutagenese und Expression von YxiN verwendet. Das Gen von YxiN wurde über die Schnittstellen für *NcoI* und *XhoI* in den Vektor pETM30 (G.Stier, EMBL) kloniert. Dieser trägt eine Resistenz gegen Kanamycin sowie das Gen für den Lac-Repressor. Die Klonierungsstelle steht unter der Kontrolle des T7-Promotors und enthält eine Sequenz für die Glutathion-S-Transferase, die N-terminal durch sechs Histidine verlängert ist. Dies ermöglicht die Reinigung des entstehenden Fusionsproteins über Affinitätschromatographie an Nickel- oder an Glutathion-Sepharose. Unmittelbar N-terminal von YxiN liegt eine Schnittstelle für die TEV-Protease. Das dadurch entstehende Protein beginnt mit der Sequenz Gly-Ala-Met-Gly, während das wildtypische Protein mit Met-Ser beginnt. Das Plasmid lag zu Beginn dieser Arbeit bereits vor.

Für die *in-vitro*-Transkription wurde das Plasmid pUC18/B.s._23S_RNA_154 verwendet. Die Sequenz der Nukleotide 2481 bis 2634 der 23S rRNA aus *B. subtilis* wurde über die Schnittstellen für *BamH I* und *Hind III* in pUC18 (Fermentas, St. Leon-Rot) hinter den Promotor für die T7-RNA-Polymerase kloniert.

2.1.4 Oligonukleotide

DNA

Die benötigten DNA-Oligonukleotide wurden von MWG (Ebersberg) und Purimex (Staufenberg) bezogen. Die Kontrolle der Sequenz des YxiN-Gens erfolgte mit drei Primern, die ausreichen, um die gesamte Sequenz überlappend abzudecken.

| | |
|-------------|---------------------------------------|
| pGEXf | 5'-GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG-3' |
| YxiN middle | 5'-CGT CTC TCT TTG GTC ATT G-3' |
| M70r | 5'-TCA GCG GTG GCA GCA GCC AAC TCA-3' |

Für die Einführung von Mutationen wurden jeweils komplementäre Primerpaare benötigt. Die Sequenzen der Primer sind in der folgenden Tabelle aufgelistet. In den Namen sind jeweils die mit diesen Primern eingeführten Mutationen angegeben; 5 steht für den kodierenden und 3 für den komplementären Strang. Das mutierte Basentriplett ist hervorgehoben.

| Name | Sequenz |
|--------------|--|
| YxiN C61S 5 | 5'-CGG GAT TCC TCT <i>CTC</i> TGA GCT GGC GAA TTG GG-3' |
| YxiN C61S 3 | 5'-CCC AAT TCG CCA GCT <i>CAG</i> AGA GAG GAA TCC CG-3' |
| YxiN C267S 5 | 5'-GGG ATA TCC <i>ATC</i> CGA TAA AAT TCA CGG CGG-3' |
| YxiN C267S 3 | 5'-CCG CCG TGA ATT TTA TCG <i>GAT</i> GGA TAT CCC-3' |
| YxiN Q47C 5 | 5'-CTT GTC GTC AAA TCA <i>TGC</i> ACA GGA AGC GGG-3' |
| YxiN Q47C 3 | 5'-CCC GCT TCC TGT <i>GCA</i> TGA TTT GAC GAC AAG-3' |
| YxiN K70C 5 | 5'-GGG ATG AAA <i>ACT</i> GTC CGC AGG CGC TTA TTT TAA CAC C-3' |

| | |
|--------------------|---|
| YxiN K70C 3 | 5'-GGT GTT AAA ATA AGC GCC TGC GGA CAG TTT TCA TCC C-3' |
| YxiN S108C 5 | 5'-CAG CCG TAT TTG GAA AAT GCT CCT TTG ATA AAC AAA-3' |
| YxiN S108C 3 | 5'-TTT GTT TAT CAA AGG AGC ATT TTC CAA ATA CGG CTG-3' |
| YxiN A115C 5 | 5'-CCT TTG ATA AAC AAA AAT GTG AGC TTA AGC AAA AAA GCC-3' |
| YxiN A115C 3 | 5'-GGC TTT TTT GCT TAA GCT CAC ATT TTT GTT TAT CAA AGG-3' |
| YxiN N158C 5 | 5'-GGA TGA GAT GCT GTG TAT GGG CTT CAT TGA GC-3' |
| YxiN N158C 3 | 5'-GCT CAA TGA AGC CCA TAC ACA GCA TCT CAT CC-3' |
| YxiN Q187C 5 | 5'-GCG ACG CTT CCG TGC GAT ATC GAG AAG C-3' |
| YxiN Q187C 3 | 5'-GCT TCT CGA TAT CGC ACG GAA GCG TCG C-3' |
| YxiN E224C 5 | 5'-GTG ATT CAA GTA AGA TGC GAG AAT AAG TTT TC-3' |
| YxiN E224C 3 | 5'-GAA AAC TTA TTC TCG CAT CTT ACT TGA ATC AC-3' |
| YxiN S229C 5 | 5'-GAA GAG AAT AAG TTT TGC TTG CTG AAA GAT GTG-3' |
| YxiN S229C 3 | 5'-CAC ATC TTT CAG CAA GCA AAA CTT ATT CTC TTC-3' |
| YxiN T237C 5 | 5'-GAT GTG CTG ATG TGC GAG AAT CCC GAC-3' |
| YxiN T237C 3 | 5'-GTC GGG ATT CTC GCA CAT CAG CAC ATC-3' |
| YxiN E238C 5 | 5'-GAT GTG CTG ATG ACG TGC AAT CCC GAC AGC TGC-3' |
| YxiN E238C 3 | 5'-GCA GCT GTC GGG ATT GCA CGT CAT CAG CAC ATC-3' |
| YxiN N239C 5 | 5'-GAT GAC GGA GTG TCC CGA CAG CAG CTG C-3' |
| YxiN N239C 3 | 5'-GCA GCT GTC GGG ACA CTC CGT CAT C-3' |
| YxiN D262C 5 | 5'-CGA TGA ATT GGA TTG CTT GGG ATA TCC-3' |
| YxiN D262C 3 | 5'-GGA TAT CCC AAG CAA TCC AAT TCA TCG-3' |
| YxiN I275C 5 | 5'-CAC GGC GGA ATG TGT CAG GAA GAC CG-3' |
| YxiN I275C 3 | 5'-CGG TCT TCC TGA CAC ATT CCG CCG TG-3' |
| YxiN R288C 5 | 5'-CAT GAA TGA ATT TAA ATG TGG CGA GTA CCG-3' |
| YxiN R288C 3 | 5'-CGG TAC TCG CCA CAT TTA AAT TCA TTC ATG-3' |
| YxiN K337C 5 | 5'-GGG ACG CGC AGG GAA CTG TGG AAA GGC CAT TTC G-3' |
| YxiN K337C 3 | 5'-CGA AAT GGC CTT TCC ACA GTT CCC TGC GCG TCC C-3' |
| YxiN S182A T184A 5 | 5'-CGA TGC TGT TTG CCG CGG CGC TTC CGC AGG-3' |
| YxiN S182A T184A 3 | 5'-CCT GCG GAA GCG CCG CGG CAA ACA GCA TCG-3' |

Für die Erzeugung des Templates der *in-vitro*-Transkription wurden zwei Primer gewählt, die die Bindungsstelle der T7-RNA-Polymerase und die kodierende Sequenz des Templates einschließen.

ivtr_154_5 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GC-3'
ivtr_154_3 5'-GAA CTG TCT CAC GAC GTT C-3'

RNA

Kurze RNA-Oligonukleotide wurden entweder von Dharmacon (Lafayette, USA) oder von Purimex (Staufenberg) bezogen. Oligonukleotide von Dharmacon wurden im Labor in einem denaturierenden Polyacrylamidgel gereinigt, Oligonukleotide von Purimex wurden be-

reits HPLC-gereinigt gekauft. Die Fluoreszenzmarkierung der Oligonukleotide S1-Fl, S1-TMR und S1-up-Fl erfolgte in unserem Labor. Alle anderen fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide wurden markiert gekauft. S1-up bezeichnet den 32 Basen langen Strang, der bis auf die ersten beiden Basen den Nukleotiden 2532 bis 2563 der 23S rRNA in *E. coli* entspricht. Tth-S1-up bezeichnet die entsprechende Sequenz in *B. subtilis* (entspricht den Nukleotiden 2560 bis 2591). S1 ist ein 9 Basen langer Strang, der mit dem 5'-Ende beider 32-Basen Fragmente einen Doppelstrang ausbilden kann.

| | |
|------------------|--|
| S1 | 5'-UUG GGA CCU-3' |
| S1-2-AP | 5'-UUG GG 2-AP CCU-3' |
| S1-Fl | 5'-UUG GGA CCU-3' - Fluoreszein |
| S1-TAMRA | 5'-UUG GGA CCU-3' - TMR |
| S1-Dansyl | 5'-UUG GGA CCU-3' - Dansyl-X |
| S1-up | 5'-CGA GGU CCC AAG GGU AUG GCU GUU CGC CAU UU-3' |
| S1-up-Fl | Fluoreszein-5'-CGA GGU CCC AAG GGU AUG GCU GUU CGC CAU UU-3' |
| Tth-S1-up | 5'-CGA GGU CCC AAG GGU UGG GCU GUU CGC CCA UU-3' |
| Dansyl-Tth-S1-up | Dansyl-X-5'-CGA GGU CCC AAG GGU UGG GCU GUU CGC CCA UU-3' |

2.1.5 Geräte

A&D Instruments Ltd (Abingdon, UK) Waage AND EK-i

Beckman-Coulter (Krefeld) AllergaTM 21R Tischzentrifuge, Allegra F0630 und S4180 Rotoren

Biorad Laboratories GmbH (München) Geldokumentationssystem Gel Doc 2000

Branson Sonic Power Co. (Danbury, US) Ultraschallstab Sonifier Cell Disruptor B15

DuPont (Bad Homburg) Sorvall RC 5B Plus Zentrifuge, Sorvall GS-3 und SS-34 Rotoren

Eppendorf (Hamburg) BioPhotometer, Concentrator 5301, Mastercycler gradient, ThermoStat plus Heizblock

Eastman Kodak Company (New York, US) EDAS 290 Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System mit Software Kodak 1D Image Analysis Software, V 3.5

EquiBio Ltd (Ashford, UK) Elektroporator Easyject Prima

GE Healthcare, früher Amersham Bioscience (Freiburg) Aekta Prime FPLC System mit Software Unicorn, Glutathion-Affinitätssäule GSTPrep FF 16/10, Größenausschlusschromatographiesäule HiLoadTM 16/60 SuperdexTM 200 *prep grade*, hydrophobe Säule 1 ml Phenyl-HP, Säulenmaterial Chelating Sepharose *Fast Flow* für Nickel-NTA Affinitätschromatographie, Kationenaustauschsäule Resource S, Amersham Ultrospec 2100 *pro* mit Software Swift II Version 2.04, Hoefer Mighty Small II Se250 Mini Gel

Elektrophorese Apparatur, Peristaltische Pumpe P1, Spannungsquellen für Elektrophorese EPS 1001 und EPS 301

Hanna Instruments pH-Messgerät HI 8314

Hellma (Mühlheim) Hellma Präzisionsküvetten aus Quarzglas

Herolab GmbH (Wiesloch) UV Transilluminator FT-20/254/365

IKA - Werke GmbH & Co.KG (Staufen) IKAMAG RCT *basic* Magnetrührer

Kendro Laboratory Products GmbH (Langenselbold) Tischzentrifuge Biofuge *pico*

Hitachi (Tokio, Japan) Fluoreszenzspektrophotometer F-4500, F-4010

Perkin-Elmer GmbH (Überlingen) Lambda 9 UV/VIS/NIR Spektrophotometer, Luminescence Spektrometer LS 50 B

Peter Huber GmbH (Offenburg) Wasserbäder Polystat control

Jasco (Groß-Umstadt) FP-6500 Spektrofluorometer; J600A Spektropolarimeter, Peltier-element PTC-348WI

Systemec (Wettenberg) Systemec Autoklav 2540 EL

Varian GmbH (Darmstadt) Fluoreszenzspektrometer Cary Eclipse

2.1.6 Datenauswertung

Zur Auswertung der Daten und Erstellung der Graphen wurden die Programme Gnuplot (Williams und Kelley, 1993) und Scientist 2.01 (MicroMath, Saint Louis, USA) verwendet. Die Homologiemodelle wurden mit 3D-JIGSAW (Bates *et al.*, 2001) berechnet, die Abbildungen wurden mit Molscrip (Kraulis, 1991) erstellt und mit Raster3D (Merritt und Bacon, 1997) gerendert. Quantifizierung von Fluoreszenz auf Gelbildern erfolgte mit der Software QuantityOne (BioRad, München).

2.2 Elektrophorese

2.2.1 Agarosegelelektrophorese

1 × TBE Puffer 89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,3

Probenpuffer 10 mM EDTA, pH 8,0, 50 % (v/v) Glycerin, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau, 0,02 % (w/v) Xylencyanol

Zur analytischen Identifizierung und präparativen Trennung von DNA wurden horizontale Agarosegele in 0,5 × TBE Puffer verwendet. Kurze Fragmente (bis zu 1000 Basenpaaren)

wurden in Gelen mit 2,0 % (w/v) Agarose analysiert, Plasmide in 0,8 % Gelen. Die Proben wurden mit einem Fünftel ihres Volumens an Probenpuffer versetzt; es wurden jeweils mindestens 6 μl aufgetragen. Als Längenstandard wurden 8 μl einer passenden Basenpaarleiter (100 bp-Leiter von Fermentas oder 1 kbp-Leiter von Roth) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in $0,5\times$ TBE Puffer für 30 Minuten bei einer Feldstärke von 7,5 V/cm. Anschließend wurde das Gel 30 Minuten in einer 0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromidlösung gefärbt, kurz in Wasser entfärbt und unter UV-Licht betrachtet und dokumentiert.

2.2.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Sammelgel 4,5 % Acrylamid, 0,1 % Bisacrylamid, 125 mM Tris/HCl, pH 6,8, 0,06 % Natriumdodecylsulfat (SDS), 0,1 % TEMED, 0,1 % Ammoniumperoxodisulfat

Trenngel 15 % Acrylamid, 0,4 % Bisacrylamid, 375 mM Tris/HCl, pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,06 % TEMED, 0,086 % Ammoniumperoxodisulfat

Laufpuffer 24 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1 % SDS

4 \times Probenpuffer 130 mM Tris/HCl, pH 6,8, 200 mM DTT, 4 % SDS, 0,01 % Bromphenolblau, 20 % Glycerin

Färbelösung 50 % Methanol, 10 % Essigsäure, 0,1 % Brilliant Blau R250

Entfärbelösung 20 % Ethanol, 10 % Essigsäure

Zur Trennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) verwendet. Im Sammelgel werden die Proteine zu einer scharfen Bande konzentriert, deren Bestandteile dann anschließend im Trenngel nach Größe getrennt werden. 10 bis 20 μl Proben wurden mit einem Drittel ihres Volumens an 4 \times Probenpuffer versetzt, pelletierte Zellen wurden in 1 \times Probenpuffer resuspendiert. Die Proben wurden 5 bis 10 Minuten bei 95°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Der verwendete Standard (Roti-Mark Standard von Roth) enthält Proteine der Größen 200, 119, 66, 43, 29, 20 und 14,5 kDa. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA pro Gel und dauerte zwischen 30 und 45 Minuten, bis der Farbmarker den unteren Gelrand erreicht hatte.

Zum Färben wurden die Gele etwa 30 Minuten in Färbelösung geschwenkt, anschließend kurz in Entfärbelösung und über Nacht in Wasser entfärbt. Gefärbte Gele wurden unter Weißlicht betrachtet und dokumentiert. Für die Untersuchung fluoreszenzmarkierter Proteine wurde das Gel zunächst bei Anregung mit UV-Licht betrachtet und dokumentiert und erst anschließend gefärbt.

2.2.3 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese

1× TBE Puffer 89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,3

Probenpuffer 1× TBE, 8 M Harnstoff, 10 % Saccharose, 1 mg/ml Bromphenolblau

Die Reinigung der RNA von Nebenprodukten der *in-vitro*-Transkription erfolgte in denaturierenden Acrylamidgelen. Hierzu wurden Gele mit 15 % Acrylamid, 8 M Harnstoff, 1× TBE, 0,1 % TEMED und 0,04 % APS gegossen und möglichst frisch verwendet, da der Harnstoff bei längerer Lagerung bei 4°C kristallisiert. Als Laufpuffer wurde 1× TBE eingesetzt. Die RNA-Proben wurden mit dem gleichen Volumen Probenpuffer versetzt und 10 Minuten bei 60°C denaturiert. Als Standard wurde entweder eine RNA-Leiter oder tRNA aus *Saccharomyces cerevisiae* (freundlicherweise von Dr. Vörtler zur Verfügung gestellt) aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei einer konstanten Feldstärke von 20 V/cm in einer Stunde. Die RNA wurde 30 Minuten in einer 0,05 µg/ml Ethidiumbromidlösung gefärbt, kurz in Wasser entfärbt und unter UV-Licht betrachtet.

2.2.4 Native RNA-Gelelektrophorese

RNA-Gelpuffer 100 mM Tris, 100 mM Borat, 1 mM EDTA, pH 8,3

Zur Trennung von einzel- und doppelsträngiger RNA wurde native Acrylamidgelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurden Gele mit 15 % Acrylamid, RNA-Gelpuffer, 10 mM MgCl₂, 0,07% TEMED und 0,1% APS gegossen und möglichst frisch verwendet. Als Laufpuffer wurde RNA-Gelpuffer verwendet. Der Lauf erfolgte gekühlt bei 15°C oder 6°C bei 150 V und dauerte mindestens 90 Minuten, bis der Farbmarker das untere Viertel des Gels erreicht hatte.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Kulturmedium

Für Bakterienkulturen wurde stets LB-Medium (10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl (Sambrook *et al.*, 1989)) verwendet. Für Platten wurde zusätzlich 19 g/l Agar zugegeben. Nach dem Autoklavieren wurden die sterilfiltrierten Antibiotika zu dem abgekühlten Medium gegeben. Selektivmedium für *E. coli* XL-1 Blue enthielt 20 µg/ml Kanamycin, Selektivmedium für *E. coli* BL21 (DE3) RP und Rosetta enthielt 5 µg/ml Chloramphenicol und 20 µg/ml Kanamycin.

2.3.2 Einführung von Mutationen

In dem Ausgangsplasmid yxin_wt_pETM30 lag die in dieser Arbeit als wildtypisch bezeichnete YxiN-Sequenz vor. Wie bereits beschrieben (vgl. 2.1.3), beginnt das davon produzierte Protein mit der Sequenz Gly-Ala-Met-Gly statt mit Met-Ser.

In dem verwendeten Gen ist an Position 1091 Cytosin durch Adenosin ausgetauscht, dadurch erhält man die Mutation Pro364Glu. Diese Abweichung von der ursprünglich publizierten Sequenz (Yoshida *et al.*, 1996) wurde bereits von Kossen und Uhlenbeck (1999) beobachtet.

Die ortsgerichteten Mutagenese erfolgte mittels *QuikChangeTM*-PCR (Stratagene). Dabei wird ein zirkuläres Plasmid mit Primern amplifiziert, die komplementär zueinander sind und die gewünschte Mutation etwa in ihrer Mitte beinhalten. Die Länge wurde so gewählt, dass die Schmelztemperatur über 78°C lag, und variierte zwischen 26 und 39 Basen. Für die Mutagenesereaktion wurden in einem Volumen von 50 μ l *Pfu*-Puffer (10 mM KCl, 10 mM Ammoniumsulfat, 20 mM Tris/HCl, pH 8,8 bei 25°C, 2 mM Magnesiumsulfat, 0,1 % Triton-X100, 0,1 mg/ml BSA) 50 ng des Plasmids mit je 0,2 μ M der Mutageneseprimer, 400 μ M dNTPs und 1 μ l *Pfu*-Polymerase (entspricht 3 U) versetzt. Dieser Ansatz wurde für 30 s auf 95°C erhitzt. Anschließend wurden 25 Zyklen durchlaufen, in denen jeweils für 30 s die Doppelstränge bei 95°C getrennt wurden, eine Minute lang die Anlagerung der Primer bei 50-60°C stattfand und anschließend für 15 min bei 68°C die DNA synthetisiert wurde. Abschließend wurde auf 4°C abgekühlt. Die Temperatur für die Anlagerung der Primer wurde in Abhängigkeit von der berechneten Schmelztemperatur gewählt und wenn nötig durch Variation der Temperatur optimiert. Der Erfolg der Reaktion wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Man erhält eine lineare Vermehrung zirkulärer DNA mit zwei versetzten Einzelstrangbrüchen.

Der Reaktionsansatz wurde anschließend mit 1 μ l *DpnI* (entspricht 10 U) versetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. *DpnI* spaltet methyliertes und hemimethyliertes Plasmid, wie es aus *E. coli* XL1-Blue präpariert und für die Mutagenese eingesetzt wurde, aber kein unmethyliertes PCR-Produkt. 10 μ l des Ansatzes wurden durch Dialyse gegen Wasser auf Millipore Dialysemembranen entsalzt, in elektrokompente *E. coli* XL1-Blue transformiert (Sambrook *et al.*, 1989) und auf Selektivmedium ausplattiert. Die Einzelstrangbrüche werden nach der Transformation in der Zelle repariert.

2.3.3 Plasmidpräparation

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte mit entsprechenden Kits der Firma Qiagen aus *E. coli* XL1 - Blue. Im allgemeinen wurde der QIAprep Miniprep Kit verwendet; für größere Mengen wurde auch der QIAprep Midiprep Kit eingesetzt. 10 ml bzw. 100 ml Selektivmedium wurden mit der gewünschten Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden zentrifugiert (2600 g, 10 Minuten) und nach den Angaben des Kit-Herstellers verarbeitet. Die Bakterien werden durch alkalische Lyse aufgeschlossen, die DNA wird bei hohen Salzkonzentrationen selektiv an Silicagel-Membranen gebunden und bei geringen Salzkonzentrationen wieder eluiert. Miniprep-DNA wurde in 50 μ l Wasser eluiert, DNA aus Midipreps in 150 μ l Wasser.

Die Plasmidkonzentration wurde anhand der Absorption bei 260 nm bestimmt. Eine Absorptionseinheit entspricht einer Konzentration von 50 ng/ μ l. Die Qualität des Plasmids wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.3.4 Kontrolle der Mutagenesereaktion

QuikChangeTM-PCR produziert häufig multiple Insertionen der Primersequenz. Dies kann über einen Restriktionsanalyse getestet werden. Dazu werden 50 ng des Plasmids in einem Volumen von 10 μ l NEB-Puffer 2 (New England Biolabs) mit 1 mg/ml BSA, 5 U *Nco*I und 10 U *Xho*I versetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Dadurch sollte ein Fragment von etwa 1500 Basenpaaren Länge entstehen, das dann auf einem Agarosegel mit der Länge des wildtypischen Fragments verglichen wurde.

Allerdings sind die Größenunterschiede durch die Insertionen nicht sehr groß und oftmals in der Restriktionsanalyse nicht klar zu erkennen. Zudem kann dieser erst mit dem isolierten Plasmid durchgeführt werden. Deswegen wurde alternativ eine Kolonie-PCR verwendet. Dabei werden direkt Zellen eingesetzt statt gereinigter DNA, so dass die Reaktion überprüft werden kann, ohne vorher eine Plasmidpräparation durchzuführen. Hierfür wurde in 25 μ l Reaktionspuffer (20 mM Tris/HCl, pH 8,55 (bei 25°C), 16 mM Ammoniumsulfat, 0,01 % TWEEN 20, 20 mM MgCl₂) 0,625 U *Taq*-DNA-Polymerase, 0,2 mM dNTPs und 0,5 μ M geeigneter Primer vorgelegt. Dafür wurden zwei Primer so ausgewählt, dass die mutierte Sequenz in einem möglichst kurzen Fragment enthalten war. Eine geringe Menge Zellen wurde direkt von der Agarplatte zugegeben. Die Zellen wurden eine Minute lang bei 95°C aufgeschlossen. Dann wurden 25 Zyklen durchlaufen, in denen jeweils eine Minute die DNA bei 95°C aufgeschmolzen wurde, eine Minute die Primer bei 53°C angelagert wurden und eine Minute bei 72°C die DNA synthetisiert wurde. Abschließend wurde

zwei Minuten bei 72°C inkubiert und auf 4°C abgekühlt. Die Fragmente wurden auf einem 2%igen Agarosegel analysiert und mit der wildtypischen Sequenz verglichen.

Der Erfolg der Mutagenese und das Fehlen von Sekundärmutationen wurde durch vollständige Sequenzierung des Gens bei Seqlab (Göttingen) oder AGOWA (Berlin) überprüft.

2.3.5 Produktion und Fermentation von YxiN

Zur Expression wurde *E. coli* Rosetta oder BL21 (DE3) RP eingesetzt. Die Hitzetransformation der Plasmide in CaCl₂-kompetente Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Cohen *et al.* (1972). 50 ng DNA wurden nach 30minütiger Inkubation auf Eis mit einem 60 s langen Hitzepuls von 42°C in 40 µl kompetente Zellen transformiert. Die Zellen wurden mit 700 µl LB-Medium versetzt, eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend auf Selektivmedium ausplattiert.

Zum Test der Expression wurden 5 ml Übernachtskulturen angelegt und bei 37°C inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurde eine 10 ml Expressionskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Durch die Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0,2 mM wurde die Produktion von YxiN induziert. Bei der Induktion und vier Stunden danach wurde jeweils eine Probe genommen und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Kulturen, die die beste Überexpression zeigten, wurden für die Fermentation verwendet.

Zur Fermentation wurde eine 10 ml Vorkultur mit 10 µl Glycerinkultur angeimpft. Aus dieser wurde eine 100 ml Übernachtskultur beimpft. Beide Kulturen wurden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Aus der Übernachtskultur wurden 4 l Selektivmedium im Fermenter angeimpft und unter Luftzufuhr bei 30°C zur Erhöhung der Ausbeute an löslichem Protein inkubiert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde die Expression durch Zugabe von 0,2 mM IPTG induziert. Nach vier Stunden wurden die Zellen in einer Sorvall Kühlzentrifuge bei 6100 g 10 Minuten pelletiert, zum Waschen in 100 ml Aufschlußpuffer (50 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl (bzw. 100 mM), pH 8,5 (bzw. pH 7,5)) resuspendiert, erneut pelletiert und schließlich in 50 ml Aufschlußpuffer suspendiert und bis zum Zellaufschluß bei -20°C gelagert.

2.4 Proteinreinigung

2.4.1 Reinigung produzierter Proteine

Die Reinigung von YxiN wurde zunächst in 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 2 mM β-Mercaptoethanol, pH 7,5 und bei Raumtemperatur durchgeführt, dann aber zur Erhöhung der

Löslichkeit auf 500 mM NaCl, pH 8,5 und 4°C umgestellt. Die pH-Werte sämtlicher Puffer sind jeweils bei der verwendeten Temperatur eingestellt.

Zellaufschluss

Die Zellen wurden aufgetaut, mit 2 mM β -Mercaptoethanol und Proteaseinhibitor versetzt und entweder unter Verwendung des Microfluidizers oder des Ultraschallstabs (fünf Minuten bei 60 % der Maximalintensität, gepulst) aufgeschlossen. Anschließend wurden sie bei 9600 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in manchen Fällen zur Erhöhung der Ausbeute mit 20 ml Aufschlußpuffer (50 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl (bzw. 100 mM), pH 8,5 (bzw. pH 7,5), 2 mM β -Mercaptoethanol) versetzt, mindestens eine Stunde unter Schwenken bei Raumtemperatur extrahiert und wiederum zentrifugiert. Der Überstand beider Schritte wurde als Rohextrakt vereinigt.

Affinitätschromatographie an der Glutathion-Säule

YxiN Puffer 50 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl (bzw. 100 mM), 2 mM β -Mercaptoethanol, pH 8,5 (bzw. pH 7,5)

Elutionspuffer GSTprep 50 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl (bzw. 100 mM), 2 mM β -Mercaptoethanol, 20 mM reduziertes Glutathion, pH 8,5 (bzw. pH 7,5)

Die Affinitätschromatographie wurde mit einer 20 ml GSTprep FF 16/10 Säule durchgeführt. Die Auftragung des Rohextrakts in YxiN Puffer erfolgte aufgrund der langsamen Bindungskinetik der Glutathion-S-Transferase an Glutathion mit einer reduzierten Flußrate von 0,3 bis 0,5 ml/min. Anschließend wurde mit YxiN Puffer gewaschen, bis die Absorption wieder zur Basislinie zurückgekehrt war. Die Elution mit Elutionspuffer erfolgte mit einer Flußgeschwindigkeit von 1 ml/min.

Spaltung des Fusionsproteins

Das Fusionsprotein im Elutionspeak der Glutathion-Säule wurde zur Entfernung des freien Glutathions für zwei Stunden und über Nacht bei 4°C gegen 1 l YxiN Puffer dialysiert und gleichzeitig durch Zugabe von TEV-Protease gespalten. Zur Entfernung von aggregiertem Protein wurde bei 9600 g und 4°C für 30 min zentrifugiert.

Nickel-Affinitätschromatographie

Bindungspuffer Nickel 50 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl (bzw. 100 mM), 20 mM Imidazol, 2 mM β -Mercaptoethanol, pH 8,5 (bzw. pH 7,5)

Elutionspuffer Nickel 50 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl (bzw. 100 mM), 500 mM Imidazol, 2 mM β -Mercaptoethanol, pH 8,5 (bzw. pH 7,5)

Das Dialysat nach Spaltung wurde auf 20 mM Imidazol eingestellt und mit einer Flußrate von 1 ml/min auf eine 10 ml Säule mit Nickel-komplexierter *Chelating Fast Flow* Sepharose aufgetragen. YxiN Protein befand sich im Durchbruch, während nicht gespaltenes Fusionsprotein, gespaltene Glutathion-S-Transferase und TEV-Protease von der Säule zurückgehalten wurden und anschließend eluiert werden konnten.

Kationenaustauschchromatographie

Bindungspuffer Resource S 50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 2 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,5

Elutionspuffer Resource S 50 mM Tris/HCl, 1 M NaCl, 2 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,5

Der Durchfluß der Nickel-Affinitätssäule (mit einer NaCl-Konzentration von 100 mM) wurde mit einer Flußrate von maximal 1 ml/min auf eine 1 ml Resource S Kationenaustauschchromatographiesäule aufgetragen. Die Säule wurde mit Bindungspuffer gewaschen. Die Elution erfolgte in einem linearen Gradienten von 5 ml von 100 mM NaCl zu 1 M NaCl.

Fällung mit Ammoniumsulfat

Zur Verringerung des Volumens wurde der Durchbruch der Nickel-Affinitätssäule bei Raumtemperatur langsam mit Ammoniumsulfat versetzt, bis eine 80%ige Sättigung erreicht war. Die Lösung wurde zwei Stunden bei 4°C gerührt und anschließend bei 9600 g und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Das ausgefallene Protein wurde in möglichst wenig YxiN Puffer (2 bis 4 ml) wieder gelöst; nichtlösliche Reste wurden durch Zentrifugation (16100 g, 5 Minuten) abgetrennt.

Größenausschlußchromatographie

YxiN Puffer 50 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl (bzw. 100 mM), 2 mM β -Mercaptoethanol, pH 8,5 (bzw. pH 7,5)

Die Größenausschlußchromatographie mit einer HiLoadTM 16/60 SuperdexTM 200 *prep grade* Säule wurde mit einer Flußrate von 1 ml/min YxiN-Puffer betrieben. Von dem mittels Ammoniumsulfatfällung konzentrierten YxiN wurden pro Lauf maximal 2 ml aufgetragen.

Konzentrieren und Lagern von gereinigtem YxiN

Lagerpuffer 50 mM Tris/HCl, pH 8,5 (bzw. pH 7,5), 500 mM NaCl, 1 mM β -Mercaptoethanol, 50 % Glycerin

Gereinigtes YxiN wurde in 6 ml Vivaspin Konzentratoren bis zu einer Endkonzentration zwischen 100 μ M und 500 μ M konzentriert und auf die Bedingungen des Lagerpuffers eingestellt.

2.4.2 Hydrophobe Chromatographie zur Reinigung markierter Proteine

Bindungspuffer Hydrophobe Säule 50 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 2 M (bzw. 1,5 M) Ammoniumsulfat, 2 mM β -Mercaptoethanol, pH 8,5

Elutionspuffer Hydrophobe Säule 50 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 2 mM β -Mercaptoethanol, pH 8,5

Für die Trennung von unmarkiertem, einfach markiertem und doppelt markiertem Protein wurde die hydrophobe Interaktionschromatographie an einer 1 ml Phenyl-HP Säule verwendet. Die Bindung des Proteins erfolgte entweder bei 2 M oder bei 1,5 M Ammoniumsulfat. Die Elution erfolgte in einem linearen Gradienten von 10 ml zum ammoniumsulfatfreien Elutionspuffer. Da Mutanten, die Farbstoffe an unterschiedlichen Positionen trugen, bei etwas unterschiedlichen Ammoniumsulfatkonzentrationen eluierten, wurde auf die Verwendung und Optimierung eines Stufengradienten verzichtet.

2.5 *in-vitro*-Transkription des RNA-Substrats

Die Produktion längerer RNA-Substrate erfolgte über *in-vitro*-Transkription (Milligan und Uhlenbeck, 1989). Mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase erhält man aus einer doppelsträngigen DNA, die die gewünschte Sequenz unter der Kontrolle des T7-Promotors enthält, einzelsträngige RNA, die an ihrem 3'-Ende ein zusätzliche Base enthalten kann. Die Reaktion erfolgte als *run-off*-Transkription, d.h. es ist kein Terminator vorhanden und die Polymerase stoppt am Ende des DNA-Fragments.

DNA-Fragment für die *in-vitro*-Transkription

Als Ausgangsplasmid diente pUC18/B.s._23S_RNA_154. Von diesem wurde mittels PCR das benötigte Fragment amplifiziert. Hierfür wurden 100 ng Plasmid in 100 μ l *Pfu*-Puffer

(10 mM KCl, 10 mM Ammoniumsulfat, 20 mM Tris/HCl, pH 8,8 (bei 25°C), 2 mM Magnesiumsulfat, 0,1 % Triton-X100, 0,1 mg/ml BSA) mit 500 μ M dNTPs, je 0,5 μ M der Primer (ivtr_154_5 und ivtr_154_3, siehe Abschnitt 2.1.4) und 2 μ l *Pfu*-Polymerase (entspricht 6 U) versetzt. Der Ansatz wurde zunächst eine Minute bei 95°C denaturiert und dann 35 Zyklen bei 95°C für 30 Sekunden denaturiert, bei 45°C 30 Sekunden lang die Primer angelagert und 30 Sekunden bei 72°C die DNA synthetisiert. Abschließend wurde bei 72°C eine Minute verlängert und abgekühlt.

Die Reinigung des Fragments erfolgte durch präparative Agarosegelelektrophorese mit dem *QIAquick* Gelextraktionskit von Qiagen. Hierzu wurde nach der Elektrophorese aus dem gefärbten Agarosegel die Bande mit dem gewünschten Fragment ausgeschnitten und durch Erwärmen in Gegenwart von Guanidiniumthiocyanat solubilisiert. Die DNA wurde anschließend bei hohen Salzkonzentrationen an eine Silicagelmembran gebunden und in 50 μ l Wasser eluiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über die Absorption bei 260 nm.

Für weitere Präparationen wurde das Fragment selbst als Template eingesetzt. Dann konnte auf die Gelextraktion verzichtet und das Fragment über Ethanol-Fällung mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 4,8, und 2 Volumen kaltem Ethanol bei -20°C über Nacht gereinigt werden. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und in 50 μ l Wasser gelöst. Die Konzentration wurde über die Absorption bei 260 nm bestimmt und mit Agarosegelelektrophorese zusätzlich kontrolliert.

Synthese und Reinigung von RNA

Für die *in-vitro*-Transkription wurden 300 nM DNA-Fragment in 50 μ l Transkriptionspuffer (40 mM Tris/HCl, pH 8,1 bei 37°C, 6 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 1 mM Spermidin und 0,01 % Triton X-100) mit 80 mg/ml Polyethylenglykol 8000, 1 mM NTPs und 0,1 μ g/ μ l bzw. 20 U T7-RNA-Polymerase versetzt und zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 μ l 25 mM EDTA gestoppt. Größere Ansätze wurden entsprechend skaliert.

Alternativ wurde die *in-vitro*-Transkription mit dem T7 *MEGA Shortscript* Kit von Ambion durchgeführt, das für die Synthese von RNA-Fragmenten unter 300 Basen optimiert ist. Wesentliche Unterschiede sind die Nukleotidkonzentration von 7,5 mM und die Gegenwart von RNase-Inhibitoren. Auch hier wurde die Reaktion zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Durch die Verwendung des Kits konnte die Aubeute deutlich erhöht werden.

Die Reinigung erfolgte über denaturierende RNA-Gelelektrophorese. Auf dem gefärbten Gel sind zwei Hauptbanden zu erkennen. Die oberste hat eine Länge von etwa 150 Basen und entspricht dem gewünschten 154-Basen Fragment, die darunter liegende hat eine

Länge von etwa 90 Basen. Die gewünschte Bande wurde jeweils ausgeschnitten. Die Gel-Fragmente wurden mit 100 μl Elutionspuffer (0,5 M Ammoniumacetat, 2 mM EDTA, 0,1 % SDS) pro 100 mg versetzt, durch Schockfrieren in flüssigem Stickstoff aufgebrochen und über Nacht bei 4°C eluiert. Anschließend wurden sie mit dem halben Volumen Elutionspuffer gewaschen. Der Überstand der Elution und des Waschschrilles wurden vereinigt und gefällt. Zur Ethanol-Fällung wurde die Lösung mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 4,8, und dem doppelten Volumen kaltem Ethanol versetzt. Zur Isopropanol-Fällung wurde 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 4,8, und 0,6 Volumen Isopropanol zugegeben. In beiden Fällen erfolgte die Fällung über Nacht bei -20°C. Die RNA wurde zentrifugiert, mit 100 μl 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem geeigneten Puffer (10 mM DTT, 20 mM Natriumphosphat, pH 7,2 oder 20 mM HEPES, pH 7,2) wieder aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über die Absorption bei 260 nm; eine Absorption von 1 entspricht einer Konzentration von 36 ng/ μl bzw. 678 nM (berechnet bei <http://www.bioscience.org>).

2.6 Spektroskopische Methoden

2.6.1 Absorptionsmessungen

Für Messungen, bei denen nur der Absorptionswert bei einer spezifischen Wellenlänge bestimmt werden sollte, wurde das BioPhotometer (Eppendorf) benutzt. Alle anderen Absorptionsmessungen erfolgten entweder am Amersham Ultropec 2100 *pro* oder am Lambda 9 UV/VIS/NIR Spektrophotometer (Perkin-Elmer).

Proteinspektren

Die Spektren der unmarkierten Proteine wurden zwischen 220 nm und 350 nm mit einer Geschwindigkeit von 125 nm/min (Ultrospec 2100) bzw. 30 nm/min (Lambda 9) aufgenommen, die Spektren der markierten Proteine zwischen 200 nm und 800 nm mit einer Geschwindigkeit von 250 nm/min (Ultrospec 2100). Die Absorption des Puffers wurde abgezogen.

Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinen erfolgte über die Absorption bei 280 nm. Der Extinktionskoeffizient wurde nach der Methode von Gill und Hippel (1989) bestimmt. Für das denaturierte Protein wurde ein Wert von 21050 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ berechnet. Aus dem

Vergleich der Absorption von identisch konzentrierten Proteinlösungen unter nativen und denaturierenden Bedingungen (6 M GdmCl) wurde der in dieser Arbeit verwendete native Extinktionskoeffizient von YxiN bei 280 nm $\epsilon_{Y,280} = 23540 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ erhalten.

Konzentrationsbestimmung markierter Proteine

Die Konzentrationsbestimmung markierter Proteine erfolgte anhand der Absorptionsspektren. Der Extinktionskoeffizient für Tetramethylrhodamin $\epsilon_{T,541}$ beträgt $95000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ im Absorptionsmaximum bei 541 nm, für Alexa488 liegt das Absorptionsmaximum bei 493 nm und der Extinktionskoeffizient $\epsilon_{A,493}$ bei $72500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Angaben von Molecular Probes). Zusammen mit Spektren der β -Mercaptoethanol-Addukte der beiden Farbstoffe können die Extinktionskoeffizienten der Farbstoffe bei anderen Wellenlängen berechnet werden. Alexa488 hat bei 280 nm einen Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{A,280} = 9300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, für Tetramethylrhodamin ist $\epsilon_{T,280} = 26500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Bei 493 nm absorbiert Tetramethylrhodamin mit $\epsilon_{T,493} = 18600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Im markierten Protein berechnen sich also die Konzentrationen an Protein und Farbstoff folgendermaßen:

$$c(\text{TMR}) = \frac{A_{541}}{\epsilon_{T,541} \cdot d} \quad (2.1a)$$

$$c(\text{Alexa}) = \frac{A_{493} - \epsilon_{T,493} \cdot c(\text{TMR}) \cdot d}{\epsilon_{A,493} \cdot d} \quad (2.1b)$$

$$c(\text{Protein}) = \frac{A_{280} - \epsilon_{T,280} \cdot c(\text{TMR}) \cdot d - \epsilon_{A,280} \cdot c(\text{Alexa}) \cdot d}{\epsilon_{Y,280} \cdot d} \quad (2.1c)$$

A_x ist die Absorption bei der Wellenlänge x nm, d ist der Lichtweg in cm. Das Absorptionsmaximum von TMR verschiebt sich bei der Bindung an Proteine geringfügig. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Absorption im Maximum verwendet.

Zugänglichkeit von Cysteinen für Dithionitrobenzoat

Zur Bestimmung der Zugänglichkeit der Cysteine wurden die Proteine mit Dithionitrobenzoat (DTNB) umgesetzt. Dabei wird für jedes zugängliche Cystein ein Thionitrobenzoat-anion gebildet, das anhand seiner Absorption bei 412 nm detektiert werden kann (Ellman, 1959; Riddles *et al.*, 1983). Dafür wurde das jeweilige Protein über einer NAP-5-Säule in einen reduktionsmittelfreien Puffer (50 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) überführt. Die genaue Konzentration wurde anhand der Absorption bei 280 nm bestimmt. 685 μl einer Proteinlösung mit einer Konzentration zwischen 5 und 10 μM wurden mit 15 μl einer 10 mM DTNB-Lösung versetzt und bei 20°C die Absorption bei 412 nm über

einen Zeitraum von mindestens einer Stunde beobachtet. Als Referenz wurden 685 μl Puffer ebenso behandelt.

Zur Bestimmung der Konzentration an zugänglichen Cysteinen wurde der Absorptionswert nach Erreichen des Plateaus verwendet. Der Anstieg der Absorption durch Freisetzung von Thionitrobenzoat wird bei Aggregation des Proteins nach längeren Meßzeiten durch Streuung überdeckt; in diesem Fall wurde der Wert vor erkennbarem Beginn der Aggregation verwendet oder die Messung wiederholt. Der Extinktionskoeffizient von Thionitrobenzoat bei 412 nm beträgt $14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in 100 mM Na-Phosphat, 1 mM EDTA, pH 8,0 bei Raumtemperatur. Durch Vergleich der Absorptionswerte identisch konzentrierter Lösungen in den beiden Puffern wurde daraus der Extinktionskoeffizient im Meßpuffer zu $13300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt. Die Zahl der zugänglichen Cysteine pro Protein erhält man aus dem Quotienten der Cystein- und der Proteinkonzentration.

2.6.2 Circular dichroismus

Spektren

Spektren im fernen UV wurden von 2 μM YxiN in 10 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, pH 7,5, in Küvetten mit 5 mm Lichtweg bei 25°C aufgenommen. Die Messung erfolgte zwischen 180 nm und 260 nm mit einer Bandbreite von 1 nm, einer Integrationszeit von 1 s, einer Schrittweite von 0,2 nm, einer Geschwindigkeit von 20 nm/min und zehnfacher Akkumulation. Bei Wellenlängen unter 200 nm stieg die Untergrundabsorption so stark an, dass keine Elliptizitäten mehr gemessen werden können.

Aus der gemessenen Elliptizität Θ in mGrad berechnet sich die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest $[\Theta]_{MRE}$ in $\text{Grad} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ nach Schmid (1997) zu

$$[\Theta]_{MRE} = 100 \cdot \frac{\Theta}{c \cdot d \cdot N}, \quad (2.2)$$

wobei c die Proteinkonzentration in mM, d die Schichtdicke in cm und N die Anzahl der Aminosäuren des Proteins (479 für YxiN) bezeichnen.

Thermische Stabilität

Zur Bestimmung der thermischen Stabilität wurde die Elliptizität ϵ einer 1 μM Proteinlösung in CD-Messpuffer (100 mM Natriumphosphat, pH 7,5, 500 mM NaCl, 100 μM TCEP, 100 μM EDTA, entgast) bei 222 nm in einem Temperaturbereich zwischen 20°C und 90°C untersucht. Bei dieser Wellenlänge wird das Meßsignal vor allem von α -Helices dominiert. Die

Temperaturerhöhung erfolgte mit 60°C/Stunde. Zur Messung wurde eine Schrittweite von 0,2°C, eine Bandbreite von 1 nm und eine Küvette mit 1 cm Lichtweg verwendet.

Die Entfaltung des Proteins bei höheren Temperaturen war irreversibel. Deshalb wurde auf eine thermodynamische Analyse der Entfaltungsdaten verzichtet und nur der Mittelpunkt des Übergangs als Maß für die Stabilität bestimmt. Hierfür wurden zunächst aus den linearen Bereichen der Messung die Basislinien für denaturiertes und natives Protein bestimmt.

$$\epsilon_N = \epsilon_N^0 + m_N * T \quad (2.3a)$$

$$\epsilon_U = \epsilon_U^0 + m_U * T \quad (2.3b)$$

ϵ_N und ϵ_U bezeichnen die Elliptizität des nativen bzw. des denaturierten Proteins bei der entsprechenden Temperatur. Mit ϵ_N^0 und ϵ_U^0 ist der Achsenabschnitt und mit m_N und m_U die Steigung der jeweiligen Basisline bezeichnet. Daraus erhält man den Anteil an nativem Protein [N] nach

$$[N] = \frac{\epsilon_N - \epsilon_U}{\epsilon_N - \epsilon_U} \quad (2.4)$$

Als Mittelpunkt des Übergangs wurde nun diejenige Temperatur bestimmt, bei der der Anteil an nativem Protein 0,5 erreicht hatte.

2.6.3 Fluoreszenzmessungen

Fluoreszenzmessungen wurden am Hitachi F4010, F4500 oder am Cary Eclipse Fluoreszenzspektrometer in Fluoreszenzküvetten mit einem minimalen Volumen von 100 μ l durchgeführt.

Fluoreszenzspektren

Zur Messung von Fluoreszenzspektren wurden geeignet verdünnte Lösungen in Meßpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM β -Mercaptoethanol) verwendet. Die Anregung erfolgte im Allgemeinen im Absorptionsmaximum mit einer Bandbreite von 5 nm, die Emission wurde mit einer Bandbreite von 10 nm und einer Geschwindigkeit von 60 nm/min (Hitachi F4500 und F4010) bzw. 120 nm/min (Cary Eclipse) bei 25°C gemessen. Die Spektren wurden um die Fluoreszenz des Puffers korrigiert.

Bestimmung des Förster-Abstands

Die Bestimmung des Förster-Abstands R_0 erfolgt nach der Formel

$$R_0^6 = \frac{9000 \ln(10)}{128\pi^5 N} \Phi_D \kappa^2 n^{-4} J = 8,8 \cdot 10^{-25} \cdot \Phi_D \kappa^2 n^{-4} J \quad (2.5)$$

Φ_D bezeichnet die Quantenausbeute des Donors, κ^2 ist ein Orientierungsfaktor, n ist der Brechungsindex der Lösung (1,33 für Wasser) und J das Überlappungsintegral zwischen der Fluoreszenz des Donors und der Absorption des Akzeptors (Förster, 1959).

Die Bestimmung der Quantenausbeute erfolgte nach Parker und Rees (1960). Von Fluoreszein als Referenz und den zu bestimmenden Proteinen wurden Lösungen mit einer identischen optischen Dichte von 0,1 bei 493 nm (Absorptionsmaximum von Alexa) in 0,1 M NaOH bzw. Meßpuffer (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,5) hergestellt. Dies entspricht einer Konzentration von 1,38 μ M Alexa. Für die Fluoreszenzspektren wurde bei 493 nm mit einer Bandbreite von 5 nm angeregt und die Emission zwischen 495 und 700 nm bei einer Bandbreite von 10 nm, einer Photomultiplierspannung von 500 V und einer Scangeschwindigkeit von 120 nm/min bei 20°C aufgenommen. Die Quantenausbeute der Probe Φ_P ergibt sich zu

$$\Phi_P = \Phi_R \cdot \frac{A_P}{A_R}, \quad (2.6)$$

wobei Φ_R die Quantenausbeute von Fluoreszein ist und 0,85 beträgt (Parker und Rees, 1960). A_P und A_R bezeichnen die Fläche der Fluoreszenzspektren von Probe und Referenz zwischen 500 nm und 700 nm.

Das Überlappungsintegral J gibt an, wie stark die Überlappung der Emission des Donors mit der Absorption des Akzeptors ist:

$$J = \int_0^{\infty} f(\lambda)\epsilon(\lambda)\lambda^4 d\lambda \quad (2.7)$$

Hierbei ist $f(\lambda)$ die auf eine Gesamtintensität von 1 normierte Fluoreszenz des Donors und $\epsilon(\lambda)$ der Extinktionskoeffizient des Akzeptors bei der Wellenlänge λ (Förster, 1959).

Nukleotidbindung

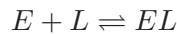
Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten für verschiedene YxiN-Nukleotid-Komplexe erfolgte durch Fluoreszenz-Gleichgewichts-Titration mit 2'/3'-O-(N-Methyl-anthraniloyl)-adenosin-5'-diphosphat (mant-ADP). mant-ADP ist ein fluoreszierendes ADP-Analogon, das in hydrophober Umgebung, also auch bei Bindung an Protein, deutlich höhere Fluoreszenzquantenausbeute zeigt als in wässriger Umgebung (Hiratsuka, 1983). Das kann ausgenutzt werden, um die Bindung an ein Protein, aber auch die Verdrängung durch nicht fluoreszierende Nukleotide zu untersuchen.

mant-ADP-Titration Zur Untersuchung der Bindung von mant-ADP durch YxiN wurde 1 μ M mant-ADP in Meßpuffer (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,5) bei 20°C bzw. 25°C vorgelegt und mit Protein bis zu der gewünschten

Maximalkonzentration, meist 20 μM , titriert. Die Konzentration an mant-ADP wurde dabei konstant gehalten. Die Fluoreszenz wurde bei 365 nm (Bandbreite 5 nm) angeregt und bei 430 nm (Bandbreite 10 nm) nach dreiminütigem Äquilibrieren über eine Minute gemessen und gemittelt.

Verdrängungstitration Zur Untersuchung der Bindung von ADP, ATP, ATP γ S und AMPPNP wurde eine Lösung aus 1 μM mant-ADP und 20 μM Protein in Meßpuffer vorgelegt und mit den entsprechenden Nukleotiden bis zur gewünschten Maximalkonzentration, meist 10 mM, titriert.

Auswertung Für die Nukleotidbindung durch YxiN gilt das Gleichgewichtsschema



Dann berechnet sich die Gleichgewichtskonstante K_D nach

$$K_D = \frac{[E][L]}{[EL]} \quad (2.8)$$

aus den Konzentrationen von Enzym $[E]$, mant-ADP $[L]$ und Enzym-Ligand-Komplex $[EL]$ im Gleichgewicht. Für Enzym und Ligand gilt die Massenerhaltung ($[E] = [E]_0 - [EL]$, $[L] = [L]_0 - [EL]$; $[E]_0$ und $[L]_0$ bezeichnen die jeweiligen Gesamtkonzentration von Enzym und Ligand). Damit erhält man aus Gleichung 2.8 für die Konzentration des Enzym-Ligand-Komplexes die Beziehung

$$[EL] = \frac{[E]_0 + [L]_0 + K_D}{2} \pm \sqrt{\frac{([E]_0 + [L]_0 + K_D)^2}{4} - [E]_0[L]_0}, \quad (2.9)$$

wobei nur das Minus vor der Wurzel physikalisch sinnvoll ist.

Für die Fluoreszenz von mant-ADP gilt

$$F = F_0 + \Delta F \cdot \frac{[EL]}{[L]_0} \quad (2.10)$$

F_0 bezeichnet die Fluoreszenz des freien mant-ADP, ΔF ist die maximale Fluoreszenzänderung bei vollständiger Bindung an das Protein. Setzt man nun Gleichung 2.9 ein, so erhält man die Gleichung, die an die experimentell gemessene Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration angepasst werden kann, um Werte für die Dissoziationskonstante K_D zu erhalten.

$$F = F_0 + \frac{\Delta F}{[L]_0} \cdot \left(\frac{[E]_0 + [L]_0 + K_D}{2} - \sqrt{\frac{([E]_0 + [L]_0 + K_D)^2}{4} - [E]_0[L]_0} \right) \quad (2.11)$$

Im Falle der Verdrängungstitrationen existieren zwei Liganden. Man erhält zwei mögliche Bindungsgleichgewichte:

$$K_{D,1} = \frac{[E][L_1]}{[EL_1]} \quad (2.12a)$$

$$K_{D,2} = \frac{[E][L_2]}{[EL_2]} \quad (2.12b)$$

wobei $[L_1]$ das fluoreszierende mant-ADP und $[L_2]$ das nicht fluoreszierende Nukleotid bezeichnet. Auch in diesem Fall gilt die Massenerhaltung für beide Liganden und das Enzym. Die Fluoreszenz setzt sich zusammen aus der anteiligen Fluoreszenz des freien Liganden $F_{L_1}[L_1]$ und des proteingebunden mant-ADP $F_{EL_1}[EL_1]$.

$$F = F_{L_1}[L_1] + F_{EL_1}[EL_1] \quad (2.13)$$

Dieses System ist nicht analytisch lösbar, daher wurde eine numerische Berechnung mit Hilfe des Programms Scientist (Micromath) durchgeführt. Dabei werden die Variablen mittels iterativer Minimierung der Fehlerquadrate an die gemessenen Werte für die Fluoreszenz F in Abhängigkeit von der Konzentration des nicht fluoreszierenden Nukleotids $[L_2]_0$ angeglichen. Die Konzentrationen für mant-ADP $[L_1]_0$ und YxiN $[E]_0$ sowie die Dissoziationskonstante für mant-ADP $K_{D,1}$ wurden dabei fest vorgegeben. Als Rahmenbedingung wurde zusätzlich verlangt, dass die Konzentrationen an freien Nukleotiden bzw. Enzym positiv und nicht größer als die Gesamtkonzentration der entsprechenden Substanzen waren. Die Auswertung lieferte einen Wert für die Dissoziationskonstante des nicht fluoreszierenden Nukleotids.

RNA-Bindung

Zur direkten Untersuchung der RNA-Bindung wurde fluoreszeinmarkierte RNA eingesetzt. 1 μ M unmarkierter 9b-Strang und 1 μ M des am 5'-Ende mit Fluoreszein markierten 32b-Strangs wurden bei Raumtemperatur eine Stunde in 20 mM HEPES, pH 7,5 inkubiert, um die Ausbildung des Doppelstrang zu ermöglichen.

Die Messung der RNA-Bindung erfolgte in 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,5 bei 25°C. 100 nM der doppelsträngigen RNA wurden vorgelegt und mit YxiN* Q47C TMR (YxiN* bezeichnet die Mutante ohne zugängliche Cysteine, YxiN C61S C267S) bis zu einer Konzentration von 400 nM titriert. Bei der Bindung sollte durch Energietransfer die Fluoreszenz des Fluoreszein sinken; die Fluoreszenz des Akzeptors TMR steigt sowohl durch Energietransfer als auch durch die steigende Konzentration an. Daher wurde nur der Donor bei 439 nm (Bandbreite 5 nm) angeregt und bei 525 nm (Bandbreite 10 nm) beobachtet.

In einem zweiten Experiment wurde 10 nM RNA vorgelegt und mit ummarkiertem YxiN wt bis zu einer Konzentration von 100 nM titriert. Diese Messung erfolgte aufgrund der höheren erforderlichen Sensitivität am Jasco Spektrofluorometer. Die Fluoreszenz wurde nach dreiminütigem Äquilibrieren bei 493 nm mit einer Bandbreite von 3 nm angeregt und bei 525 nm mit einer Bandbreite von 10 nm detektiert. Die Spannung des Photomultipliers wurde auf 800 V eingestellt.

Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten erfolgte analog zu der in Abschnitt 2.6.3 beschriebenen Auswertung für die Nukleotidbindung nach Gleichung 2.11.

2.7 Limitierte Proteolyse

Bei der Markierung eines Proteins mit zwei Farbstoffen ist die Position der beiden Farbstoffe interessant. Eine Möglichkeit zur Bestimmung bietet die limitierte Proteolyse, für YxiN mit Thermolysin. Dazu wurden 25 μl einer 5 μM Proteinlösung in 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5, hergestellt, mit 0,5 μM Thermolysin versetzt und bei 20°C inkubiert. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden Proben von 5 μl entnommen, mit 3 μl SDS-Probenpuffer versetzt und sofort 10 Minuten bei 95°C denaturiert. Proben zum Zeitpunkt 0 wurden vor Zugabe der Protease entnommen. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Bei fluoreszenzmarkierten Proteinen wurde vor dem Färben die Fluoreszenz nach Anregung mit UV-Licht photographiert.

2.8 Aktivität von YxiN

2.8.1 ATPase-Aktivität

Zur Untersuchung der RNA-abhängigen ATPase-Aktivität von YxiN wurde ein gekoppelter spektroskopischer Test nach Bessman (1963) verwendet, wie er für YxiN bereits von Kossen und Uhlenbeck (1999) beschrieben wurde. Bei diesem Test ist die Hydrolyse von ATP durch die Enzyme Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase an die Oxidation von NADH geknüpft. Diese kann anhand der Absorption bei 340 nm verfolgt werden. Als RNA wurde das 154-Basen Fragment der *B. subtilis* 23 S rRNA eingesetzt (vgl 2.5).

Messung 13 $\mu\text{g/ml}$ Lactatdehydrogenase und 23 $\mu\text{g/ml}$ Pyruvatkinase wurden in ATPase-Puffer (50 mM HEPES, 175 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 100 μM DTT, 200 μM NADH, 1 mM Phosphoenolpyruvat) bei 37°C vorgelegt und mit 10 nM Protein und variablen Konzentrationen an ATP oder RNA versetzt. Zur Messung der RNA-Abhängigkeit wurde die ATP-

Konzentration konstant bei 5 mM gehalten, für die ATP-Abhängigkeit wurde eine RNA-Konzentration von 150 nM verwendet. Bei einfachen Bestimmungen der Aktivität und zur Bestimmung der Temperaturabhängigkeit wurde 5 mM ATP und 150 nM RNA eingesetzt. Für die Messung der Temperaturabhängigkeit wurde die Temperatur zwischen 20°C und 45°C variiert. Zur Auswertung wurde nur der anfängliche, lineare Bereich der Messung (mindestens 10 Minuten) verwendet.

Auswertung Die Geschwindigkeit v der Reaktion, die der Konzentrationsänderung von ATP pro Zeit entspricht, ergibt sich aus der Absorptionsänderung $\frac{\Delta A_{340}}{\Delta t}$ nach

$$v = \frac{\Delta A_{340}}{\Delta t} \cdot \frac{1}{\epsilon_{340} \cdot d}, \quad (2.14)$$

wobei der molare Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm $6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und die Schichtdicke d 1 cm beträgt. Die Hydrolyserate k_2 (in $\Delta[\text{ATP}] \cdot \text{s}^{-1}[\text{YxiN}]^{-1}$) ist die auf die Konzentration an Enzym normierte Geschwindigkeit.

$$k_2 = \frac{v}{E_0} \quad (2.15)$$

Zur Auswertung der ATP-Abhängigkeit wird der Michaelis-Menten-Formalismus verwendet. Aus dem zugrundeliegenden Reaktionschema



erhält man unter der Annahme eines Fließgleichgewichts und in Anwesenheit eines Überschusses an Substrat die Michaelis-Menten-Gleichung:

$$v = v_{max} \cdot \frac{[S]_0}{K_M + [S]_0} \quad (2.16)$$

v ist die Reaktionsgeschwindigkeit bei einer bestimmten Substratkonzentration, v_{max} die maximale Geschwindigkeit. $[S]_0$ ist die eingesetzte Konzentration an Substrat und K_M die Michealis-Menten-Konstante. Wenn die Dissoziation des Enzym-Substrat-Komplexes deutlich schneller ist als die Bildung des Produktes, dann entspricht K_M der Dissoziationskonstanten des Komplexes K_D .

Für die RNA-Abhängigkeit gilt die Annahme eines Überschusses an Substrat nicht mehr. In diesem Fall kann der vereinfachte Michaelis-Menten-Formalismus nicht eingesetzt werden; stattdessen wird die explizite Geschwindigkeitsgleichung verwendet:

$$v = \frac{v_{max}}{2[E]_0} \left([E]_0 + [S]_0 + K_{app} - \sqrt{([E]_0 + [S]_0 + K_{app})^2 - 4[E]_0[S]_0} \right) \quad (2.17)$$

Die Anpassung dieser Gleichung an die gemessenen Geschwindigkeitswerte ergibt eine Maximalgeschwindigkeit v_{max} und eine apparente Dissoziationskonstante K_{app} für RNA.

Aus der Maximalgeschwindigkeit läßt sich die Wechselzahl k_{cat} bestimmen.

$$k_{cat} = \frac{v_{max}}{[E]_0} \quad (2.18)$$

2.8.2 RNA-Helikase-Aktivität

Fluoreszenzintensität markierter RNA in Lösung

Fluoreszenzmarkierte RNA zeigt unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten in einzelsträngiger und doppelsträngiger Form. Damit sollte eine Beobachtung der Helikase-Aktivität in Lösung möglich sein. Hierfür wurden verschiedene fluoreszenzmarkierte RNA-Konstrukte getestet, eine Liste findet sich in Abschnitt 2.1.4.

Die einzelsträngige markierte RNA (RNA A) wurde in Meßpuffer (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM β -Mercaptoethanol) vorgelegt. Anschließend wurde der komplementäre Strang (RNA B) zugegeben und mindestens zehn Minuten Zeit für die Bildung des Doppelstranges gelassen. Um eine Reassoziaton des Doppelstranges mit der markierten RNA zu verhindern, wurde ein zehnfacher Überschuß der RNA A in unmarkierter Form zugegeben. Anschließend wurden nacheinander ein 10facher Überschuß an Protein und ein tausendfacher Überschuß an ATP bzw. ADP zugegeben. Nach jedem Schritt wurde drei Minuten äquilibriert und dann ein Spektrum aufgenommen; nach Zugabe des Nukleotids wurde sofort mit der zeitabhängigen Messung der Fluoreszenz begonnen. Die Messungen erfolgten bei 25°C.

Die Wellenlängen wurden in Abhängigkeit des Fluorophors gewählt. Die Anregung erfolgte, soweit nicht anders angegeben, mit einer Bandbreite von 5 nm, Emission wurde mit einer Bandbreite von 10 nm detektiert. Mit 2-Aminopurin markierte RNA wurde bei 310 nm angeregt. Emissionsspektren wurden zwischen 320 nm und 500 nm aufgenommen, die zeitabhängige Messung erfolgte nicht im Emissionsmaximum bei 370 nm, sondern bei 400 nm, um eventuelle Einflüsse der Proteinfluoreszenz auszuschließen. Fluoreszein wurde bei 495 nm angeregt und bei 520 nm detektiert, Spektren wurden zwischen 500 nm und 650 nm aufgenommen. Mit Dansyl markierte RNA wurde bei 325 nm mit einer Bandbreite von 10 nm angeregt und bei 540 nm detektiert, Spektren wurden zwischen 330 nm und 650 nm aufgenommen.

Fluoreszenzänderungen aufgrund von Doppelstrangbildung sind nicht sehr ausgeprägt. Eine sehr viel deutlichere Änderung sollte man eigentlich sehen, wenn man einen RNA-Strang mit einem Fluoreszenzdonor (32 Basen, mit Fluoreszein markiert) und den anderen Strang mit einem Akzeptor (9 Basen, Tetramethylrhodamin, S1-TMR) markiert und die Fluoreszenz des Akzeptors nach Anregung des Donors beobachtet. Für diese Messungen von Spektren

wurde Fluoreszein bei 492 nm angeregt und zwischen 500 nm und 700 nm beobachtet, TMR wurde bei 553 nm angeregt und zwischen 560 und 700 nm gemessen.

Fluoreszenz markierter RNA in Gelen

Analog zur Untersuchung radioaktiv markierter RNA kann auch fluoreszenzmarkierte RNA in nativen Acrylamidgelen untersucht werden. Dafür wurden zunächst einzelne Reaktionsansätze mit einem Volumen von 10 μl hergestellt. Diese enthielten 10 μM YxiN, 5 μM S1-Fl und 10 μM Tth-S1-up, 50 μM S1 und 10 mM des Nukleotids (ATP oder ADP) in Helikase-Puffer (50 mM HEPES, 150 mM KCl, 5% Glycerin, 100 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA, 5 mM MgCl_2 , pH 7,5). Die Doppelstrangbildung wurde durch Erwärmen einer fünffach konzentrierten RNA-Lösung auf 60°C für 10 Minuten und anschließendes Abkühlen während einer Stunde auf 25°C verbessert. Die Reaktionen wurden auf 25°C temperiert und durch Zugabe des Nukleotids gestartet. Nach 10 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 μl 2 \times Stop-Lösung (2% SDS, 100 mM DTT, 10% Glycerin, 0,1% Bromphenolblau, 50 mM Tris/HCl, pH 6,8) beendet. Bei zeitabhängigen Messungen wurden entsprechend größere Ansätze hergestellt; zu den entsprechenden Zeiten wurden jeweils 10 μl entnommen und mit 10 μl 2 \times Stop-Lösung versetzt. Die Proben wurden mittels nativer RNA-Gelelektrophorese getrennt und die Fluoreszenz des Fluoreszeins wurde mit UV-Licht angeregt und an der Geldokumentation Gel Doc 2000 quantifiziert.

2.9 Fluoreszenzmarkierung

2.9.1 Farbstoffe

Alexa Fluor 488 C₅ Maleimid (Alexa488) und Tetramethylrhodamin-5-Maleimid (TMR) von Molecular Probes wurden aliquotiert. Unmittelbar vor Verwendung wurde jeweils aus einzelnen Aliquots 10 mM Lösungen in DMSO hergestellt. Vorverdünnungen wurden in den benötigten Puffern angefertigt.

Für Referenzmessungen wurden β -Mercaptoethanol-Addukte der beiden Farbstoffe hergestellt. Dafür wurden 5 nmol des Farbstoffs mit 5 μmol β -Mercaptoethanol versetzt, eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und im Konzentrator zur Trockne eingedunstet. Anschließend wurde der Farbstoff in 100 μl Puffer (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) gelöst und bei -20°C im Dunkeln aufbewahrt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand der Absorption (vgl. 2.6.1).

2.9.2 Markierungskinetik

Die Geschwindigkeit der Reaktion der Cysteine an verschiedenen Positionen mit den Farbstoffen wurde in den entsprechenden Mutanten mit einem zugänglichen Cystein (Einfachmutanten) direkt verfolgt und anhand der Fluoreszenz auf SDS-PAGE-Gelen evaluiert.

Hierfür wurden 50 μl 20 μM Proteinlösungen auf Mikrodialysemembranen (Millipore) gegen Markierungspuffer (50 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 1 mM TCEP, pH 7,5) dialysiert und von β -Mercaptoethanol befreit. Die genaue Konzentration wurde durch Absorptionsmessung bestimmt. Die Proteinlösungen wurden auf die entsprechende Temperatur vortemperiert; es wurden Tests bei 4°C, 15°C und 30°C durchgeführt. Die Markierungsreaktion wurde durch Zugabe eines fünffachen Überschusses an TMR oder Alexa488 gestartet. Nach 10, 30, 60 und 180 Minuten sowie nach 16 Stunden wurden 5 μl entnommen, sofort zu 3 μl SDS-Probenpuffer gegeben, fünf Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt. Nach Abschluß der Reaktion wurden die Proben mittels SDS-PAGE untersucht und sowohl die fluoreszierenden Banden vor dem Färben als auch die Proteinbanden analysiert.

2.9.3 Markierung mit einem Farbstoff

Zur Markierung mit einem Farbstoff wurden Proteine mit einem zugänglichen Cystein (Einfachmutanten) mit dem entsprechenden Farbstoff umgesetzt. Dafür wurden ca. 20 μM Proteinlösungen mit NAP-5-Gelfiltrationssäulen in Markierungspuffer (50 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 1 mM TCEP, pH 7,5) überführt und die genaue Konzentration bestimmt. Die Lösungen wurden auf 15°C temperiert und mit einem dreifachen Überschuss an Alexa488-Maleimid oder einem fünffachen Überschuss an TMR-Maleimid versetzt. Nach 15 Stunden Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 mM β -Mercaptoethanol gestoppt und überschüssiger Farbstoff mit einer NAP-10-Gelfiltrationssäule in 50 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 2 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,5 entfernt. Die Proteine wurden durch Hydrophobe Interaktionschromatographie gereinigt oder durch eine weitere NAP-10-Säule von Farbstoffresten befreit. Markierte Proteine wurden mit 0,5 ml Vivaspin Konzentratorröhrchen auf ein Volumen von etwa 150 μl konzentriert. Konzentration und Markierungsgrad wurden wie bereits in 2.6.1 beschrieben bestimmt.

2.9.4 Markierung mit zwei Farbstoffen

Zur Markierung von Proteinen mit zwei zugänglichen Cysteinen (Doppelmutanten) mit zwei verschiedenen Farbstoffen wurden verschiedenen Strategien verfolgt. In jedem Fall

wurden 20 μM Proteinlösungen in Markierungspuffer (50 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 1 mM TCEP, pH 7,5) durch Pufferwechsel mit NAP-5-Gelfiltrationssäulen hergestellt und die genaue Konzentration bestimmt.

Die *sequentielle* Markierung erfolgte mit Doppelmutanten, deren Cysteine deutlich unterschiedlich zugänglich waren. Hierfür wurde die Lösung auf die Temperatur gebracht, bei der das leichter zugängliche Cystein am schnellsten reagiert. Die Optimalbedingungen wurden anhand der Markierungskinetik bestimmt (vgl. 2.9.2). Dann wurde ein geringer Überschuß (1,5 bis fünffach) des ersten Farbstoffs zugegeben und die Reaktion zwischen 60 und 120 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 mM β -Mercaptoethanol gestoppt. Das nun einfach markierte Protein wurde entweder durch zwei Läufe über eine NAP-10-Säule in Markierungspuffer von Farbstoffresten befreit oder durch einen Lauf über eine NAP-10-Säule von Farbstoff befreit und anschließend über Hydrophobe Interaktionschromatographie von unmarkiertem und doppelt markiertem Protein befreit. Das Protein wurde in beiden Fällen anschließend auf die optimale Reaktionstemperatur des zweiten Cysteins gebracht. Dann wurde der zweite Farbstoff in einem größeren Überschuß (fünf- bis zehnfach) zugegeben und die Reaktion 15 Stunden inkubiert, bevor sie durch Zugabe von 2 mM β -Mercaptoethanol gestoppt wurde.

Zur *statistischen* Markierung wurde die Proteinlösung mit einer Mischung der beiden Farbstoffe versetzt. TMR lag dabei in größerem Überschuß (fünf- bis zehnfach) vor als Alexa488 (1,5 bis fünffach). Die Reaktion erfolgte bei 15°C für 15 Stunden und wurde durch Zugabe von 2 mM β -Mercaptoethanol gestoppt.

Alternativ wurde die Markierungsreaktion wie bei der sequentiellen Markierung mit einem geringen Überschuß eines Farbstoffs gestartet. Nach einer kurzen ersten Inkubationszeit von 60 bis 120 Minuten wurde die Reaktion aber nicht gestoppt, sondern direkt ein größerer Überschuß des zweiten Farbstoffs zugegeben. Erst nach weiteren 15 Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 mM β -Mercaptoethanol gestoppt. Mit dieser *pseudo-sequentiellen* Strategie sollten Proteinverluste durch Zwischenschritte minimiert werden.

Die Reinigung doppelt markierter Proteine erfolgte über Hydrophobe Interaktionschromatographie (vgl. 2.4.2). Die Fraktionen mit markiertem Protein wurden vereinigt und in 0,5 ml Vivaspin Konzentrorröhrchen in mehreren Schritten auf ein Volumen von etwa 150 μl konzentriert. Die Bestimmung der Konzentration und des Markierungsgrads erfolgte über Absorptionsspektren. Die Markierungsreaktion wurde mit limitierter Proteolyse (vgl. 2.7) und SDS-PAGE (vgl. 2.2.2) überprüft.

2.10 Einzelmolekülexperimente

2.10.1 Aufbau

Messungen an einzelnen Molekülen erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie (vgl. Abschnitt 1.2.2). Eine schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus ist in Abbildung 2.1 gezeigt.

Ein diodengepumpter frequenzverdoppelter Neodym:Yttrium-Vanadat-Laser (Millenia Xs, Spectra-Physics, Mountain View, USA) wurde verwendet, um einen modengekoppelten Titan:Saphir Festkörperlaser (Tsunami, Spectra-Physics, Mountain View, USA) zu pumpen.

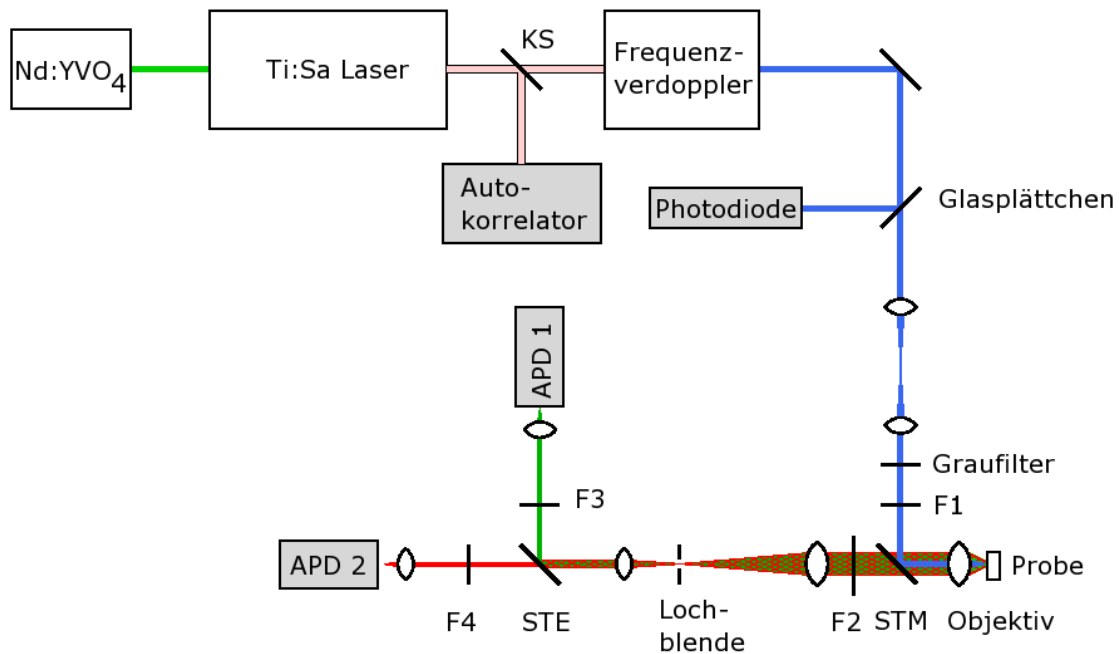


Abbildung 2.1: Schema des Versuchsaufbaus. Ein Neodym:Yttrium-Vanadat-Laser wird verwendet, um einen modengekoppelten Titan:Saphir Festkörperlaser zu pumpen. Dieser emittiert gepulstes Licht einer Wellenlänge von 950 nm. Der Laserstrahl kann mittels des Klappspiegels KS auf den Autokorrelator umgeleitet werden; dieser dient zur Bestimmung der Pulsdauer. Der Laserstrahl durchläuft einen Frequenzverdoppler. Der resultierende Strahl mit einer Wellenlänge von 475 nm wird über einen Spiegel auf ein Glasplättchen gelenkt, das einen geringen Teil des Anregungslichts auskoppelt. Dieser Reflex wird als zeitliche Referenz von einer Photodiode detektiert. Der Laserstrahl durchläuft zwei Sammellinsen mit identischer Brennweite, um die im Frequenzverdoppler erzeugte Divergenz des Laserstrahls auszugleichen. Anschließend passiert er einen variablen Graufilter zur Anpassung der Anregungsintensität und einen Bandpassfilter F1. Der wellenlängenabhängige Strahlteiler STM lenkt den Strahl auf das Objektiv, wo er in die Probe fokussiert wird. Die emittierte Fluoreszenz wird von dem selben Objektiv gesammelt und vom Strahlteiler transmittiert. Der Strahl durchläuft ein 3:1 Teleskop mit einer Lochblende im Brennpunkt und wird durch den Strahlteiler STE auf den Donor- und den Akzeptorkanal aufgeteilt. Beide Lichtstrahlen durchlaufen je einen Filter (F3 bzw. F4), bevor sie auf eine Avalanche Photodiode (APD) fokussiert werden. Weitere Details sind im Text erläutert.

Dieser kann zwischen 700 nm und 1000 nm durchgestimmt werden; in dieser Arbeit wurde er stets bei einer Wellenlänge von 950 nm betrieben. Die Ausgangsleistung betrug 1,0 W. Zur Einstellung der Pulsdauer wurde der Laserstrahl mit einem Klappspiegel (New Focus, San Jose, USA) auf einen Autokorrelator (Pulse Check, APE, Berlin) reflektiert. Da die Zeitauflösung der Messung durch die Detektoren bestimmt war, wurde für den Anregungspuls nicht die minimal mögliche Dauer von 1,4 ps (volle Halbwertsbreite) eingestellt, sondern eine Länge von 2,5 ps. Bei diesen Bedingungen blieb der Laser auch bei geringen Temperaturschwankungen stabil.

Das Laserlicht wurde anschließend auf eine Wellenlänge von 475 nm frequenzverdoppelt. Der dazu verwendete Pulse-Picker 3980 (Spectra-Physics, Mountain View, USA) kann zusätzlich nur einen bestimmten Anteil der Pulse passieren lassen; diese Funktion wurde nicht verwendet. Die Ausgangsleistung betrug typischerweise 60 mW.

Mit einem Glasplättchen wurde ein kleiner Teil des Lichts abgelenkt und als zeitliche Referenz von einer schnellen Photodiode (PHD-400-N, Becker & Hickel GmbH, Berlin) detektiert. Durch ein Teleskop aus zwei Sammellinsen mit einer Brennweite von 50 mm (ThorLabs, Newton, USA; alle verwendeten Linsen sind achromatische Duplett-Linsen) wurde die leichte Divergenz des Laserstrahls nach dem Frequenzverdoppler ausgeglichen. Die Intensität des Anregungslichts wurde mit einem variablen reflektiven Graufilter (Tech Spec Circular Variable Density Filter, Edmund Industrie Optik GmbH, Karlsruhe) eingestellt und mit einem Leistungsmesser (FieldMate Laser Power Meter, Coherent, Portland, USA) gemessen. Der Filter F1 (BP470-490, Olympus, Hamburg), der nur für Licht mit Wellenlängen zwischen 470 nm und 490 nm durchlässig ist, wurde verwendet, um nur das gewünschte Anregungslicht in das Mikroskop einfallen zu lassen.

Ein invertiertes Mikroskop (IX71, Olympus, Hamburg) wurde verwendet, um das Anregungslicht über einen dichroitischen Strahlteiler STM (DM505, Olympus, Hamburg) durch ein Objektiv (UPlanApo Wasserimmersions-Objektiv, Olympus, Hamburg) in die Probe zu fokussieren. Das Objektiv hat eine numerische Apertur von 1,2 und eine Brennweite von 3,3 mm. Der anregende Strahl hat in der Fokusebene einen Radius von $0,67 \mu\text{m}$ (Spreitler, 2006). Die Anregungsintensität in dieser Ebene berechnet sich aus der Gesamtintensität des Strahls vor Eintritt in das Mikroskop, dem Anteil, der tatsächlich in das Zentrum des Beugungsmusters fällt (84 %, Long (1977)), der Kreisfläche des Strahls und der effektiven Transmission des Objektivs von 85 % (Herstellerangabe). Das konfokale Volumen betrug $3,8 \cdot 10^{-15} \text{ l}$ (Spreitler, 2006).

Die Probe befand sich in einer Probenkammer (Lab-Tek Chambered Coverglass System, Nalge Nunc International, Rochester, USA), die aus einem Deckgläschen ($140 \mu\text{m}$ Dicke) mit

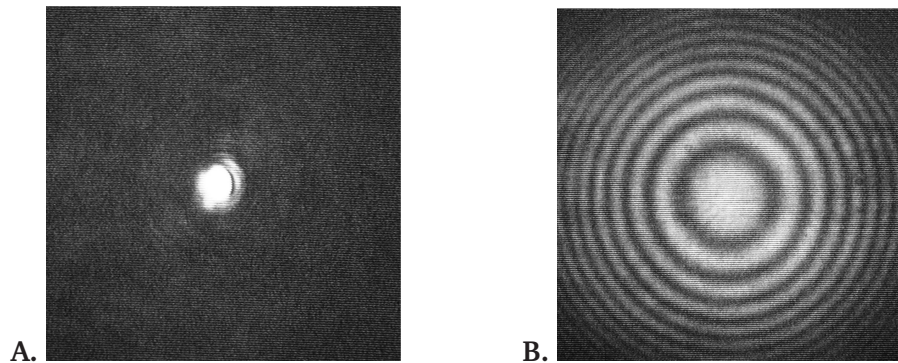


Abbildung 2.2: Bild des Fokus auf der CCD-Kamera. **A.** Wenn die fokale Ebene direkt auf der Oberfläche liegt, kann die Reflexion mit einer CCD-Kamera beobachtet werden. **B.** Bild auf der CCD-Kamera in einem Abstand von $110 \mu\text{m}$ zur Oberfläche. Liegt der Fokus nicht direkt auf der Oberfläche des Glasplättchens, so treten Beugungsmuster auf.

aufgeklebten Plastikkammern bestand. Mit einer CCD-Kamera (Santec by Baxall (Stockport, UK)) wurde die Reflexion des Anregungslichts an der Oberfläche des Deckgläschens beobachtet. Wenn die fokale Ebene direkt an der Oberfläche lag, war ein klarer Kreis zu erkennen (vgl. hierzu Abbildung 2.2). Der gewünschte Abstand der Fokalebene von der Oberfläche des Deckgläschens konnte mit einem Drehregler am Mikroskop eingestellt werden.

Emittiertes Licht wurde mit dem selben Objektiv gesammelt und vom Strahlteiler STM transmittiert. Der Filter F2 (HQ490LP, AHF Analystechnik AG, Tübingen) trennte elastisch gestreutes Anregungslicht ab. Eine Linse mit einer Brennweite von 150 mm (ThorLabs, Newton, USA) fokussierte das Licht auf eine Lochblende mit einem Durchmesser von $100 \mu\text{m}$. Der Strahl wurde mit einer weiteren Linse mit einer Brennweite von 50 mm parallelisiert. Die Lochblende diente zur Begrenzung des konfokalen Volumens in Strahlrichtung. Der Strahlteiler STE (Q565LP, AHF, Tübingen) reflektierte die Fluoreszenz des Donors, während die Fluoreszenz des Akzeptors transmittiert wurde. Der reflektierte Strahl passierte den Filter F3 (D535/40, AHF, Tübingen) und wurde mit einer Linse (Brennweite 50 mm , ThorLabs, Newton, USA) auf die Detektionsfläche einer Avalanche Photodiode (APD1, SPCM-AQR-14, Perkin Elmer Optoelectronics, Überlingen) fokussiert. Der transmittierte Strahl passierte den Filter F4 (HQ610/75, AHF, Tübingen) und wurde auf die zweite APD fokussiert. Die Detektionseffizienz der APDs betrug 65% , die maximale Zeitauflösung lag bei 300 ps (Herstellerangaben).

Die Signale der beiden APDs wurden über einen Router (HRT-82, Becker & Hickl GmbH, Berlin) an eine Einzelphotonenzählkarte (SPC-630, Becker & Hickl GmbH, Berlin) gesendet, die auch die Signale der Photodiode empfing. Für jedes angekommene Photon wurde

sowohl die Zeit seit Beginn der Messung (Makrozeit, gemessen in 50 ns-Schritten) als auch die Zeit seit dem Anregungspuls (Mikrozeit, gemessen in 48,8 ps-Schritten) zusammen mit dem Kanal (Donor oder Akzeptor) gespeichert.

2.10.2 Messungen

Vorbereitung

Zur Entfernung von fluoreszierenden Verunreinigungen wurde der Meßpuffer (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) mit granulierter Aktivkohle versetzt. Nach 15 Stunden wurde der Puffer dekantiert und sterilfiltriert. Wasser für das Immersionsobjektiv wurde ebenso behandelt.

Zur Verminderung der Oberflächenadsorption von YxiN wurden die verwendeten Probenkammern vorbehandelt. Dazu wurden verschiedene Lösungen verwendet: 0,5 mg/ml BSA, 400 mg/ml PEG 8000, und 5, 10 oder 20 μ M YxiN C61S K337C in Meßpuffer. Die Kammern wurden mindestens eine Stunde mit 200 μ l der Lösung inkubiert, dann einmal mit Meßpuffer gespült und unmittelbar verwendet.

Der Aufbau wurde nach 30minütigem Aufwärmen des Lasers justiert, so dass die bei der Beschreibung des Aufbaus (Abschnitt 2.10.1) angegebenen Spezifikationen erreicht wurden. Zur Justage der Emissionsseite wurde eine Lösung mit 10 nM β -Mercaptoethanol-Alexa488 und 50 nM β -Mercaptoethanol-TMR in Meßpuffer in einer mit PEG 8000 behandelten Kammer verwendet und mit einer Leistung von 0,5 kW·cm⁻² angeregt. Bei optimaler Justage wurden damit in beiden Kanälen Zählraten von etwa 130000 s⁻¹ erreicht.

Ablauf einer Messung

Zur Messung wurden die entsprechenden Proben direkt in den Probenkammern vorbereitet. Das minimale Volumen betrug 150 μ l. Standardbedingungen für Einzelmolekülmessungen waren 30 pM markiertes Protein, 2 mM Nukleotid (ATP, ADP oder ATP γ S) und 150 nM RNA in Meßpuffer. Die Kammern wurden mit 10 μ M YxiN C61S K337C vorbehandelt. Die fokale Ebene befand sich 110 μ m über dem Boden der Kammer. Die Anregung erfolgte mit einer Intensität von 5,1 kW·cm⁻². Die Messung dauerte 20 Minuten. Abweichungen von diesen Bedingungen sind bei den jeweiligen Messungen angegeben.

Zur Untersuchung der Oberflächenbindung von markiertem Protein wurden die Zählraten einer Mischung aus 10 nM YxiN* Q47C Alexa488 und 10 nM YxiN* Q47C TMR bei einer Anregungsleistung von 1,0 kW·cm⁻² in verschiedenen vorbehandelten Kammern untersucht. Die Intensität des Fluoreszenzlichts wurde durch einen Graufilter mit einer optischen Dichte

von 1,0 abgeschwächt. Der Abstand der fokalen Ebene von der Oberfläche der Meßkammer wurde in Schritten von $2,2 \mu\text{m}$ variiert.

Zur Bestimmung der optimalen Anregungsleistung wurden Messungen mit 50 pM YxiN* Q47C Alexa488 in mit $10 \mu\text{M}$ YxiN vorbehandelten Kammern durchgeführt. Die Anregungsleistung wurde zwischen $0,5$ und $25,5 \text{ kW}\cdot\text{cm}^{-2}$ variiert und jeweils 5 Minuten lang gemessen.

Zur Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration wurden Messungen mit einer Anregungsleistung von $10,2 \text{ kW}\cdot\text{cm}^{-2}$ in mit $10 \mu\text{M}$ YxiN vorbehandelten Kammern durchgeführt. Die Konzentration von YxiN* Q47C Alexa488 wurde zwischen 1 pM und 500 pM variiert und jeweils 5 Minuten lang gemessen.

2.10.3 Auswertung

Zur Darstellung der zeitlichen Veränderung der Fluoreszenz wurde die Zahl der Photonen in einem Zeitfenster (typischerweise 10 ms) zusammengefasst und gegen die Zeit aufgetragen. Aus den Daten einzelner Photonen konnte die Verteilung der Ereignisse mit verschiedenen FRET-Effizienzen bestimmt werden. Hierzu musste die Untergrundzählrate bestimmt werden, von Fluorophoren stammende Signale mussten automatisch vom Untergrund unterschieden werden, systematische Fehler mussten korrigiert werden und letztlich konnte ein Histogramm der FRET-Effizienz erstellt werden.

Untergrundzählrate

Zur Bestimmung der Untergrundzählrate wurde für jedes Photon einer Messung eine lokale, fünf Photonen weit reichende Zählrate berechnet. Dazu wurde die Zahl der Photonen (fünf) durch den zeitlichen Abstand zwischen dem ersten und letzten Photon geteilt und die erhaltene Zählrate dem ersten Photon zugewiesen. Als Untergrundzählrate wurde dann jene Zählrate verwendet, die während der gesamten Messung am häufigsten auftrat.

Detektion von Fluorophor-Signalen

Die Unterscheidung zwischen Fluorophor-Signal und Untergrund erfolgte ebenfalls auf der Basis von lokalen Zählraten. Aus Symmetriegründen wurde für jedes Photon die lokale Zählrate einmal anhand der vier folgenden und einmal anhand der vier vorigen Photonen berechnet. Wenn eine dieser beiden lokalen Zählrate höher als das dreifache der Untergrundzählrate war, dann wurde das entsprechende Photon einem Fluorophor-Signal zugeordnet. Direkt aufeinanderfolgende Photonen, die diese Bedingung erfüllten, wurden zu

einem Ereignis zusammengefasst. Für jedes Ereignis konnte dann die Dauer, die durchschnittliche Zählrate und die Zahl der Photonen in beiden Kanälen bestimmt werden. Zur weiteren Auswertung wurden nur die Ereignisse verwendet, die auch eine gewisse Mindestzahl an Photonen, im Allgemeinen 50, enthielten.

Korrekturparameter

Die Effizienz des Energietransfers berechnet sich prinzipiell aus den Photonen, die vom Donor- bzw. Akzeptor-Fluorophor emittiert werden. Bekannt ist jedoch nur die Zahl an Photonen, die im Donor- bzw. Akzeptorkanal des Aufbaus detektiert werden. Daher ist die Einführung einiger Korrekturparameter nötig. α ist ein Maß für den Anteil an Photonen, der vom Donor emittiert, aber im Akzeptorkanal detektiert wird, den sogenannten Donor-*crosstalk*. In einer Messung mit Donorfluorophor entspricht α dem Verhältnis der im Akzeptorkanal und im Donorkanal detektierten Photonen bzw. Zählraten $I_{D,AK}$ und $I_{D,DK}$ nach der Korrektur um den Untergrund. β ist umgekehrt ein Maß für den Anteil der Photonen, der vom Akzeptor emittiert wird, aber im Donorkanal detektiert wird. Dieser Akzeptor-*crosstalk* wurde analog aus einer Messung mit Akzeptorfluorophor aus dem Verhältnis der im Donor- und Akzeptorkanal detektierten Photonen bzw. Zählraten $I_{A,AK}$ und $I_{A,DK}$ bestimmt. Für die jeweiligen Messungen wurde 10 nM YxiN* Q47C Alexa488 bzw. TMR verwendet.

Die Detektionseffizienz des Aufbaus für Donor und Akzeptor ist nicht gleich hoch. Auch die Quantenausbeute beider Farbstoffe unterscheidet sich. Der Korrekturfaktor γ berücksichtigt beide Effekte. Man erhält γ aus den Zählraten im Donor- und Akzeptorkanal (I_{DK} und I_{AK} , um den Untergrund und den *crosstalk* korrigiert) nach

$$\frac{Z_D}{Z_A} = \gamma \cdot \frac{I_{DK} - \beta \cdot I_{AK}}{I_{AK} - \alpha \cdot I_{DK}}. \quad (2.19)$$

Dabei entspricht Z_D der Zahl der Quanten, die der Donor absorbiert und nicht an den Akzeptor übertragen hat. Z_A bezeichnet die Zahl der Quanten, die der Akzeptor entweder durch direkte Anregung oder durch Übertragung vom Donor aufgenommen hat.

Zur Bestimmung von γ wurden von einer Probe die Zählraten im Donor- und Akzeptorkanal bestimmt. Für die gleiche Probe wurde ein Fluoreszenzspektrum gemessen und mit Hilfe der einzelnen Spektren von Donor und Akzeptor anhand der Fläche der Spektren der Anteil von Donor bzw. Akzeptor am Fluoreszenzspektrum der Mischung bestimmt; dieser entspricht dem Verhältnis der von Donor und Akzeptor aufgenommenen Quanten Z_D und Z_A . Zur Messung wurde eine Lösung mit 100 nM YxiN* Q47C Alexa488 und 200 nM YxiN* Q47C TMR verwendet.

Ein weiterer Störfaktor ist die direkte Anregung des Akzeptors bei der verwendeten Wellenlänge, δ . Es gilt

$$\gamma\delta = \frac{I_{A,AK}}{I_{D,DK}}, \quad (2.20)$$

wenn die Konzentrationen der Farbstoffe für die Messung der beiden Zählraten identisch sind. Für die Messung wurden jeweils 10 nM YxiN* Q47C Alexa488 bzw. TMR verwendet. Bei Berücksichtigung von δ erhält man die modifizierten Korrekturfaktoren

$$\alpha' = \frac{\alpha + \gamma\delta}{1 + \beta\gamma\delta} \quad (2.21a)$$

$$\gamma' = \frac{\gamma + \gamma\delta}{1 + \beta\gamma\delta}. \quad (2.21b)$$

Berechnung der FRET-Histogramme

Sind die Korrekturparameter alle bekannt, so kann die FRET-Effizienz berechnet werden:

$$E_{FRET} = \left(1 + \gamma' \frac{I_D - \beta I_A}{I_A - \alpha' I_D}\right)^{-1} \quad (2.22)$$

Für jedes gemessene Ereignis wurde die mittlere Transfereffizienz berechnet. Die Transfereffizienzen wurden in Schritten von 0,05 zusammengefasst und in einem Histogramm aufgetragen. In diesen Histogrammen konnten im Allgemeinen mehrere Maxima ausgemacht werden. Zur Bestimmung der Lage der Maxima wurden Gauß-Funktionen an die Daten angepasst.

Aus den FRET-Effizienzen kann der Abstand der Fluorophore R bestimmt werden. Es gilt

$$E = \frac{R_0^6}{R^6 + R_0^6} \quad (2.23)$$

Dabei ist R_0 der Förster-Abstand, dessen Bestimmung in Kapitel 2.6.3 beschrieben wurde.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Auswahl der Positionen zur Fluoreszenzmarkierung

Der Energietransfer zwischen zwei Farbstoffen ermöglicht die Beobachtung von Abständen und Abstandsänderungen in Proteinen. In dieser Arbeit wurde die RNA-Helikase YxiN untersucht. Für Einzelmolekül-FRET-Experimente wurden Alexa Fluor 488 (Alexa488) als Donor und Tetramethylrhodamin (TMR) als Akzeptor über Maleimid an Cysteine in YxiN eingebracht.

Liegen natürliche Cysteine an der Oberfläche eines Proteins, so können sie mit den Farbstoffen reagieren und eine gezielte Markierung an hierfür eingeführten Cysteinen verhindern. Ein Sequenzvergleich von YxiN mit dem homologen Protein DbpA aus *E. coli* zeigte, dass von den vier natürlichen Cysteinen die beiden an Position 243 und 247 konserviert sind. Böddeker *et al.* (1997) haben vermutet, dass diese Cysteine in DbpA Teil eine Zinkfinger-Motivs sein könnten. Daher wurde angenommen, dass sie eventuell nicht vom Lösungsmittel aus zugänglich sind. Untersuchungen von YxiN mit Ellmans Reagenz (vgl. Abschnitt 3.7.1) bestätigten diese Annahme. Daher wurden die Positionen 61 und 267 zu Serin mutiert. Cysteine an diesen Positionen wurden zusätzlich auf ihre Eignung zur Markierung untersucht. Da YxiN C61S C267S keine zugänglichen Cysteine mehr enthält, wurde diese Mutante als Ausgangsmutante für die Einführung weiterer Cysteine zur Fluoreszenzmarkierung von YxiN verwendet. YxiN C61S C267S wird im Folgenden als YxiN* abgekürzt.

Für die Reaktion mit Farbstoffen müssen Cysteine lösungsmittelzugänglich sein, also an der Oberfläche des Proteins liegen. Von YxiN ist jedoch keine Struktur bekannt, die die Auswahl solcher Positionen ermöglicht hätte. Daher wurde als Anhaltspunkt anhand der Kristallstruktur des Translations-Initiationsfaktors eIF4A aus *Saccharomyces cerevisiae* ein

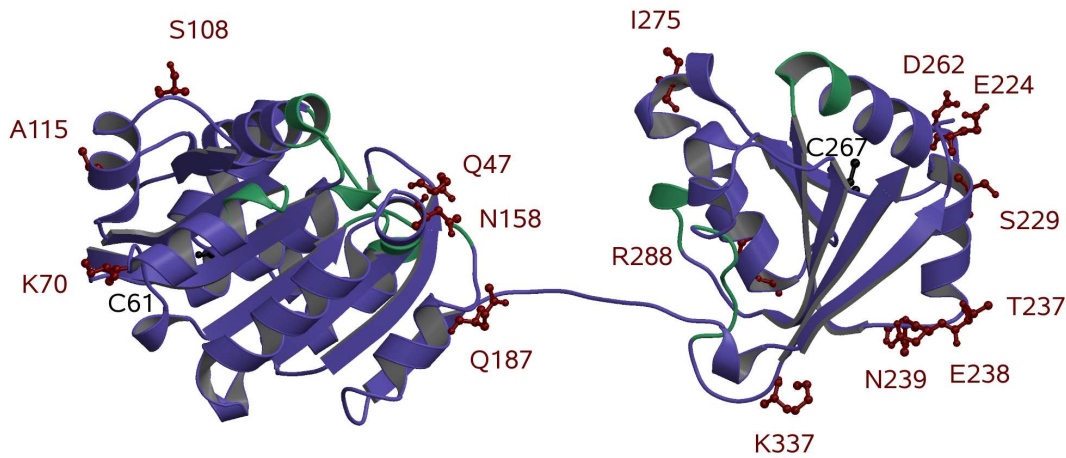


Abbildung 3.1: Homologiemodell von YxiN nach der Kristallstruktur des Initiationsfaktor eIF4A (Caruthers et al., 2000, PDB-Code 1FUU:B). Das Modell umfasst die Aminosäuren 4 bis 353 von YxiN. Die konservierten Motive sind grün gekennzeichnet. Die beiden Domänen werden durch einen flexiblen Linker verbunden, der in diesem Modell in einer sehr gestreckten Form vorliegt. Die Aminosäuren an den Positionen für die Einführung von Cysteinen sind als rotes Kugel-Stab-Modell dargestellt. Die beiden im Wildtyp vorhandenen und zugänglichen Cysteine sind als schwarzes Kugel-Stab-Modell eingezeichnet. Das Homologiemodell wurde mit 3D-JIGSAW (Bates et al., 2001) und die Abbildung mit Molscrip (Kraulis, 1991) erstellt und mit Raster3d (Merritt und Bacon, 1997) gerendert.

Homologiemodell erstellt, das die beiden Helikase-Domänen umfasst (Abbildung 3.1). Auf der Grundlage dieses Modells wurden Positionen für die ortsgerichtete Mutagenese ausgesucht, die an der Oberfläche liegen und zu keinem der konservierten Helikase-Motive gehören. In der N-terminalen Domäne wurden hierfür die Aminosäuren Q47, K70, S108, A115, N158 und Q187 ausgesucht, in der C-terminalen Helikasedomäne die Aminosäuren E224, S229, T237, E238, N239, I275, R288 und K337. Diese sind in Abbildung 3.1 als Kugel-Stab-Modell gezeigt. YxiN-Mutanten ohne die Cysteine in Position 243 und 247, aber mit einem potentiell zugänglichen Cystein an diesen Positionen, wurden gereinigt und untersucht.

3.2 Reinigung von YxiN Mutanten

YxiN wurde von einem pET-M30 Vektor als Fusionsprotein mit der Glutathion-S-Transferase in *E. coli* Rosetta oder BL21(DE3)RP produziert. Für alle Mutanten konnte die Produktion eines Proteins mit dem erwarteten Molekulargewicht von 77 kDa beobachtet werden. Der Aufschluß der Zellen erfolgte mittels Ultraschall oder mit einem Mikrofluidizer. Der Verlauf der Reinigung ist in Abbildung 3.2 am Beispiel von YxiN* Q47C gezeigt. Als erster Reinigungsschritt wurde Affinitätschromatographie an einer Glutathion-Säule verwendet,

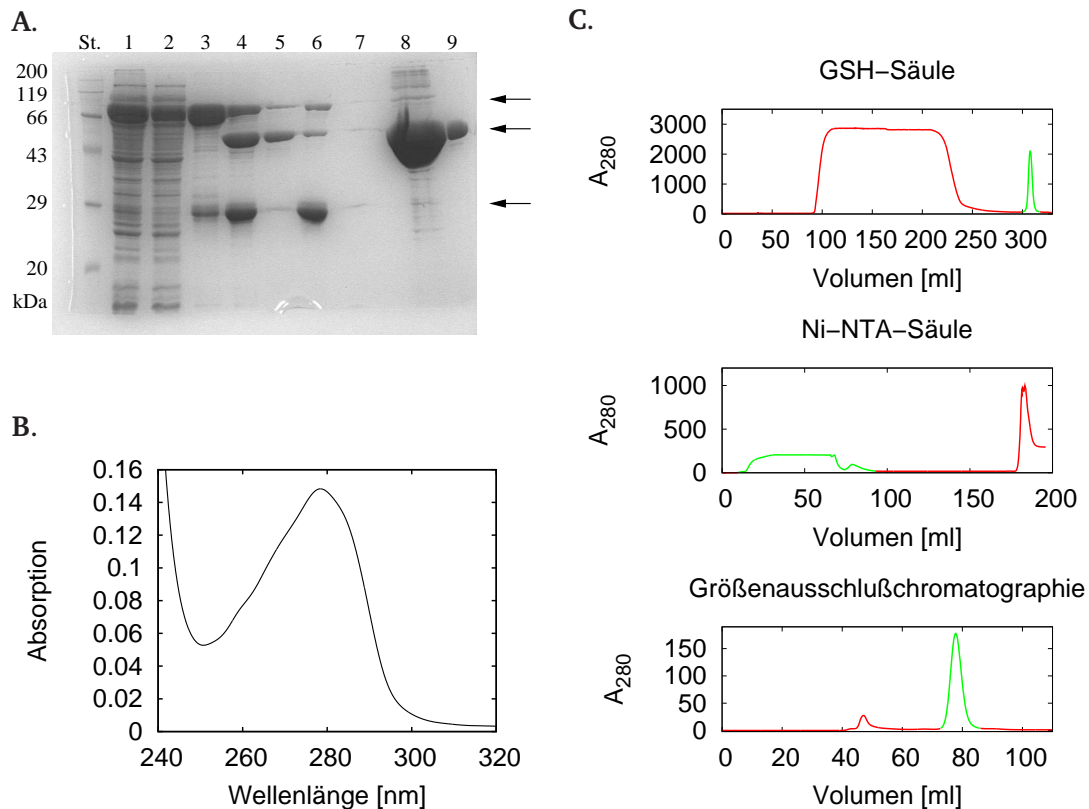


Abbildung 3.2: Reinigung von YxiN* Q47C.

A. SDS-Gel der verschiedenen Schritte der Reinigung. St.: Proteinstandard, die zugehörigen Molekulargewichte in kDa sind links angegeben; 1: Rohextrakt; 2 und 3: Durchbruch und Eluat der Glutathion-Säule; 4: nach Spaltung mit TEV-Protease; 5 und 6: Durchbruch und Eluat der Nickel-Säule; 7 und 8: Überstand und resuspendiertes Pellet der Ammoniumsulfat-Fällung; 9: gereinigtes Protein. Der oberste Pfeil zeigt die Position des Fusionsproteins (77 kDa). Dieses befand sich im Eluat der Glutathion-Säule. Nach der Spaltung ist freies YxiN (mittlerer Pfeil, 54 kDa) und die Glutathion-S-Transferase (unterer Pfeil, 23 kDa) zu erkennen. YxiN fand sich im Durchbruch der Nickel-Säule und wurde durch die Ammoniumsulfatfällung stark konzentriert. Nach der Größenausschlußchromatographie lag das Protein mit einer Reinheit von über 95% vor.

B. Absorptionsspektrum von YxiN* Q47C. Das Maximum liegt bei 278 nm. Die Messung erfolgte in 50 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 2 mM β -Mercaptoethanol, pH 8,5 bei einer Konzentration von 6,2 μ M.

C. Chromatogramme der Säulenläufe der Reinigung. In grün ist jeweils der Bereich gezeichnet, der für den nächsten Schritt verwendet wurde.

die das Fusionsprotein bindet. Anschließend wurde das eluierte YxiN mit der TEV-Protease gespalten. Die Glutathion-S-Transferase sowie die Protease, die beide sechs N-terminale Histidine besitzen, wurden vom gespaltenen YxiN mit einer Nickel-Säule getrennt.

Die Reinigung von YxiN über Kationenaustauschchromatographie ist bereits beschrieben (Kossen und Uhlenbeck, 1999) und wurde mit einer Resource S Säule durchgeführt. Das gespalte Fusionsprotein war jedoch sehr empfindlich gegenüber geringen Salzkonzentrationen und neigte bei der für die Bindung notwendigen Konzentration von 100 mM

NaCl zu starker Aggregation. Daher wurde stattdessen das nach der Nickel-Säule erhaltene freie YxiN mittels Ammoniumsulfatfällung konzentriert und anschließend durch Größenausschlußchromatographie gereinigt. Dabei eluierte YxiN als Monomer.

Die Gelelektrophorese (Abb. 3.2 A., Bahn 9) zeigte, dass das gereinigte YxiN keine Verunreinigungen mit anderen Proteinen enthielt. In dem Absorptionsspektrum (Abb. 3.2 B.) sind keine Verunreinigungen mit Nukleinsäure zu erkennen, die bei 260 nm absorbieren. Die Konzentration von YxiN wurde mit dem nativen Extinktionskoeffizienten von $23540 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei 280 nm berechnet.

Die optimierte Reinigung wurde bei 4°C in 50 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 2 mM β -Mercaptoethanol, pH 8,5 durchgeführt. Der Zellaufschluß erfolgte im Allgemeinen mit dem Ultraschallstab. In Tabelle 3.1 sind für jedes gereinigte Protein die erzielte Ausbeute und Abweichungen von diesen Bedingungen angegeben. Alle YxiN Mutanten wurden mit einer Reinheit von mindestens 95 % lt. SDS-PAGE erhalten.

3.3 *in-vitro*-Transkription

Die RNA-Sequenz, die von YxiN gebunden wird, liegt im Peptidyltransferasezentrum der 23S rRNA (Kossen und Uhlenbeck, 1999). Für die Messungen in dieser Arbeit wurden zum einen zwei kurze, synthetisch hergestellte RNA-Stränge (32b Fragment und 9b Fragment, Abb. 3.3 A.) und zum anderen ein durch *in-vitro*-Transkription hergestelltes 154b Fragment (Abb. 3.3 B.) verwendet. In Abbildung 3.3 C. ist die transkribierte RNA im Acrylamidgel gezeigt. Es entstanden zwei Produkte. Das obere entspricht dem gewünschten 154b Fragment. Das untere Fragment entstand vermutlich dadurch, dass die T7-RNA-Polymerase nicht nur an den eingefügten Promotor, sondern auch innerhalb der Zielsequenz binden kann. Diese enthält die nach Ikeda *et al.* (1992) für den T7-RNA-Polymerase-Promotor notwendige Sequenz G \times CTC. Das daraus resultierende Fragment hätte eine Länge von 88 Basen und ist in Abbildung 3.3 B. in grün dargestellt. Beide Fragmente konnten aus dem Gel getrennt extrahiert werden.

3.4 Proteinfluoreszenz von wildtypischem YxiN

Die Fluoreszenzemission von Tryptophan gibt Auskunft über die Einbindung in dreidimensionale Strukturen und damit über die Faltung des Proteins. Abbildung 3.4 zeigt das Fluoreszenzspektrum von YxiN wt in nativer Form und nach Denaturierung mit Harnstoff bzw. Guanidiniumchlorid (GdmCl). Im nativen Protein ist nur ein Fluoreszenzmaximum bei

Tabelle 3.1: Liste aller gereinigten YxiN Mutanten. Die Ausbeute jeder Reinigung und Abweichungen von den optimierten Bedingungen (4°C, 50 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 2 mM β -Mercaptoethanol, pH 8,5, Zellaufschluß mit Ultraschallstab) sind angegeben. Die Auswahl der Mutanten mit einem potentiell zugänglichen Cystein ist in Abschnitt 3.1 beschrieben, die der Mutanten mit zwei potentiell zugänglichen Cysteinen in Abschnitt 3.9.2.

| Protein | Ausbeute [mg/1 Zellkultur] | Bedingungen |
|------------------|-------------------------------|----------------------------|
| YxiN wt | 7,0 | pH 7,5, RT, Mikrofluidizer |
| | 1,8 | |
| YxiN C61S | 4,8 | pH 7,5, RT |
| YxiN C267S | 1,3; 1,6 | |
| YxiN* | 2,4 | pH 7,5, RT, Mikrofluidizer |
| | 1,9; 3,8 | |
| ” Q47C | 3,2 | RT |
| | 1,2 | |
| ” K70C | 0,3 | |
| ” S108C | 2,3 | pH 7,5, RT, Mikrofluidizer |
| ” A115C | 1,3 | RT, Mikrofluidizer |
| | 2,1 | |
| ” N158C | 1,5 | RT, Mikrofluidizer |
| ” Q187C | 2,9 | |
| ” E224C | 0,9 | |
| ” S229C | 2,1 | |
| ” T237C | 0,4 | |
| ” E238C | 2,0 | pH 7,5, RT, Mikrofluidizer |
| ” N239C | 1,1 | RT, Mikrofluidizer |
| ” D262C | 0,9 | |
| ” I275C | 1,1 | |
| ” R288C | 4,3 | RT, Mikrofluidizer |
| ” K337C | 0,8 | pH 7,5, RT, Mikrofluidizer |
| ” K337C | 1,7 | |
| YxiN C61S Q47C | 0,9; 2,0 | |
| YxiN C267S K337C | 3,8; 8,0 | |
| YxiN* Q47C E238C | 1,4 | |
| ” ” N239C | 2,4 | |
| ” ” I275C | 1,4; 2,1 | |
| ” ” K337C | 2,3 | |
| ” S108C E224C | 1,0 | |
| ” ” S229C | 0,8 | |
| ” ” I275C | 0,9 | |
| ” ” K337C | 0,1 | |
| ” A115C E224C | 2,7 | |
| ” ” S229C | 0,9 | |
| ” ” D262C | 0,6 | |
| ” ” K337C | 0,4 | |
| ” N158C I275C | 0,3 | |
| YxiN S182A T184A | 1,8 | |

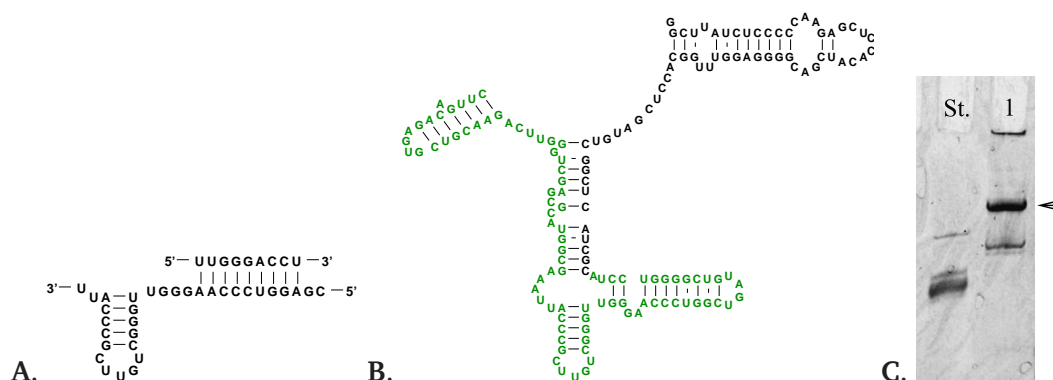


Abbildung 3.3: RNA-Substrate.

A. RNA-Substrat für Helikase-Aktivitätsmessungen. Der 32b Strang entspricht der Sequenz von Helix 92 im Peptidyltransferasezentrum der 23S rRNA und dessen Verlängerung in 5'-Richtung. Der 9b Strang ist dazu komplementär. Der gebildete Doppelstrang ist bei Raumtemperatur noch stabil; die Entwindung von drei Basenpaaren sollte jedoch ausreichen, um den Einzelstrang freizusetzen (Diges und Uhlenbeck, 2001).

B. 154b RNA Fragment. Diese RNA wurde für ATP-Hydrolysemessungen und Einzelmolekülmessungen verwendet und umfasst die Helices 89 bis 93 der 23S rRNA aus *Bacillus subtilis*. In grün gezeigt ist das 88b Fragment, das vermutlich dem zweiten, kleineren RNA-Fragment entspricht, das in der in-vitro-Transkription entsteht.

C. Mit Ethidiumbromid gefärbte RNA nach der in-vitro-Transkription in einem denaturierenden Polyacrylamidgel. St.: tRNA als Standard, Länge 75 Basen. 1: in-vitro-Transkriptions-Reaktion. Die obere Bande (Pfeil) entspricht dem 154b Fragment, die untere Bande ist ein kürzeres Fragment, das bei der Transkription in unterschiedlichem Ausmaß entstand.

305 nm zu beobachten. Ein zweites Maximum bei einer höheren Wellenlänge tritt erst nach der Denaturierung auf. Vermutlich ist die Fluoreszenz des einzelnen Tryptophans durch eine sehr hydrophobe Umgebung stark blauverschoben und kann nicht von der Fluoreszenz der zwölf Tyrosine unterschieden werden. Eventuell wird die Tryptophanfluoreszenz im nativen YxiN auch durch Aminosäureseitengruppen gelöscht. (Chen und Barkley, 1998). Beide Effekte sind zwar selten, werden aber beobachtet (Lakowicz, 1992).

3.5 Substratbindung

Die ATP-abhängige RNA-Helikase YxiN bindet und hydrolysiert ATP, um die freiwerdende Energie zur Entwindung der RNA zu nutzen. YxiN muss also sowohl RNA als auch Adeninukleotide binden können.

3.5.1 Nukleotidbindung

Die Nukleotidbindung wurde über Fluoreszenz-Gleichgewichts-Titration mit dem fluoreszierenden Nukleotidanalogen mantADP untersucht. Zunächst wurde durch direkte Titra-

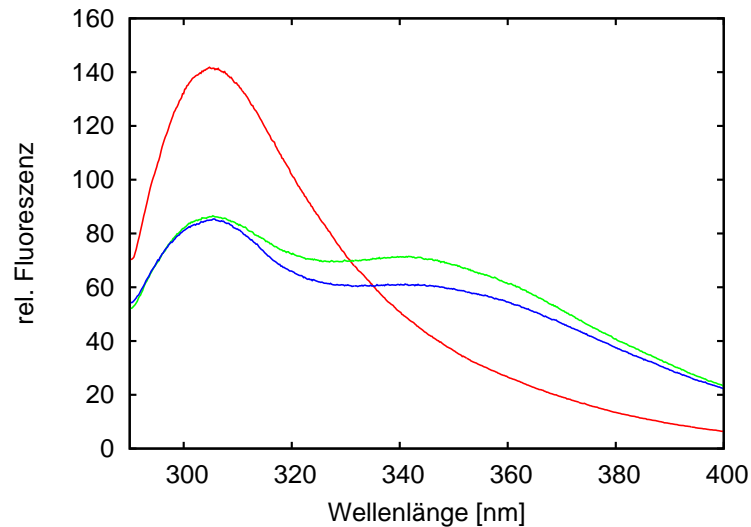


Abbildung 3.4: Fluoreszenzspektren von YxiN wt. Das Spektrum des nativen Proteins (rot) zeigt nach Anregung bei 280 nm ein Fluoreszenzmaximum bei 305 nm. Nach Denaturierung mit 8 M Harnstoff (grün) oder 6 M GdmCl (blau) erscheint ein zweites Maximum bei höheren Wellenlängen. Gemessen wurden 1 μ M Proteinlösungen in 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5 bei 25°C.

tion die Dissoziationskonstante des mantADP-YxiN-Komplexes bestimmt. Die Dissoziationskonstanten der Komplexe von YxiN mit ADP, ATP, ATP γ S und AMPPNP wurden über Verdrängungstitration bestimmt. Da die ATPase-Aktivität von YxiN in Abwesenheit von RNA sehr gering ist, ist eine Titration auch mit ATP möglich. In Abbildung 3.5 ist exemplarisch die Titration von mantADP mit YxiN wt und die anschließende Verdrängungstitration mit ATP gezeigt. Die Dissoziationskonstanten für die Komplexe mit mantADP, ADP und ATP wurden auch für YxiN* bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Tabelle 3.2: Dissoziationskonstanten der YxiN-Nukleotid-Komplexe. Die Bindung wurde mit Fluoreszenz-Gleichgewichtstiteration mit mant-ADP untersucht. In Abbildung 3.5 ist exemplarisch die Titration von YxiN wt mit mantADP und die Verdrängung mit ATP bei 20°C gezeigt. Alle weiteren Messungen erfolgten analog.

| Nukleotid | Temperatur | Dissoziationskonstante [μ M] | |
|----------------|------------|-----------------------------------|----------------|
| | | YxiN wt | YxiN* |
| mantADP | 20°C | 17,9 \pm 1,4 | |
| | 25°C | 18,5 \pm 2,0 | 21,5 \pm 5,0 |
| ADP | 20°C | 70 | 74 |
| | 25°C | 81 | |
| ATP | 20°C | 310 | 920 |
| ATP γ S | 20°C | 370 | |
| AMPPNP | 20°C | >1000 | |

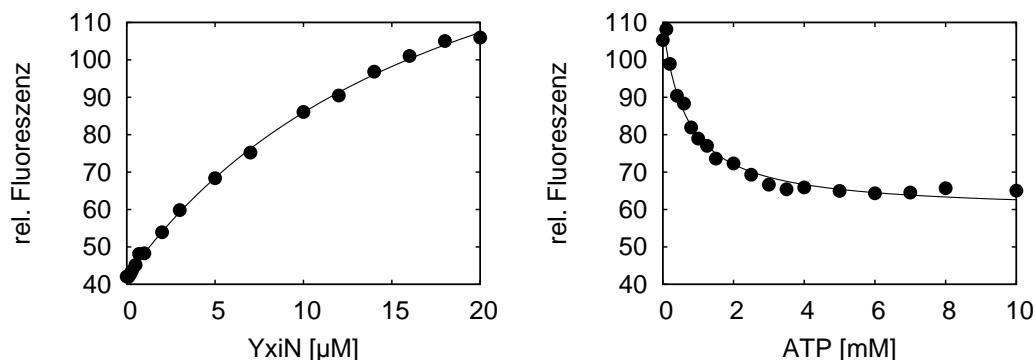


Abbildung 3.5: Fluoreszenz-Gleichgewichts-Titration. 1 μM mantADP wurde mit YxiN wt bis zu einer Konzentration von 20 μM titriert. Anschließend wurde das fluoreszierende Nukleotid durch steigende Konzentrationen von ATP wieder verdrängt. Die Messungen erfolgten bei 20°C in 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,5. Die Emission bei 430 nm wurde nach Anregung bei 365 nm gemessen. Die Dissoziationskonstante für den Komplex aus YxiN und mantADP beträgt 17,9 μM , für den Komplex aus YxiN und ATP 310 μM .

Die Messungen wurden zunächst bei 25°C durchgeführt. Da jedoch das Protein zur Aggregation neigte, wurde die Temperatur auf 20°C gesenkt. Vergleichende Messungen mit YxiN wt bei verschiedenen Temperaturen zeigten keinen signifikanten Unterschied in den Dissoziationskonstanten für die Komplexe mit mantADP und ADP. Der mant-ADP-YxiN-Komplex hat einen deutlich geringeren K_D (18 μM) als der ADP-YxiN-Komplex (75 μM). In Abwesenheit von RNA ist der K_D des ATP-YxiN-Komplexes mit 310 μM noch höher. Zwischen YxiN wt und YxiN* gibt es nur geringe Unterschiede in der Bindung von mantADP und ADP. Die Messung der Bindung von ATP durch YxiN* wurde auch bei 20°C durch Aggregation gestört, so dass der ermittelte Wert von 920 μM stärker fehlerbehaftet ist. Die Bindung des nicht hydrolysierbaren ATP-Analogons ATP γ S durch YxiN wt war ähnlich wie die von ATP, während AMPPNP kaum gebunden wurde. Daher wurde für Einzelmoleküluntersuchungen ATP γ S eingesetzt.

3.5.2 RNA-Bindung

Zur Untersuchung der RNA-Bindung wurde die bereits in Abbildung 3.3 A gezeigte kurze doppelsträngige RNA verwendet. 100 nM der am 5'-Ende des 32b-Stranges mit Fluoreszein markierten RNA wurde mit TMR-markiertem YxiN* Q47C titriert (zur Markierung vgl. Kap. 3.9.1). Energietransfer von Fluoreszein zu TMR bei der Bindung sollte zu einer Abnahme der Fluoreszenz des Donors führen. Abbildung 3.6 A zeigt, dass dies nicht beobachtet werden konnte; stattdessen ist ein Anstieg zu sehen, der vermutlich direkt aus der Wechselwirkung der RNA mit dem Protein resultiert. Allerdings ist die Dissoziationskonstante des

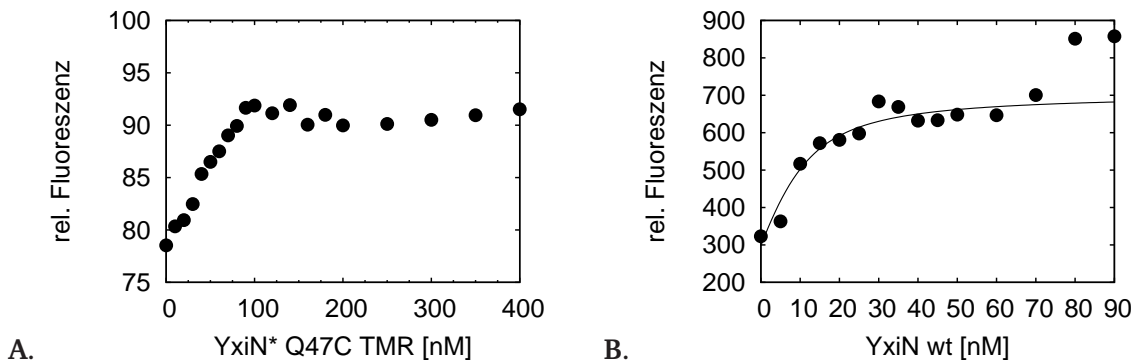


Abbildung 3.6: Bindung von RNA durch YxiN.

A. Titration von 100 nM fluoreszenzmarkierter RNA mit TMR markiertem YxiN* Q47C. RNA wird mit einer Stöchiometrie von 1:1 gebunden.

B. Titration von 10 nM fluoreszenzmarkierter RNA mit YxiN wt. Aufgrund der leichten Trübung der Lösung gegen Ende der Messung wurden die beiden letzten Punkte vom Fit ausgenommen. Die erhaltene Dissoziationskonstante beträgt $5,0 \pm 2,4$ nM.

Die RNA bestand aus dem unmarkierten 9b-Strang und dem am 5'-Ende mit Fluoreszein markierten 32b-Strang. Die Messungen erfolgten bei 25°C in 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM β-Mercaptoethanol, pH 7,5. Die Anregung erfolgte bei 493 nm, die Emission wurde bei 525 nm gemessen.

RNA-Protein-Komplexes so niedrig, dass sie bei den verwendeten Konzentrationen nicht bestimmt werden konnte. Es ist lediglich zu erkennen, dass der Anstieg bis etwa 100 nM YxiN linear verläuft und dann endet. Die Bindungsstöchiometrie beträgt also 1:1.

In Abbildung 3.6 B ist die Titration des gleichen Substrats in einer geringeren Konzentration (10 nM) mit unmarkiertem YxiN wt zu sehen. Auch hier kann ein Anstieg der Fluoreszenz bei Proteinbindung beobachtet werden. Die Werte dieser Messung schwanken aufgrund der geringen Konzentration deutlich; gegen Ende wurde eine leichte Trübung der Lösung beobachtet. Daher wurden für die Berechnung der Kurve die letzten zwei Werte nicht mehr berücksichtigt. Es wurde eine Dissoziationskonstante von $5,0 \pm 2,4$ nM erhalten. Dieser Wert stimmt gut mit dem in der Literatur beschriebenen Wert von 4,6 nM überein, der aus einem Gelretardationsexperiment bestimmt wurde (Karginov *et al.*, 2005).

Das RNA-Substrat wird von YxiN also stark gebunden. Die Bindung von Adeninnukleotiden ist etwa vier Größenordnungen schwächer und hängt von der Art des untersuchten Nukleotids ab.

3.6 Thermische Stabilität

Die Einführung von Mutationen kann die Struktur und die Funktion eines Proteins beeinträchtigen. Ein Indikator dafür ist die Stabilität. Daher wurde die thermische Entfaltung von

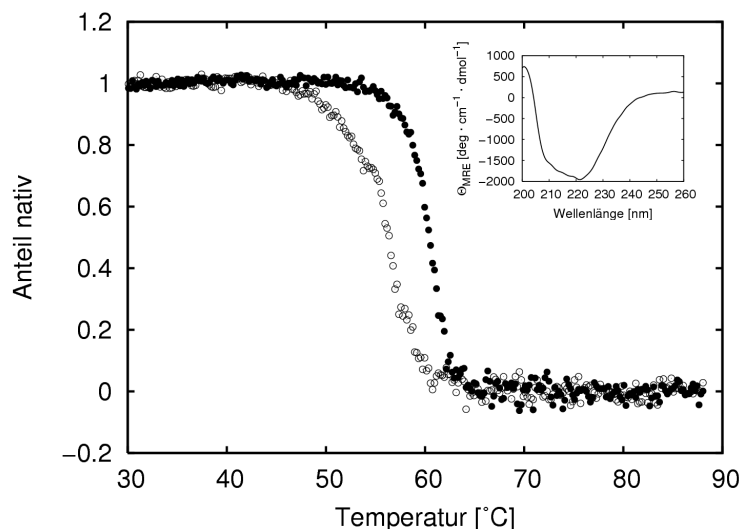


Abbildung 3.7: Thermische Denaturierung von YxiN wt (●) und YxiN* (○). Der Wildtyp liegt bei 60°C zu 50% entfaltet vor; die Mutante erreicht diesen Punkt bereits bei 56°C. Gemessen wurden 1 μM Proteinlösungen in 100 mM Natriumphosphat, 500 mM NaCl, 100 μM TCEP, 100 μM EDTA, pH 7,5, bei einer Wellenlänge von 222 nm. In klein eingefügt ist das CD-Spektrum von YxiN wt in 10 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, pH 7,5 bei 25°C.

YxiN-Mutanten anhand von Circular dichroismus beobachtet. Die von den Sekundärstrukturelementen eines Proteins erzeugte Elliptizität im fernen UV verschwindet bei der Entfaltung. In Abbildung 3.7 ist die thermische Entfaltung von YxiN wt und YxiN* gezeigt. Der Mittelpunkt der Entfaltung des Wildtyps liegt bei 60°C. Die Entfernung der beiden zugänglichen Cysteine führt zu einer leichten Destabilisierung um 4°C. Eine thermodynamische Analyse ist nicht möglich, da die Entfaltung nicht reversibel ist und das Protein im Laufe der Entfaltung aggregiert.

Die Einführung zusätzlicher Cysteine führte nur zu geringen Änderungen der Stabilität. Eine Liste der Mittelpunkte der Entfaltung ist in Tabelle 3.3 aufgeführt. Die Werte variieren zwischen 54°C und 58°C und entsprechen damit gut der Stabilität der Ausgangsmutante ohne zugängliche Cysteine (56°C). Die einzige Ausnahme bildet E238; die Einführung eines Cysteins an dieser Position führt zu einer Erniedrigung der Stabilität auf 51°C. Alle YxiN Mutanten liegen also im Temperaturbereich zwischen 20°C und 37°C, in dem die Messungen durchgeführt wurden, in nativer Form vor.

3.7 Reaktivität der Cysteine

Cysteine für die Reaktion mit Farbstoffen müssen vom Lösungsmittel aus zugänglich sein. Deswegen wurden anhand des Homologiemodells von YxiN Positionen ausgewählt, die an

Tabelle 3.3: Eigenschaften von YxiN Mutanten. Als Maß für die thermische Stabilität sind die Mittelpunkte der Entfaltung angegeben. Gemessen wurden 1 μM Proteinlösungen in 100 mM Natriumphosphat, 500 mM NaCl, 100 μM TCEP, 100 μM EDTA, pH 7,5, bei einer Wellenlänge von 222 nm. Die Zugänglichkeit der Cysteine für DTNB wurde in 50 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0, bestimmt. Die Reaktivität mit TMR-Maleimid wurde anhand von Markierungskinetiken bei 15°C in 50 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 1 mM TCEP, pH 7,5, bestimmt (- keine Reaktion über Nacht; + schwache Reaktion; ++ Reaktion über Nacht abgeschlossen; +++ sehr schnelle Reaktion).

| Protein | Mittelpunkt | zugängliche Cysteine je Protein | Reaktivität mit TMR-Maleimid |
|------------|-------------|------------------------------------|---------------------------------|
| YxiN wt | 60°C | 1,7 | + |
| YxiN C61S | 58°C | 0,8 | - |
| YxiN C267S | 59°C | 0,7 | + |
| YxiN* | 56°C | 0,2 | - |
| YxiN* Q47C | 56°C | 0,7 | ++ |
| ” K70C | 54°C | 0,1 | - |
| ” S108C | 56°C | 0,1 | ++ |
| ” A115C | 56°C | 0,1 | ++ |
| ” N158C | 56°C | 0,2 | + |
| ” Q187C | 56°C | 0,2 | - |
| ” E224C | 54°C | 0,2 | +++ |
| ” S229C | 55°C | 0,6 | ++ |
| ” T237C | 55°C | n.b. | - |
| ” E238C | 51°C | 0,6 | - |
| ” N239C | 55°C | 0,9 | - |
| ” D262C | 56°C | 0 | + |
| ” I275C | 58°C | 0,1 | ++ |
| ” R288C | 55°C | 0,0 | - |
| ” K337C | 55°C | 0,9 | - |

der Oberfläche liegen sollten (Abschnitt 3.1). Die tatsächliche Zugänglichkeit der Cysteine an diesen Positionen wurde anschließend überprüft.

3.7.1 Zugänglichkeit für Ellmans Reagenz

Ein Test für die Zugänglichkeit von Cysteinen ist die Reaktion mit Ellmans Reagenz, Dithionitrobenzoat (Ellman, 1959). DTNB bildet mit Cysteinen ein gemischtes Disulfid. Anhand der Absorption des dabei entstehenden Thionitrobenzoats kann die Konzentration an Cysteinen und damit die Zahl der zugänglichen Cysteine pro Protein bestimmt werden. In Tabelle 3.3 sind die Ergebnisse für die verschiedenen YxiN-Mutanten mit einem potentiell zugänglichen Cystein gezeigt. Im Wildtyp sind zwei der vier vorhanden Cysteine zugänglich. Werden die Cysteine an Position 61 und 267 durch Serin ersetzt, werden keine zugäng-

lichen Cysteine detektiert. Die Werte der Mutanten mit einem potentiell zugänglichen Cystein variieren zwischen 0 und 0,9. Mit diesem Test wurden Cysteine an den Positionen 61, 267, 47, 229, 238, 239 und 337 als reaktiv identifiziert.

3.7.2 Zugänglichkeit für Farbstoffe

Die Reaktivität mit dem kleinen DTNB-Molekül muss nicht notwendigerweise die Reaktivität mit dem Maleimid der Farbstoffe widerspiegeln. Daher wurde die Kinetik der Reaktion der YxiN-Mutanten mit den Farbstoffen untersucht. In Abbildung 3.8 ist als Beispiel die Reaktion von YxiN* A115C mit TMR-Maleimid und Alexa488-Maleimid gezeigt. Der Farbstoff reagierte bei verschiedenen Temperaturen gut mit dieser Mutante, die bei der Messung mit DTNB kaum Reaktivität gezeigt hatte. Die Reaktion erfolgte mit TMR und Alexa488 mit vergleichbarer Effizienz und war nach drei Stunden noch nicht abgeschlossen.

Eine Einschätzung der Reaktivität der Cysteine mit Farbstoff in den verschiedenen YxiN-Mutanten aufgrund der Markierungskinetik mit TMR-Maleimid ist in Tabelle 3.3 angegeben. Diese Einschätzung resultiert aus Untersuchungen bei 15°C. Eine Erhöhung der Temperatur von 15°C auf 30°C führte zu einer geringen Verbesserung der Reaktionsgeschwindigkeit. Ein Senken der Temperatur auf 4°C führte zu einer deutlichen Verringerung der Re-

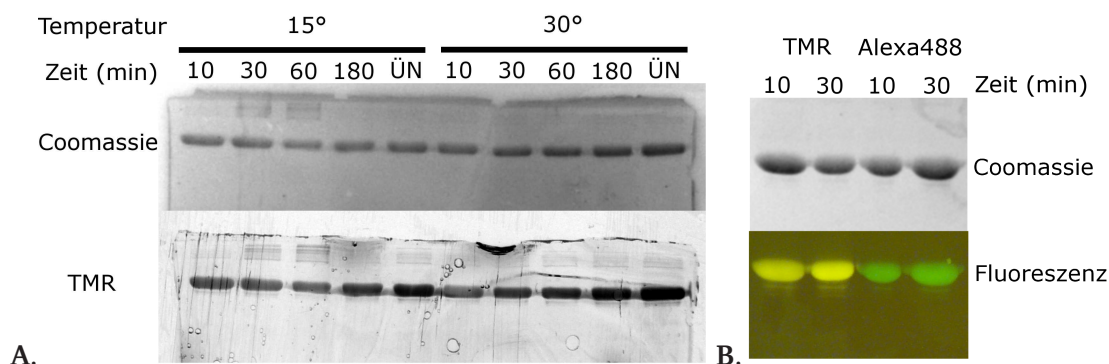


Abbildung 3.8: Kinetik der Reaktion von YxiN* A115C mit Maleimid.

A. Reaktion mit einem fünffachen Überschuss TMR-Maleimid bei 15°C und 30°C. Gezeigt ist oben das mit Brilliant Blau R250 gefärbte Gel, auf dem die Banden des Proteins zu erkennen sind. Unten ist dasselbe Gel vor Färbung und bei Anregung mit UV-Licht zu sehen. Die Position der fluoreszierenden Banden stimmt mit der Position der Proteinbanden überein. Die Intensität der Fluoreszenz ist ein Maß für den Grad der Markierung. Die Reaktion fand in 50 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 1 mM TCEP, pH 7,5, statt und war bei beiden Temperaturen erst über Nacht abgeschlossen.

B. Reaktion mit TMR-Maleimid und Alexa488-Maleimid im Vergleich. Hier wurde die Fluoreszenz direkt fotografiert und nicht in Graustufen umgewandelt. Es ist ein deutlicher Unterschied in der Farbe der Fluoreszenz von TMR und Alexa488 zu erkennen. Die rote Fluoreszenz des TMR erscheint aufgrund der Filter der Geldokumentation, die das Anregungslicht blocken sollen, gelb. Die Reaktion fand in 50 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 1 mM TCEP, pH 7,5, mit einem fünffachen Überschuss an Farbstoff statt.

aktivität; eine Ausnahme hiervon ist YxiN* I275C. Diese Mutante reagierte bei 4°C ähnlich gut wie bei 15°C. Nur eine der untersuchten Mutanten (E224C) zeigte eine sehr schnelle Reaktion, die nach zehn Minuten abgeschlossen war. Die Cysteine Q47C, S108C, A115C, S229C und I275C zeigten eine langsamere Reaktion, die über Nacht abgeschlossen war. Die relative Geschwindigkeit dieser Reaktionen ist nur schwer einzuschätzen, da keine objektive Quantifizierung der Fluoreszenz möglich war. Mit den Cysteinen C61, N158C und D262C war auch über Nacht nur eine schwache Reaktion zu erkennen; die anderen Positionen zeigten keine Reaktion.

Ein Vergleich der Reaktivität der Cysteine mit DTNB und mit TMR-Maleimid zeigt, dass die Ergebnisse nicht übereinstimmen (vgl. Tabelle 3.3). Für die Markierung von YxiN mit Alexa488 und TMR sollte die Farbstoffmarkierungskinetik die bessere Referenz sein. Von den 17 untersuchten Positionen eignen sich sechs für die Markierung.

3.8 Aktivität

Die RNA-Helikase YxiN nutzt Energie aus der Hydrolyse von ATP, um RNA-Doppelstränge zu entwinden. Sowohl die ATP-Hydrolyse als auch die RNA-Entwindung wurden untersucht.

3.8.1 ATPase-Aktivität

Die RNA-abhängige ATPase-Aktivität wurde mit einem gekoppelten spektroskopischen Test beobachtet. Dabei wird die Hydrolyse von ATP durch die Enzyme Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase an die Oxidation von NADH gekoppelt. Diese kann durch die sinkende Absorption bei 340 nm verfolgt werden.

Abbildung 3.9 zeigt die Temperaturabhängigkeit der ATP-Hydrolyserate von YxiN wt. In Abwesenheit von RNA ist kaum ATP-Hydrolyse zu beobachten. Die deutlich höhere Hydrolyserate in Gegenwart von 150 nM RNA zeigt starke Temperaturabhängigkeit. Das Maximum liegt zwischen 30°C und 40°C, bei 25°C ist weniger als die Hälfte des Maximalwerts erreicht. Daher wurden alle weiteren ATP-Hydrolysetests bei 37°C durchgeführt.

In Abbildung 3.10 ist die ATP- und RNA-Abhängigkeit der ATPase-Aktivität von YxiN wt und YxiN* im Vergleich zu sehen. Die Analyse der ATP-Abhängigkeit erfolgte anhand des Michaelis-Menten-Formalismus. Für den Wildtyp wurde ein k_{cat} von $3,73 \pm 0,11 \text{ s}^{-1}$ und ein K_M von $370 \pm 40 \mu\text{M}$ erhalten. Der K_M -Wert stimmt gut mit der Dissoziationskonstanten für den ATP-YxiN-Komplex von $310 \mu\text{M}$ aus der Verdrängungstitration mit mantADP (Abschnitt 3.5.1) überein. Dies deutet auf eine ähnliche ATP-Bindung in Gegenwart und

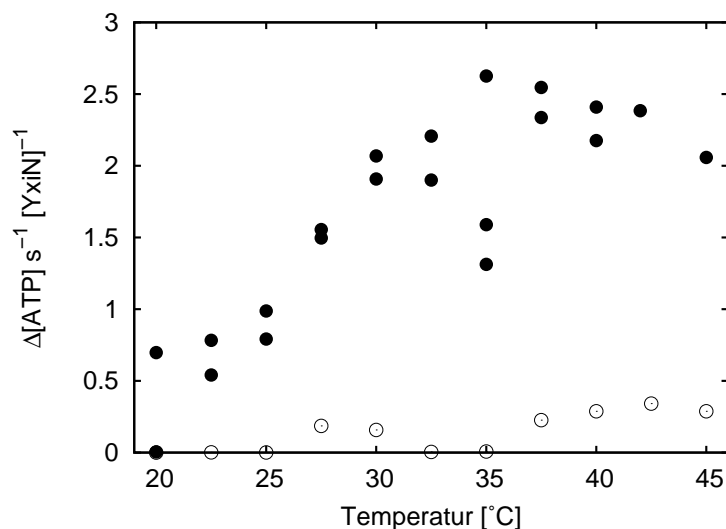


Abbildung 3.9: Temperaturabhängigkeit der ATP-Hydrolyse von YxiN wt. Die Hydrolyserate bei verschiedenen Temperaturen wurde in Gegenwart von 150 nM RNA (88b Fragment, ●) und in Abwesenheit von RNA (○) gemessen. 10 nM YxiN wt in 50 mM HEPES, 175 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 100 μM DTT, 200 μM NADH, 1 mM Phosphoenolpyruvat, pH 7,5 mit 13 μg/ml Lactatdehydrogenase und 23 μg/ml Pyruvatkinase wurde in Gegenwart von 5 mM ATP gemessen. Die Streuung der Werte ist auf die Verwendung unterschiedlicher RNA-Präparationen zurückzuführen.

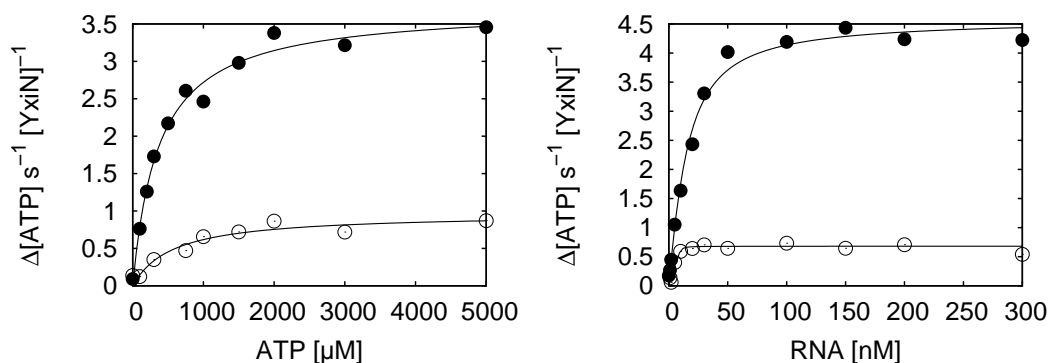


Abbildung 3.10: Substratabhängigkeit der ATP-Hydrolyserate. Gezeigt ist die Abhängigkeit der Hydrolyserate von ATP (links) und RNA (rechts, 154b RNA) für YxiN wt (●) und YxiN* (○). YxiN zeigt eine verringerte ATP-Hydrolyserate. Dennoch ist eine RNA-abhängige ATPase-Aktivität deutlich zu sehen. Die Messung der ATP-Abhängigkeit erfolgte in Gegenwart von 150 nM RNA, die Messung der RNA-Abhängigkeit in Gegenwart von 5 mM ATP. 10 nM YxiN in 50 mM HEPES, 175 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 100 μM DTT, 200 μM NADH, 1 mM Phosphoenolpyruvat mit 13 μg/ml Lactatdehydrogenase und 23 μg/ml Pyruvatkinase bei 37°C wurden gemessen.

Abwesenheit von RNA hin. YxiN* zeigt einen deutlich geringeren k_{cat} von $0,97 \pm 0,09 \text{ s}^{-1}$ und einen etwas höheren K_M von $570 \pm 190 \mu\text{M}$, der im Rahmen des Fehlers mit dem aus der Fluoreszenz-Gleichgewichts-Titration bestimmten K_D -Wert von $920 \mu\text{M}$ übereinstimmt. Die Bindung von RNA durch YxiN ist so stark, dass es bei den Enzymkonzentrationen, die

für eine meßbare ATP-Hydrolyserate mindestens nötig sind, nicht möglich war, mit einem deutlichen RNA-Überschuß zu arbeiten. Ein solcher Substratüberschuß ist aber Voraussetzung für die Analyse nach Michaelis-Menten (Michaelis und Menten, 1913; Briggs und Haldane, 1925). Daher wurde zur Auswertung stattdessen die kinetische Gleichung 2.17 verwendet. Für den Wildtyp erhält man damit einen k_{cat} von $4,59 \pm 0,12 \text{ s}^{-1}$ und eine apparente Dissoziationskonstante für den RNA-YxiN-Komplex von $10,0 \pm 1,4 \text{ nM}$. Dieser Wert liegt in der gleichen Größenordnung wie die direkte gemessene Dissoziationskonstante von $5,0 \text{ nM}$. Die Mutante YxiN* zeigt wieder einen deutlich geringeren k_{cat} von $0,68 \pm 0,03 \text{ s}^{-1}$ und mit einer apparenten Dissoziationskonstante von $0,15 \pm 0,26 \text{ nM}$ eine deutlich stärkere Bindung.

Die k_{cat} -Werte aus den Messungen mit ATP und RNA sollten eigentlich übereinstimmen, wenn für die Messungen das jeweils nicht variierte Substrat in sättigender Konzentration vorhanden ist. Bei der eingesetzten Konzentration von 150 nM RNA ist jedoch bei einer apparenten Dissoziationskonstante von $10,0 \text{ nM}$ für den YxiN-RNA-Komplex erst etwa 80%ige Sättigung erreicht. Ein zusätzliches Problem kann die Verwendung verschiedener RNA-Präparationen sein, da die Reinheit der Präparationen schwankte.

Eine analoge Messung der RNA-abhängigen ATPase-Aktivität von YxiN wt mit dem Doppelstrang aus dem 32b und dem 9b RNA-Fragment zeigte keine nennenswerte Stimulation der ATPase-Aktivität durch RNA. Bei der verwendeten Temperatur von 37°C ist die Sekundärstruktur der RNA nicht mehr stabil.

Die ATPase-Aktivität der YxiN-Mutanten mit einem potentiell zugänglichen Cystein wurde nur unter Standardbedingungen (10 nM Protein, 150 nM RNA, 5 mM ATP) überprüft. In Tabelle 3.4 sind die Hydrolyseraten in Gegenwart und in Abwesenheit von RNA aufgelistet. Alle YxiN-Mutanten zeigen RNA-stimulierte ATPase-Aktivität. Zwei Mutanten (Q47C und K337C) scheinen etwas höhere Aktivität zu besitzen als YxiN*. In drei Mutanten (K70C, N239C und R288C) ist die Aktivität gegenüber YxiN* reduziert; allerdings zeigen diese YxiN-Mutanten auch keine Reaktivität mit den Fluorophoren (vgl. Tabelle 3.3) und wurden daher nicht zur Markierung verwendet.

In YxiN S182A T184A ist das SAT-Motiv (Motiv III) zu AAA mutiert; diese Mutation sollte eine Entkopplung von RNA-Entwindung und ATP-Hydrolyse bewirken. Die RNA-stimulierte ATP-Hydrolyse zeigt ein vergleichbares Ausmaß wie bei YxiN wt.

Für mehrere Doppelmутanten wurde die ATP- und RNA-Abhängigkeit der ATP-Hydrolyse untersucht. Die erhaltenen Parameter sind in Tabelle 3.5 angegeben. Die maximalen Hydrolyseraten ändern sich gegenüber der Ausgangsmutante YxiN* nur geringfügig. Für alle

Tabelle 3.4: ATPase-Aktivität der YxiN-Mutanten mit einem potentiell zugänglichen Cystein unter Standardbedingungen (10 nM Protein, 5 mM ATP, \pm 150 nM 154b-RNA). Alle Mutanten zeigen RNA-stimulierte ATP-Hydrolyse. Zwei Mutanten, die keine Reaktivität mit den Fluorophoren zeigen (Q187C und E238C, vgl. Tabelle 3.3), wurden nicht untersucht (n.b.).

| Protein | | ATP - Hydrolyserate | |
|------------------|-------|--|-------|
| | | [Δ [ATP]s ⁻¹ [YxiN] ⁻¹] | |
| | | + RNA | - RNA |
| YxiN wt | | 5,8 | 0,2 |
| YxiN* | | 1,6 | 0,1 |
| YxiN* | Q47C | 3,3 | 0,1 |
| " | K70C | 0,6 | 0,2 |
| " | S108C | 1,6 | 0,1 |
| " | A115C | 1,6 | 0,2 |
| " | N158C | 1,6 | 0,0 |
| " | Q187C | n.b. | n.b. |
| " | E224C | 2,8 | 0,1 |
| " | S229C | 1,7 | 0,1 |
| " | T237C | 1,5 | 0,1 |
| " | E238C | n.b. | n.b. |
| " | N239C | 0,4 | 0,1 |
| " | D262C | 1,7 | 0,1 |
| " | I275C | 1,4 | 0,1 |
| " | R288C | 0,4 | 0,1 |
| " | K337C | 3,8 | 0,0 |
| YxiN S182A T184A | | 3,9 | 0,0 |

Mutanten steigt der K_M , d.h. die Bindung von ATP wird schwächer. Damit sind auch die gewählten Konzentrationsbereiche und die ATP-Konzentration der RNA-abhängigen Messung nicht mehr ideal, so dass die Ergebnisse stärker fehlerbehaftet sind. Dennoch ist in alle untersuchten YxiN-Mutanten RNA-abhängige ATP-Hydrolyse zu beobachten.

YxiN zeigt also RNA-stimulierte ATPase-Aktivität. Der Ersatz von C61 und C267 durch Serin führt zu einer Verringerung der maximalen ATP-Hydrolyserate. Die Einführung zusätzlicher Cysteine scheint keinen großen Einfluß auf die maximale ATP-Hydrolyserate zu zeigen, verändert aber die ATP-Bindung.

3.8.2 Helikase-Aktivität

Die Helikase-Aktivität von YxiN sollte anhand von Fluoreszenzmessungen untersucht werden. Dazu wurde das in Abbildung 3.3 A. (Seite 54) dargestellte RNA-Substrat an geeig-

Tabelle 3.5: Ergebnisse der ATP- und RNA-abhängigen ATP-Hydrolysetests. Die Messungen für YxiN wt und YxiN* sind in Abbildung 3.10 gezeigt. Die ATP-Abhängigkeit wurde in Gegenwart von 150 nM 154b RNA gemessen, die RNA-Abhängigkeit in Anwesenheit von 5 mM ATP. Die maximalen ATP-Hydrolyseraten der untersuchten Mutanten mit zwei zugänglichen Cysteinen entsprechen bei der ATP-Abhängigkeit gut den Werten von YxiN*. Die ATP-Bindung ist in unterschiedlichem Ausmaß geschwächt. Dadurch wurde bei der Messung der RNA-Abhängigkeit zum Teil keine sättigende ATP-Konzentration eingesetzt.

| Protein | ATP-Abhängigkeit | | RNA-Abhängigkeit | |
|---------------|---------------------------------|---------------|---------------------------------|-------------------|
| | k_{cat} [s ⁻¹] | K_M [μM] | k_{cat} [s ⁻¹] | K_{app} [nM] |
| YxiN wt | 3,73 ± 0,11 | 370 ± 40 | 4,59 ± 0,12 | 10,0 ± 1,4 |
| YxiN* | 0,97 ± 0,09 | 570 ± 190 | 0,68 ± 0,03 | 0,15 ± 0,26 |
| - Q47C I275C | 0,80 ± 0,16 | 870 ± 520 | 0,83 ± 0,13 | 20,3 ± 12,4 |
| - S108C E224C | 0,77 ± 0,10 | 590 ± 290 | 0,65 ± 0,10 | 15,8 ± 11,0 |
| - S108C I275C | 0,62 ± 0,08 | 1680 ± 530 | 0,35 ± 0,10 | 11,5 ± 16,0 |
| - S108C S229C | 1,09 ± 0,48 | 5800 ± 4000 | 0,39 ± 0,03 | 2,9 ± 2,1 |
| - A115C S229C | 0,69 ± 0,12 | 2280 ± 820 | 0,79 ± 0,08 | 8,7 ± 4,8 |

neten Stellen mit einem entsprechenden Farbstoff markiert. Versuche zur kontinuierlichen Messung in Lösung und Analyse von Proben nach verschiedenen Zeitpunkten in einem Acrylamidgel wurden durchgeführt.

Fluoreszenzintensität in Lösung

Zur Verwendung von Fluoreszenz als Meßsignal eignen sich besonders gut Systeme, in denen die Intensität eines fluoreszierenden Reporter-moleküls in Lösung beobachtet werden kann. Dazu wurden verschiedene Konstrukte mit dem kurzen RNA-Substrat untersucht:

- A. Fluoreszein wurde an das 3'-Ende des 9b-Fragments gebunden. Die Bildung des Doppelstranges sollte zu Fluoreszenzlöschung führen.
- B. 2-Aminopurin wurde anstelle von Adenin im 9b-Fragment eingebaut. Die Bildung des Doppelstranges sollte zu Fluoreszenzlöschung führen.
- C. Fluoreszein wurde an das 5'-Ende des 32b-Fragments, TMR an das 3'-Ende des 9b-Fragments gebunden. Nur im Doppelstrang sollte Energietransfer von Fluoreszein auf TMR stattfinden.
- D. Dansyl wurde an das 3'-Ende des 9b-Fragments gebunden. Energietransfer von Tryptophan in YxiN zu Dansyl sollte stattfinden, wenn doppelsträngige RNA gebunden ist und verschwindet bei der Entwindung, wenn der kurze RNA-Strang freigesetzt wird.

In Abbildung 3.11 sind die Fluoreszenzspektren gezeigt, die mit den verschiedenen Konstrukten gemessen wurden. Das mit Fluoreszein markierte 9b-Fragment zeigte eine deutliche Änderung der Fluoreszenz bei Doppelstrangbildung (Abb. 3.11 A1). Daher sollte es sich zur Untersuchung der Helikase-Aktivität eignen. Bei einer zweiten Messung mit einer von Purimex mit Fluoreszein markierten RNA fiel diese Änderung deutlich geringer aus (Abb. 3.11 A2). Dieser Unterschied kann durch die deutliche längere Verbindung zwischen Fluoreszein und RNA in der von Purimex markierten RNA verursacht werden. Unterschiede in der Gesamtintensität können zudem durch unterschiedliche Markierungseffizienzen verursacht werden. Eine analoge Messung bei 37°C zeigte keine Änderung der Fluoreszenz, da der Doppelstrang bei dieser Temperatur nicht mehr stabil ist.

Die mit 2-Aminopurin markierte RNA zeigte insgesamt nur sehr geringe Fluoreszenzintensität (Abb. 3.11 B). Zudem zeigte der proteingebundene Doppelstrang ähnliche Fluoreszenz wie der Einzelstrang. Damit dürfte sich bei der Entwindung der RNA die Fluoreszenz kaum ändern. Eine Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der Fluoreszenz nach der Zugabe von ATP (Abb. 3.12 B) zeigt dementsprechend auch nur geringe Änderungen.

In Konstrukt C sollte die Annäherung von Fluoreszein und TMR bei der Bildung des Doppelstrangs zu Energietransfer führen. Allerdings zeigten die Spektren der beiden markierten Einzelstränge nach direkter Anregung der beiden Farbstoffe unter identischen Bedingungen stark unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten (Abb. 3.11 C). Als Grund kommen hierfür einmal unterschiedliche Markierungseffizienzen, aber auch unterschiedliche spektrale Eigenschaften der Fluorophore in dieser Umgebung in Frage. Ein eventuell auftretender Energietransfer wäre bei diesen Intensitätsverhältnissen nicht zu detektieren.

Als viertes Konstrukt wurde Dansyl-markierte RNA untersucht. Diese zeigte bei einer Konzentration von 100 nM nur sehr schwache Fluoreszenz, die nur durch eine Erhöhung der Bandbreite der Anregung von 5 auf 10 nm überhaupt detektiert werden konnte (Abb. 3.11 D). Daher zeigen die Spektren auch deutlich stärkeres Rauschen. Dansyl kann direkt bei 325 nm oder bei 280 nm angeregt werden. Die Anregung bei 280 nm sollte durch Energietransfer von Tyrosin im Protein auf Dansyl zu einer erhöhten Fluoreszenz in Gegenwart von YxiN führen. Ein solcher Effekt konnte für dieses Konstrukt nicht beobachtet werden. Insgesamt ist die Fluoreszenz zu gering, um diese RNA zur Beobachtung der Aktivität einzusetzen.

Von den verschiedenen getesteten RNA-Konstrukten eignet sich also nur das mit Fluoreszein markierte 9b-Fragment zur Untersuchung der Aktivität. In Abbildung 3.12 A ist der Zeitverlauf der Fluoreszenz von 9b-Fluoreszein in Gegenwart von 32b-RNA und YxiN wt nach der Zugabe von ATP gezeigt. Man sieht in den ersten Minuten einen Anstieg, der in einen

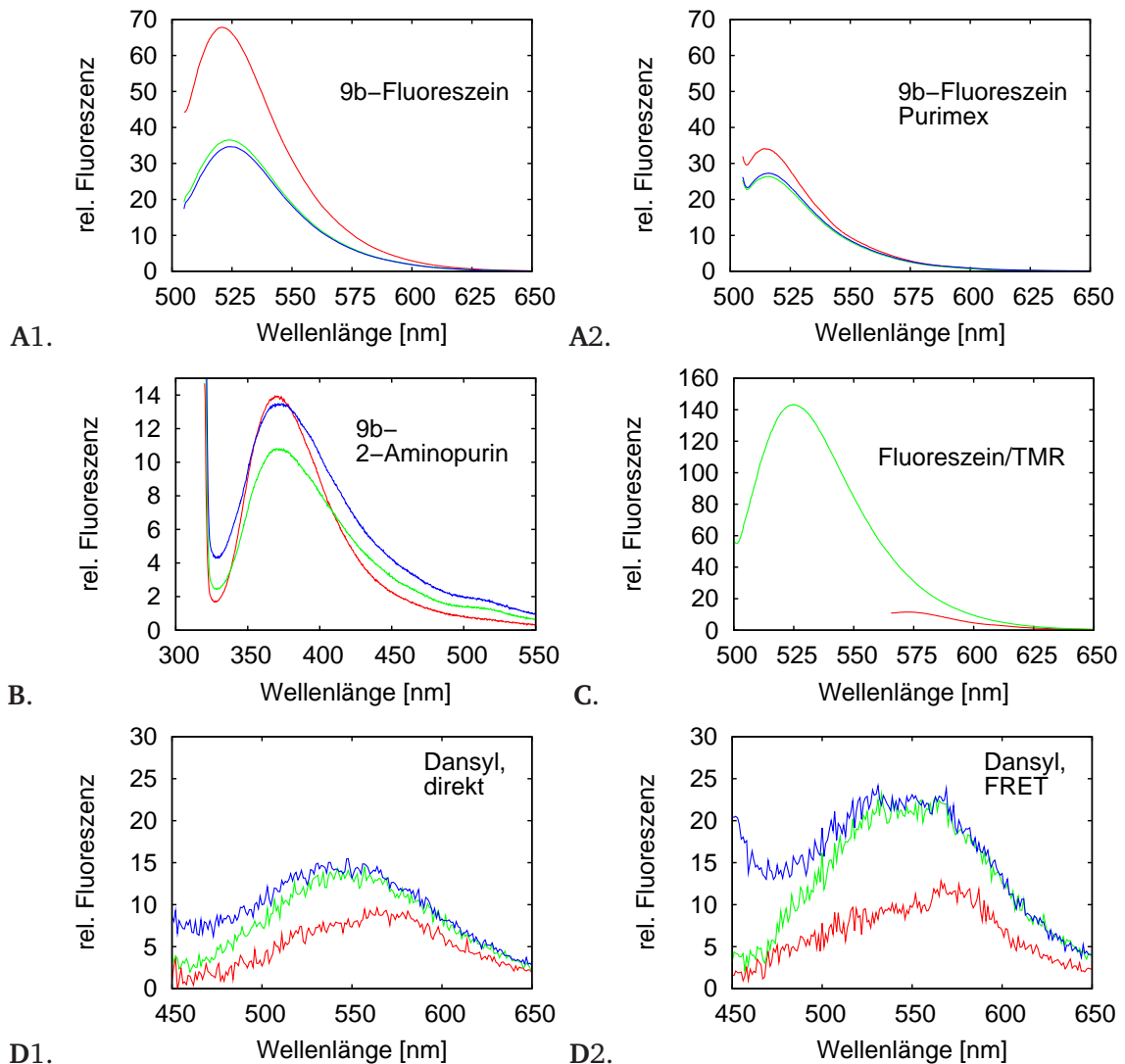


Abbildung 3.11: Fluoreszenzspektren der markierten RNA-Konstrukte zur Bestimmung der RNA-Helikase-Aktivität. Das Spektrum des markierten Einzelstranges ist jeweils rot dargestellt, der Doppelstrang grün und der Doppelstrang in Gegenwart von YxiN wt blau.

A1. Das mit Fluoreszein markierte 9b-Fragment, das in unserem Labor markiert worden war, zeigte bei der Bildung des Doppelstranges eine deutlich geringere Fluoreszenz, die sich bei Zugabe von YxiN kaum mehr änderte. 25 nM RNA mit 250 nM YxiN wt wurde nach Anregung bei 495 nm gemessen.

A2. Das von Purimex am 5'-Ende mit Fluoreszein markierte 9b-Fragment zeigte eine deutlich geringere Fluoreszenzänderung bei Bildung des Doppelstranges. Die Zugabe von YxiN führte zu keiner Änderung. Es wurde 100 nM RNA mit 1 μ M YxiN wt nach Anregung bei 495 nm gemessen.

B. Das mit 2-Aminopurin markierte 9b-Fragment zeigte insgesamt nur eine sehr geringe Fluoreszenzintensität. Diese änderte sich bei Bildung des Doppelstranges geringfügig, stieg jedoch bei Zugabe von YxiN wieder an. Es wurde 1 μ M RNA mit 2 μ M YxiN wt nach Anregung bei 310 nm gemessen.

C. Das mit Fluoreszein markierte 32b-Fragment (grün) zeigte deutlich höhere Fluoreszenzintensität als das mit TMR markierte 9b-Fragment (rot). Es wurden jeweils 100 nM RNA gemessen; die Anregung von Fluoreszein erfolgte bei 493 nm, die Anregung von TMR bei 553 nm.

D. Das am 3'-Ende mit Dansyl markierte 9b-Fragment zeigte bei Anregung bei 325 nm (D1.) und bei 280 nm (D2.) nur geringe Fluoreszenz, die bei Doppelstrangbildung etwas erhöht und durch die Zugabe von YxiN nicht verändert wurde. 100 nM RNA wurden mit 1 μ M YxiN wt gemessen.

Alle Spektren wurden in 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,5, bei 25°C gemessen.

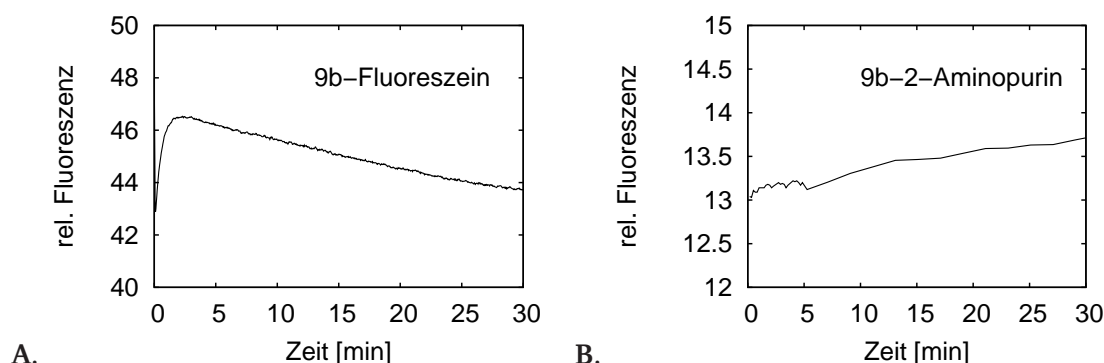


Abbildung 3.12: Zeitabhängige Messungen der Fluoreszenzintensität markierter RNA.

A. Fluoreszein-markierte 9b-RNA. 25 nM RNA und 250 nM Protein wurden vorgelegt und mit 2,5 μ M ATP versetzt. Die Fluoreszenz bei 520 nm nach Anregung bei 495 nm wurde gemessen. Einem anfänglichen schnellen Anstieg folgt ein langsamer Abfall.

B. 2-Aminopurin-markierte 9b-RNA. 1 μ M RNA und 2 μ M Protein wurden vorgelegt und mit 1 mM ATP versetzt. Die Fluoreszenz bei 400 nm nach Anregung bei 310 nm wurde gemessen. Es ist nur ein ganz schwacher, allmählicher Anstieg zu beobachten.

Beide Messungen erfolgten bei 25°C in 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,5.

flachen Abfall übergeht. Offensichtlich findet am Anfang Entwindung des Doppelstranges statt. Der anschließende Abfall könnte auf eine Rückbildung des Doppelstranges hindeuten. Unmarkierte 9b-RNA sollte eine solche Rückbildung durch Abfangen des freiwerdenden 32b-Stranges verhindern. Die Zugabe von 9b-RNA zu der Reaktion konnte jedoch den Abfall nicht verhindern.

Ein weiterer möglicher Effekt ist das Bleichen des Fluorophors durch die anhaltende Beleuchtung. Eine Messung, bei der nur in Abständen von mindestens einer Minute Werte gemessen und dazwischen das Anregungslicht blockiert wurde, wurde nur mit dem von Purimex markierten 9b-Strang durchgeführt; hierbei war kein solcher Abfall, aber auch kein Anstieg zu Beginn der Messung zu beobachten. Der Abfall scheint tatsächlich durch Bleich-effekte verursacht zu werden. Allerdings konnte mit dieser RNA keine Entwindung beobachtet werden, vermutlich weil der Anteil an RNA, der entwunden wurde, so gering war, dass er bei der geringen Signaländerung zwischen Einzel- und Doppelstrang nicht beobachtet werden konnte. Auch ein Versuch, die Einzelstränge durch die Zugabe von 400 mg/ml Heparin abzufangen, führte zu keiner Änderung der Fluoreszenz.

Unter den getesteten Bedingungen konnte also kein auf der Intensität eines an RNA gebundenen Fluorophors beruhender Helikasetest durchgeführt werden.

Aktivitätstest im Gel

Helikase-Aktivität wird im Allgemeinen mit radioaktiv markierter RNA gemessen. Die Helikasereaktion wird in Lösung durchgeführt, nach verschiedenen Zeitpunkten gestoppt und Einzel- und Doppelstrang werden in einem Gel getrennt (für YxiN vgl. Kossen *et al.* (2002)). Analog kann auch fluoreszenzmarkierte RNA untersucht werden. Allerdings ist Fluoreszenz weniger sensitiv als Radioaktivität, so dass höhere Konzentrationen an markierter RNA und damit andere Reaktionsbedingungen verwendet werden müssen.

In Abbildung 3.13 ist ein solcher Aktivitätstest für YxiN wt mit Fluoreszein-markierter 9b-RNA zu sehen. Die verschiedenen Proben wurden bei 25°C inkubiert, gestoppt und in einem nativen RNA-Polyacrylamid-Gel in Einzel- und Doppelstrang getrennt. Die relative Intensität der fluoreszierenden Banden wurde nach Anregung mit UV-Licht quantifiziert.

Man erkennt, dass unter den verwendeten Bedingungen (25°C, 2facher Überschuß des unmarkierten Stranges) der 9b-Strang nur zum Teil einen Doppelstrang bildete. 33% der

| | | | | | | | | | |
|------------|---|---|----|---|---|----|----|----|----|
| 9b-FI-RNA | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 32b-RNA | | + | + | + | + | + | + | + | + |
| YxiN | | | | + | + | + | + | + | + |
| ATP | | | | + | + | + | + | | |
| ADP | | | | | | | | + | + |
| Zeit (min) | | 0 | 30 | 2 | 5 | 10 | 30 | 10 | 30 |

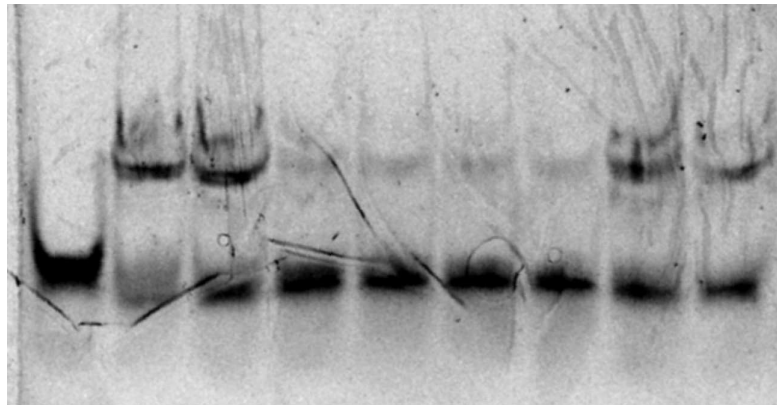


Abbildung 3.13: Helikase-Aktivitätstest im nativen Polyacrylamidgel. Der Doppelstrang (obere Bande) wird von YxiN wt in Gegenwart von ATP entwunden, so dass ein höherer Anteil Einzelstrang (untere Bande) detektiert wurde. In Gegenwart von ADP findet keine Entwindung statt. 5 μ M fluoreszeinmarkierte 9b-RNA, 10 μ M 32b-RNA und 10 μ M YxiN wt wurden in Gegenwart von 50 μ M unmarkierter 9b-RNA in 50 mM HEPES, 250 mM KCl, 5 % Glycerin, 100 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA, 5 mM MgCl₂, pH 7,5 bei 25°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 mM Nukleotid gestartet und durch die Zugabe von Stop-Lösung beendet (Endkonzentration 1% SDS, 50 mM DTT, 5% Glycerin, 0,05% Bromphenolblau, 25 mM Tris/HCl, pH 7,0). Die Trennung erfolgte in einem 15% Acrylamidgel. Die Fluoreszenz nach Anregung mit UV-Licht wurde an der Geldokumentation aufgenommen.

Fluoreszenz befand sich in der oberen Bande; das entspricht dem Anteil an Doppelstrang. Dieser Anteil blieb in Abwesenheit von YxiN, aber auch in Gegenwart von YxiN und ADP über einen Zeitraum von 30 Minuten stabil. In Anwesenheit von ATP sank der Anteil des Doppelstrangs innerhalb dieser Zeit auf 9%. YxiN zeigt also ATP-abhängige RNA-Helikase-Aktivität. Eine schwach zu erkennende zweite Bande über dem Doppelstrang wird vermutlich von einem Dimer des Doppelstranges verursacht und wurde dem Doppelstrang zugerechnet. Eine alternative Erklärung wäre die Gegenwart eines YxiN-RNA-Komplexes, wie er für das zu YxiN homologe Protein DbpA aus *E. coli* beschrieben wurde (Diges und Uhlenbeck, 2001). Solche Komplexe sollten aber durch die verwendete Stop-Lösung aufgelöst werden.

Die Helikaseaktivität der YxiN-Mutanten mit einem potentiell zugänglichen Cystein und der wichtigen YxiN-Mutanten mit zwei zugänglichen Cysteinen wurde überprüft. Dazu wurde das Ausmaß der Entwindung innerhalb von zehn Minuten untersucht. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 3.6. Die meisten YxiN-Mutanten mit einem zugänglichen Cystein und alle untersuchten YxiN-Mutanten mit zwei zugänglichen Cysteinen zeigten eine Aktivität, die in etwa der Aktivität von YxiN* entspricht und etwas geringer ist als die Aktivität des Wildtyps. Ausnahmen davon sind die YxiN-Mutanten mit den Cysteinen E238C, N239C, D262C und R288C, deren Aktivität deutlich reduziert ist. Die entkoppelte YxiN-Mutante, YxiN S182A T184A, zeigt wie erwartet keine erkennbare Helikase-Aktivität.

Die Analyse von fluoreszenzmarkierter RNA in nativen Acrylamidgelen eignet sich also zur Untersuchung der Helikase-Aktivität von YxiN und bietet eine Alternative zu dem üblichen Helikase-Test mit radioaktiv markierter RNA. Der Ersatz der im Wildtyp zugänglichen Cysteine C61 und C267 durch Serin führte zu einer Verringerung der Aktivität. Alle Mutanten zeigten Helikase-Aktivität; die Aktivität der untersuchten Mutanten mit zwei zugänglichen Cysteinen entspricht der Aktivität von YxiN*.

3.9 Fluoreszenzmarkierung

In Abschnitt 3.1 wurde die Auswahl von Positionen für die Fluoreszenzmarkierung von YxiN beschrieben. Die entsprechenden YxiN-Mutanten wurden auf ihre Eignung zur Markierung, ihre Stabilität und Aktivität untersucht. Geeignete Mutanten mit Wildtyp-ähnlichen Eigenschaften wurden anschließend mit Alexa488 und TMR markiert.

Tabelle 3.6: Helikase-Aktivität der Mutanten. Für jedes Protein ist angegeben, welcher Anteil an nicht entwundenem Doppelstrang nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten noch vorhanden ist. Die Bedingungen entsprechen den in Abbildung 3.13 angegebenen.

| Protein | Anteil Doppelstrang |
|------------------|---------------------|
| – | 33 % |
| YxiN wt | 9 % |
| YxiN* | 13 % |
| YxiN* Q47C | 13 % |
| ” K70C | 15 % |
| ” S108C | 11 % |
| ” A115C | 13 % |
| ” N158C | 18 % |
| ” Q187C | 19 % |
| ” E224C | 19 % |
| ” S229C | 15 % |
| ” T237C | 15 % |
| ” E238C | 26 % |
| ” N239C | 28 % |
| ” D262C | 23 % |
| ” I275C | 12 % |
| ” R288C | 28 % |
| ” K337C | n.b. |
| ” Q47C E238C | 15 % |
| ” Q47C I275C | 14 % |
| ” S108C E224C | 15 % |
| ” S108C S229C | 12 % |
| ” S108C I275C | 15 % |
| ” A115C S229C | 16 % |
| YxiN S182A T184A | 31 % |

3.9.1 Markierung mit einem Farbstoff

Die Markierung von YxiN-Mutanten mit nur einem zugänglichen Cystein mit Alexa488 oder TMR war für verschiedene Kontrollmessungen wichtig. In Tabelle 3.7 sind die verschiedenen markierten Proteine und der Markierungsgrad angegeben. Die Markierung erfolgte in keinem Fall vollständig. Der Einsatz einer hydrophoben Interaktionschromatographie führte zwar zu einer Anreicherung von markiertem YxiN, doch es wurde keine klare Trennung des markierten von unmarkiertem YxiN erreicht. Deswegen wurde bei einigen Ansätzen darauf verzichtet und nur der Überschuss an freiem Farbstoff entfernt.

Die Absorption von TMR kann sich bei der Bindung an ein Protein verschieben. Da dieser

Tabelle 3.7: Markierung mit einem Farbstoff. Die angegebenen Proteine wurden über Nacht bei 15°C in 50 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 1 mM TCEP mit einem 3fachen Überschuß Alexa488 bzw. einem fünffachen Überschuß TMR markiert. Der Markierungsgrad wurde anhand der Absorption bestimmt.

| Protein | Farbstoff | Markierungsgrad |
|------------|-----------|-----------------|
| YxiN* Q47C | Alexa488 | 0,81 |
| | TMR | 0,94 |
| ” S108C | Alexa488 | 0,35 |
| ” A115C | Alexa488 | 0,48 |
| ” E224C | Alexa488 | 0,70 |
| ” S229C | Alexa488 | 0,35 |
| ” D262C | Alexa488 | 0,20 |
| ” I275C | Alexa488 | 0,41 |
| | TMR | 0,30 |

Effekt nicht berücksichtigt werden konnte, führte er zu einem Fehler in der Bestimmung der Markierungseffizienz anhand der Absorptionsspektren.

3.9.2 Markierung mit zwei Farbstoffen

Zur Beobachtung von Abstandsänderungen mittels FRET mussten zwei Farbstoffe an Cysteine in den beiden Helikasedomänen von YxiN angebracht werden. Dafür wurden geeignete Positionen in beiden Domänen kombiniert und die Effizienz und die Orientierung der Markierung überprüft.

Auswahl der Positionen

Für die Markierung von YxiN mit zwei verschiedenen Fluorophoren wurden Mutanten erzeugt, die je ein reaktives Cystein in jeder Helikase-Domäne besitzen. Um Konformationsänderungen beobachten zu können, muss sich der Abstand der Farbstoffe, die an diese Cysteine gebunden sind, ändern. In Abbildung 3.14 sind vier verschiedene Homologiemodelle nach verschiedenen Kristallstrukturen gezeigt. In zweien dieser Modelle liegt YxiN in einer geöffneten Konformation vor, in den anderen beiden in einer eher geschlossenen Konformation. Die Abstände der Positionen, die für die Markierung in Frage kommen, sind in Tabelle 3.8 angegeben. Die tatsächlich ausgewählten Mutanten sind im oberen Teil aufgeführt, andere Kombinationsmöglichkeiten im unteren Teil. Ausgewählt wurden Kombinationen, die eine möglichst große Abstandsänderung und damit auch eine deutliche FRET-Änderung erwarten lassen. Im Allgemeinen ist mit dem Schließen der Helikasedomänen eine Verkürzung der Abstände verbunden. Bei einigen Kombinationen ist (abhängig da-

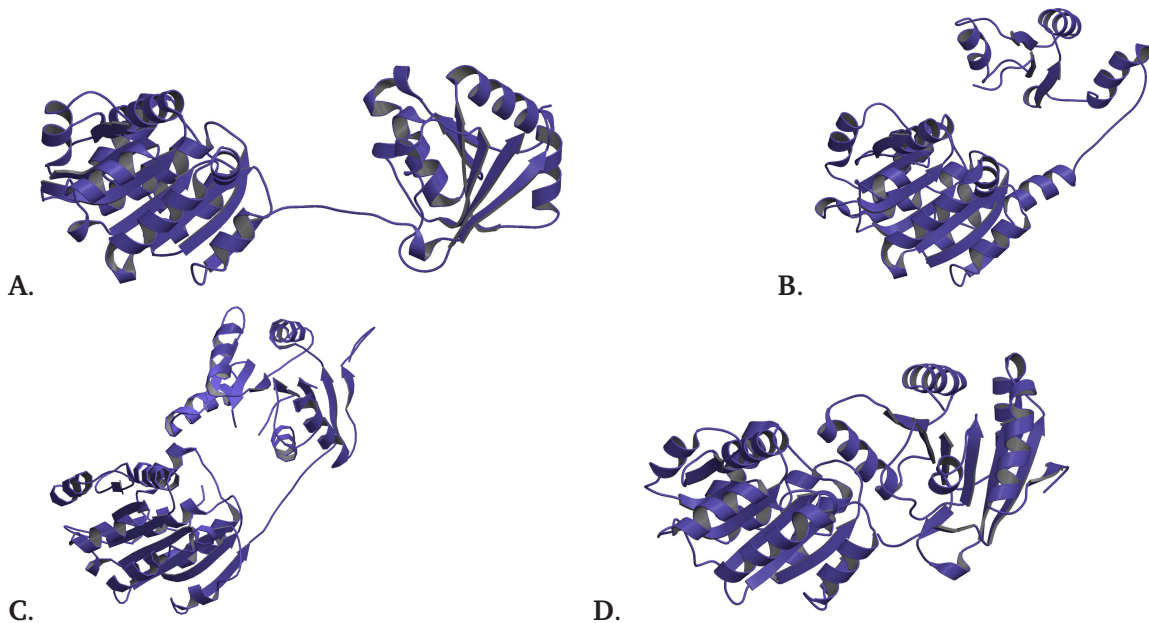


Abbildung 3.14: Vergleich verschiedener Homologiemodelle von YxiN. Die Homologiemodelle wurden anhand der Strukturen der Proteine in der PDB Datenbank erstellt, die die größte Homologie zu YxiN aufwiesen. **A.** Modell nach dem Translations-Initiationsfaktor eIF4A (Caruthers et al., 2000, PDB-Code 1FUU:B). **B.** Modell nach dem DEAD-Box Protein MjDEAD aus dem thermophilen Organismus *Methanococcus janaschii* (Story et al., 2001, PDB-Code 1HV8:B). **C.** Modell nach dem menschlichen Protein UAP56 (Shi et al., 2004, PDB-Code 1XTJ). **D.** Modell nach dem DEAD-Box Protein Dhh1p aus *Saccharomyces cerevisiae* (Cheng et al., 2005, PDB-Code 1S2M). In den Modellen **A** und **B** liegt das Protein in einer offenen Konformation vor; die sich vor allem durch die relative Orientierung der beiden Domänen unterscheidet. Auch in den eher geschlossenen Modellen **C** und **D** ist die Struktur der beiden Domänen ähnlich, nur die Orientierung hat sich geändert. Die Abstände potentieller Positionen für die Markierung in den verschiedenen Modellen sind in Tabelle 3.8 angegeben. Alle Modelle umfassen nur die beiden Helikase-Domänen von YxiN. In der Darstellung ist jeweils die N-terminale Domäne (links) ähnlich ausgerichtet. Die Homologiemodelle wurden mit 3D-JIGSAW (Bates et al., 2001) und die Abbildungen mit Molscrip (Kraulis, 1991) erstellt und mit Raster3d (Merritt und Bacon, 1997) gerendert.

von, welche der Strukturmodelle eher der Realität entsprechen) auch eine Erhöhung des Abstands denkbar, z.B. für YxiN* Q47C E238C oder YxiN* A115C S229C.

Markierung

Zur Markierung von YxiN mit zwei verschiedenen Farbstoffen wurden drei verschiedene Strategien verwendet. Bei der statistischen Markierung wurde das Protein mit Alexa488 und TMR gleichzeitig in einem geeigneten Verhältnis inkubiert. Man erhält neben der gewünschten Spezies mit Donor und Akzeptor auch Proteine mit zwei Donor- und zwei Akzeptorfluorophoren. Zudem ist die Orientierung der Farbstoffe in YxiN zufällig. Bei der sequentiellen Markierung wurden die YxiN-Mutanten zuerst kurz mit einem der Fluorophore inkubiert. Dieser wurde dann entfernt, bevor der zweite Farbstoff zugegeben wurde.

Tabelle 3.8: Erwartete Abstände der Positionen für die Markierung von YxiN mit Alexa488 und TMR anhand der verschiedenen Homologiemodelle (vgl. Abb. 3.14). Angegeben sind jeweils die C α -Abstände der Aminosäuren an den entsprechenden Positionen in den Homologiemodellen. Im oberen Block sind die Kombinationen angegeben, die gereinigt und zur Markierung eingesetzt wurden. Im unteren Block sind die Kombinationen an Positionen angegeben, die prinzipiell mit TMR-Maleimid reagieren und sich daher auch zur Markierung eignen könnten. Die potentiellen Abstandsänderungen unterscheiden sich je nach Position und Strukturmodell deutlich.

| | Abstand [nm] im Modell nach | | | |
|-------------|-----------------------------|------------|-------------|-----------|
| | eIF4a (A) | MjDEAD (B) | UAP56 (C) | Dhh1p (D) |
| | offen | | geschlossen | |
| Q47C C267 | 4,0 | 3,1 | 3,3 | 2,5 |
| C61 K337C | 5,3 | - | 4,1 | 4,1 |
| Q47C E238C | 4,7 | 3,1 | 3,7 | 3,3 |
| Q47C N239C | 4,5 | 3,1 | 3,7 | 3,1 |
| Q47C I275C | 2,9 | 3,0 | 2,4 | 1,7 |
| S108C E224C | 7,2 | 5,3 | 4,0 | 5,3 |
| S108C S229C | 7,7 | 5,5 | 4,6 | 5,8 |
| S108C I275C | 5,8 | 3,4 | 2,2 | 3,1 |
| A115C E224C | 7,9 | 6,0 | 5,0 | 6,3 |
| A115C S229C | 8,2 | 6,1 | 5,4 | 6,7 |
| A115C D262C | 8,2 | 6,0 | 4,8 | 6,2 |
| N158C I275C | 4,2 | 3,6 | 3,0 | 3,2 |
| C61 E224C | 6,8 | 5,0 | 4,9 | 5,0 |
| C61 S229C | 6,9 | 4,9 | 5,1 | 5,1 |
| C61 D262C | 6,7 | 4,9 | 4,5 | 4,5 |
| C61 I275C | 4,6 | 3,4 | 2,2 | 2,3 |
| Q47C E224C | 4,8 | 3,2 | 3,6 | 3,1 |
| Q47C S229C | 4,9 | 3,3 | 4,0 | 3,4 |
| Q47C D262C | 4,9 | 3,9 | 4,2 | 3,4 |
| S108C D262C | 7,8 | 5,7 | 4,2 | 5,5 |
| A115C I275C | 6,1 | 3,8 | 2,6 | 3,7 |
| N158C E224C | 4,9 | 4,0 | 4,4 | 4,5 |
| N158C S229C | 5,4 | 4,4 | 5,1 | 5,0 |
| N158C D262C | 5,7 | 5,1 | 5,2 | 5,2 |

Mit dieser Strategie kann die Richtung der Markierung dirigiert werden, wenn die beiden verwendeten Cysteine unterschiedlich schnell reagieren. Bei der pseudosequentiellen Markierung wurden die YxiN-Mutanten zunächst mit einem Farbstoff in geringem Überschuß

inkubiert. Dieser wurde allerdings vor der Zugabe des zweiten Fluorophors nicht entfernt. Im folgenden sind die verschiedenen Markierungsversuche aufgelistet. Der Markierungsgrad wurde anhand des Absorptionsspektrums bestimmt. Bei der Markierungsstrategie ist jeweils der eingesetzte Überschuss an Farbstoff, die zugehörige Inkubationstemperatur und -dauer sowie bei sequentieller Markierung die eingesetzte Methode zur Entfernung von überschüssigem freiem Farbstoff nach dem ersten Markierungsschritt angegeben. Die Markierungsversuche erfolgten alle in 50 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 1 mM TCEP, pH 7,5. Im Allgemeinen wurden die markierten Proteine abschließend durch hydrophobe Interaktionschromatographie gereinigt. Ausnahmen sind angegeben.

YxiN C267S K337C Markierungsgrad: 0,20 Alexa488, 0,24 TMR

statistisch: 2× Überschuss Alexa488, 3× Überschuss TMR, 15°C über Nacht.

YxiN Q47C E238C* Markierungsgrad: 0,69 Alexa488, 0,17 TMR

sequentiell: 3× Überschuss Alexa488, 15°C, 1 h, NAP-Säule, 5× Überschuss TMR, 15°C, über Nacht.

YxiN Q47C E238C* Markierungsgrad: 0,40 Alexa488, 0,60 TMR

pseudosequentiell: 1 Äquivalent Alexa488, 15°C, 1 h, 5× Überschuss TMR, 15°C, über Nacht.

YxiN Q47C N239C* Markierungsgrad: 0,28 Alexa488, 0,24 TMR

statistisch: 2× Alexa488, 3× TMR, 30°C, 2 h.

YxiN Q47C I275C* Markierungsgrad: 0,28 Alexa488, 0,42 TMR

pseudosequentiell: 1 Äquivalent Alexa488, 15°C, 1 h, 2× Überschuss TMR, 4°C, über Nacht.

YxiN Q47C I275C 1* Markierungsgrad: 0,65 Alexa488, 0,46 TMR

sequentiell: 3× Überschuss TMR, 15°C, 1 h, Hydrophobe Interaktionschromatographie, 3× Überschuss Alexa488, 4°C, über Nacht.

YxiN Q47C I275C* Markierungsgrad: 0,28 Alexa488, 0,24 TMR

sequentiell: 5× Überschuss TMR, 15°C, 1 h, NAP-Säule, 5× Überschuss Alexa488, 4°C, über Nacht.

YxiN Q47C I275C 2* Markierungsgrad: 0,59 Alexa488, 0,59 TMR

pseudosequentiell: 2,5× Überschuss Alexa488, 15°C, 1 h, 7× TMR, 15°C, über Nacht.

YxiN Q47C I275C 3* Markierungsgrad: 0,89 Alexa488, 0,66 TMR

pseudosequentiell: 2× Überschuss Alexa488, 15°C, 1 h, 10× TMR, 15°C, über Nacht.

YxiN S108C E224C 1* Markierungsgrad: 0,43 Alexa488, 0,73 TMR

pseudosequentiell: 1 Äquivalent Alexa488, 15°C, 1 h, 7× Überschuss TMR, 15°C, über Nacht.

YxiN S108C E224C 2* Markierungsgrad: 0,27 Alexa488, 0,64 TMR

sequentiell: 10× Überschuss TMR, 15°C, 1 h, NAP-Säule, 5× Überschuss Alexa488, 15°C, über Nacht.

YxiN S108C S229C* Markierungsgrad: 0,40 Alexa488, 0,26 TMR

statistisch: 5× Überschuss Alexa488, 7× Überschuss TMR, 15°C, über Nacht.

- YxiN** **S108C S229C** Markierungsgrad: 0,35 Alexa488, 0,39 TMR
 statistisch: 5× Überschuß Alexa488, 7× Überschuß TMR, 15°C, über Nacht; abschließende Reinigung nicht über hydrophobe Interaktionschromatographie, sondern über eine NAP-Säule.
- YxiN** **S108C S229C** Markierungsgrad: 0,66 Alexa488, 0,87 TMR
 pseudosequentiell: 1,5× Überschuß Alexa488, 15°C, 1 h, 5× Überschuß TMR, 30°C, 1 h, 15°C, über Nacht.
- YxiN** **S108C I275C** Markierungsgrad: 0,37 Alexa488, 0,53 TMR
 pseudosequentiell: 2× Überschuß Alexa488, 15°C, 1 h, 7× Überschuß TMR, 30°C, 1 h, 15°C, über Nacht.
- YxiN** **S108C I275C** Markierungsgrad: 0,95 Alexa488, 0,53 TMR
 pseudosequentiell: 5× Überschuß Alexa488, 30°C, 1 h, 15× Überschuß TMR, 30°C, 1 h, 15°C, über Nacht.
- YxiN** **S108C I275C** Markierungsgrad: 0,52 Alexa488, 0,32 TMR
 pseudosequentiell: 4× Überschuß Alexa488, 15°C, 1 h, 16× Überschuß TMR, 30°C, 2 h, 15°C, über Nacht.
- YxiN** **A115C E224C** Markierungsgrad: 0,46 Alexa488, 0,24 TMR
 pseudosequentiell: 1,5× Überschuß Alexa488, 4°C, 1 h, 5× Überschuß TMR, 15°C, über Nacht.
- YxiN** **A115C S229C** Markierungsgrad: 0,69 Alexa488, 1,03 TMR
 statistisch: 5× Überschuß Alexa488, 7× Überschuß TMR, 15°C, über Nacht.
- YxiN** **A115C S229C** Markierungsgrad: 0,61 Alexa488, 1,13 TMR
 statistisch: 5× Überschuß Alexa488, 7× Überschuß TMR, 15°C, über Nacht; abschließende Reinigung nicht über hydrophobe Interaktionschromatographie, sondern über eine NAP-Säule.
- YxiN** **A115C D262C** Markierungsgrad: 0,48 Alexa488, 0,15 TMR
 statistisch: 2× Überschuß Alexa488, 3× Überschuß TMR, 15°C, über Nacht.
- YxiN** **N158C I275C** Markierungsgrad: 0,29 Alexa488, 0,20 TMR
 pseudosequentiell: 2,5× Überschuß Alexa488, 15°C, 1 h, 7× Überschuß TMR, 15°C, über Nacht.

Auch bei der Doppelmarkierung liegt der Markierungsgrad für jeden Farbstoff im Allgemeinen deutlich unter eins. Die Cysteine an den meisten Positionen reagieren unter den eingesetzten Bedingungen nicht vollständig; es ist ein deutlicher Farbstoffüberschuß erforderlich, um einen höheren Markierungsgrad zu erreichen. Wie man z.B. an *YxiN* C267S K337C sehen kann, korreliert die Markierungseffizienz wie erwartet nicht mit der Zugänglichkeit der Cysteine für DTNB (dann wäre eine gute Markierbarkeit erwartet worden), sondern mit der Markierungskinetik der Farbstoffe, die für diese beiden Positionen kaum bzw. keine Reaktivität ergeben hat.

Für FRET-Untersuchungen sollte der Markierungsgrad möglichst hoch sein. Die in der obigen Aufzählung hervorgehobenen markierten *YxiN*-Mutanten wurden für Einzelmolekül-

messungen eingesetzt; wo mehrere Markierungsansätze verwendet wurden, wurden diese zur Unterscheidbarkeit numeriert. Die Aktivität der zugrundeliegenden YxiN-Mutanten wurde überprüft (Abschnitt 3.8.1, 3.8.2).

Limitierte Proteolyse

Die meisten Markierungsansätze erfolgten nach einer sequentiellen oder pseudosequentiellen Strategie. Damit sollte eine bevorzugte Orientierung der Fluorophore im YxiN-Molekül erreicht werden. Eine Möglichkeit, diese Orientierung zu überprüfen, bietet die limitierte Proteolyse. Das Produkt der Spaltung von YxiN mit Thermolysin besteht vor allem aus zwei Fragmenten. Proteinsequenzierung ergab, dass das kleinere Fragment (Größe lt. SDS-Gel etwa 25 kDa) mit der N-terminalen Sequenz beginnt und damit die N-terminale Helikasedomäne enthält, aber gerinfügig länger ist und die Aminosäuren 224 und 229 noch umfassen könnte. Das etwa 33 kDa große zweite Fragment beginnt mit L210 und umfasst damit die C-terminale Helikase-Domäne und die dritte, C-terminale Domäne von YxiN. Limitierte Proteolyse der markierten YxiN-Mutanten (Abb. 3.15) sollte zeigen, ob die beiden Fluorophore jeweils nur in einem der beiden Fragmente oder in beiden auftreten.

In den meisten Fällen ist keine Orientierung der Markierung erkennbar, so dass von einer statistischen Verteilung der Farbstoffe ausgegangen werden muss. Nur YxiN* S108C S229C und YxiN* A115C S229C zeigen Banden unterschiedlicher Farben. Die C-terminale Domäne (obere Bande) ist in beiden Fällen grün (also mit Alexa488 markiert). Der N-terminale Teil erscheint zunächst ebenfalls grün. Allerdings umfasst dieser Teil die Position S229C noch, so dass das in der C-terminalen Helikase-Domäne lokalisierte Alexa488 noch vorhanden ist. Es gibt jedoch kleinere Banden, die eindeutig TMR-Fluoreszenz zeigen. Da das C-terminale Fragment nur ein zugängliches Cystein enthalten kann, müssen diese Banden aus der Verkürzung des N-terminalen Fragments entstehen. In diesen beiden Fällen ist Alexa488 bevorzugt an Position S229C lokalisiert, TMR befindet sich bevorzugt in der N-terminalen Domäne an Position S108C bzw. A115C.

Fluoreszenzspektren

Änderungen des Energietransfers aufgrund von Abstandsänderungen bei der Substratbindung oder der Katalyse durch doppelt markierte YxiN-Mutanten sind eventuell bereits im Ensemble-Fluoreszenzspektrum zu beobachten. In Abbildung 3.16 sind Fluoreszenzspektren von doppelt markiertem YxiN* S108C S229C zu sehen. Die Zugabe von ATP und RNA verursacht keine Änderung der relativen Fluoreszenzintensität von Alexa488 und TMR nach

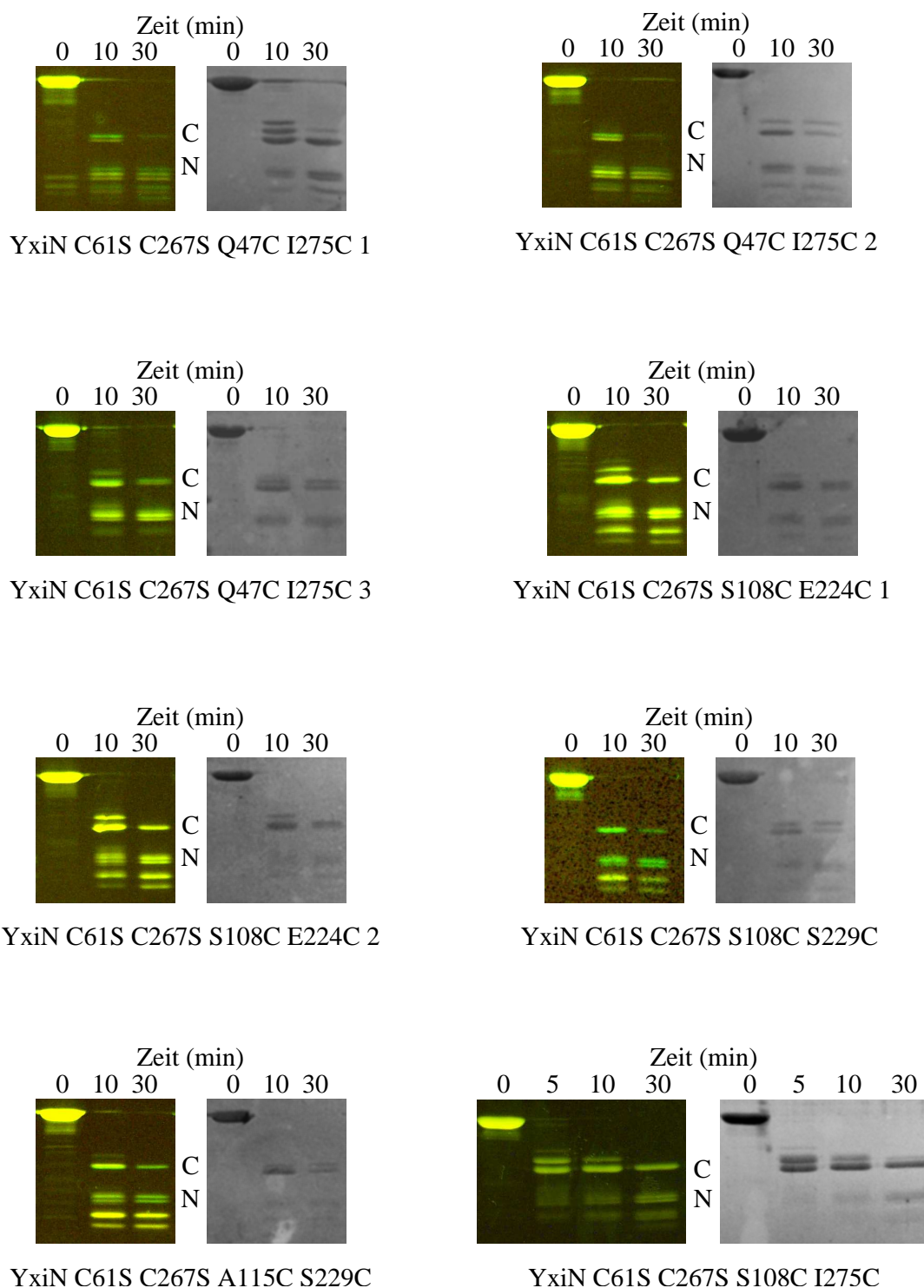


Abbildung 3.15: Limitierte Proteolyse der doppelt markierten YxiN-Mutanten. 5 μM YxiN-Lösungen in 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5, wurden bei 20°C mit 0,5 μM Thermolysin gespalten und mittels SDS-PAGE analysiert. Gezeigt ist jeweils links das Gel bei Anregung mit UV-Licht vor der Färbung der Proteine und rechts das mit Brilliant Blau R250 gefärbte Gel. Die Fluoreszenz ist sensitiver als die Proteinfärbung, so dass einige Banden nur im UV-Licht zu erkennen sind. Die obere der Proteolysebanden entspricht dem C-terminalen Teil von YxiN (C), die zweite Bande dem N-terminalen Teil (N). Die Fluoreszenz von Alexa488 erscheint grün, die von TMR gelb. Eine detailliertere Analyse erfolgt im Text.

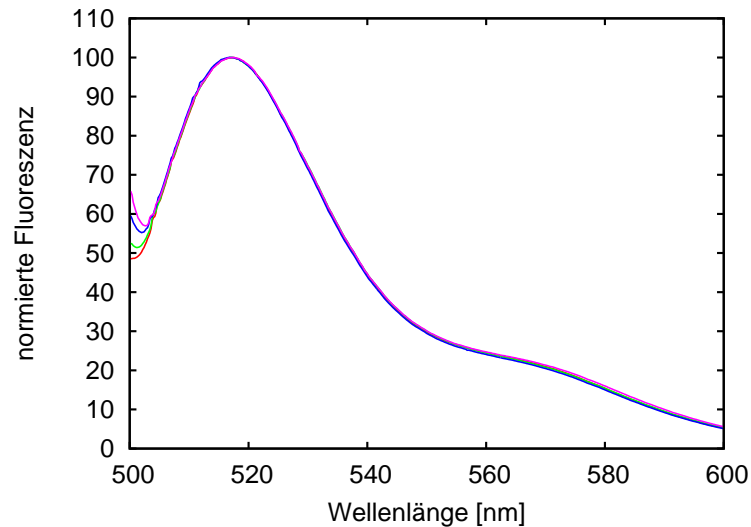


Abbildung 3.16: Fluoreszenzspektren von doppelt markiertem YxiN* S108C S229C. Die Spektren wurden auf das Fluoreszenzmaximum von Alexa488 normiert, da markiertes YxiN schnell an Oberflächen adsorbiert und so leichte Konzentrationsschwankungen auftreten. Wenn eine Änderung des Energietransfers auftritt, so sollte sich die relative Intensität der Donor- und Akzeptorfluoreszenz verändern. Gezeigt ist das Spektrum des markierten YxiN (rot), in Gegenwart von ATP (grün), von RNA (blau) und in Gegenwart beider Substrate (violett). Die Kurven liegen direkt übereinander; es ist keine Änderung im Verhältnis der Fluoreszenz zu beobachten. 0,5 μM Protein in 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 2 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,5 wurden bei 493 nm angeregt. Die Messung erfolgte bei 25°C. 5 mM ATP bzw. 150 nM 154b-RNA wurden zugegeben.

Anregung des Donors. Analoge Messungen mit ADP oder $\text{ATP}\gamma\text{S}$ zeigten ebenfalls keinen erkennbaren Effekt.

Es konnten also insgesamt fünf YxiN-Mutanten mit ausreichender Effizienz mit zwei verschiedenen Farbstoffen markiert werden. Für zwei dieser Mutanten wurden mehrere Markierungsansätze durchgeführt. Zwei der markierten YxiN-Mutanten zeigten Orientierung in der Markierung. In Ensemble-Fluoreszenzspektren konnte jedoch keine Fluoreszenzänderung bei der Zugabe von RNA oder ATP festgestellt werden.

3.10 Bestimmung des Förster-Abstands

Der Förster-Abstand ist der charakteristische Abstand zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor, bei dem eine FRET-Effizienz von 0,5 erreicht ist. Dieser hängt von den verwendeten Fluorophoren ab. Er berechnet sich nach Gleichung 2.5 (Seite 31) und hängt von verschiedenen Parametern ab: Der **Brechungsindex** n der Lösung beträgt 1,33. Der **Orientierungsfaktor** κ^2 ist abhängig vom Winkel zwischen den Übergangsdipolen von Donor und Akzeptor und kann Werte zwischen Null und Vier annehmen. Im Idealfall können die

Farbstoffe frei rotieren und man erhält dadurch eine komplett zufällige Verteilung der Orientierung. Dann nimmt κ^2 einen Wert von $\frac{2}{3}$ an (Förster, 1959). Da die Anknüpfung von Alexa488 und TMR mittels Maleimid eine freie Reorientierung zulassen sollte, wurde dieser Wert verwendet. Das **Überlappungsintegral** wurde aus dem Fluoreszenzspektrum von β -Mercaptoethanol-Alexa488 und dem Absorptionsspektrum von β -Mercaptoethanol-TMR berechnet. Dadurch können spektrale Verschiebungen bei der Anknüpfung der Farbstoffe an YxiN nicht berücksichtigt werden. Diese treten vor allem im Absorptionsspektrum von TMR auf und hängen von der Position in YxiN ab. Das Absorptionsspektrum muss jedoch anhand des maximalen Extinktionskoeffizienten des freien Farbstoffs normiert werden, da der Extinktionskoeffizient des YxiN-gebundenen Farbstoffs nicht bestimmt werden konnte. Da sich auch der Wert dieses Extinktionskoeffizienten verändern kann, würde die Verwendung der Absorptionsspektren von TMR-markiertem YxiN den Fehler aufgrund der spektralen Verschiebung nicht beseitigen. Bei der Fluoreszenz von Alexa488 ändert sich vor allem die Quantenausbeute, jedoch nicht die Form des Spektrums, so dass die Verwendung des Spektrums von β -Mercaptoethanol-Alexa488 keinen Unterschied macht. Die **Quantenausbeute** für Alexa488 an den verschiedenen Positionen in YxiN wurde anhand der Spektren der einfach mit Alexa488 markierten Proteine gegen Fluoreszein als Referenz bestimmt. Die Quantenausbeute und der resultierende Förster-Abstand für Alexa488 an den Positionen, die zur Doppelmarkierung verwendet wurden, sind in Tabelle 3.9 aufgeführt.

Die berechneten Werte für den Förster-Abstand variieren nur geringfügig bei der Anbringung von Alexa488 an verschiedenen Positionen in YxiN, so dass die Orientierung von Donor und Akzeptor im Molekül bei nicht gerichteter Markierung keinen großen Einfluß auf die Transfereffizienz und die Berechnung von Abständen hat. Die Position I275C ist

Tabelle 3.9: Quantenausbeute von Alexa488 und resultierender Förster-Abstand. Für Alexa488 an verschiedenen Positionen in YxiN wurde die Quantenausbeute und daraus der Förster-Abstand bestimmt. Die Quantenausbeute wurde in 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,5, gegen Fluoreszein in 0,1 M NaOH als Referenz gemessen. Der Förster-Abstand wurde nach Gleichung 2.5 berechnet.

| Protein | Quantenausbeute | Förster-Abstand |
|---------------------|-----------------|-----------------|
| YxiN* Q47C Alexa488 | 0,96 | 6,5 nm |
| ” S108C Alexa488 | 0,66 | 6,1 nm |
| ” A115C Alexa488 | 0,82 | 6,3 nm |
| ” E224C Alexa488 | 0,79 | 6,3 nm |
| ” S229C Alexa488 | 0,95 | 6,5 nm |
| ” I275C Alexa488 | 0,29 | 5,3 nm |

hierbei eine Ausnahme. Die deutlich verringerte Quantenausbeute führt zu einem geringeren Förster-Abstand. Wird diese Position mit einer anderen kombiniert, z.B. in YxiN* Q47C I275C, so hat die Orientierung der beiden Farbstoffe einen großen Einfluß auf die gemessenen FRET-Effizienzen.

Der Förster-Abstand ermöglicht die Berechnung von Abständen aus FRET-Effizienzen. Die verschiedenen bestimmten Förster-Abstände sind ähnlich. Nur an einer Position in YxiN ist die Quantenausbeute von Alexa488 und damit auch der Förster-Abstand deutlich reduziert.

3.11 Einzelmolekülexperimente

Mittels konfokaler Einzelmolekül-FRET-Experimente wurden Abstandsänderungen in doppelt markiertem YxiN untersucht. Der dazu verwendete Aufbau ist in Abschnitt 2.10.1 beschrieben, die ausgewählten markierten YxiN-Mutanten sind in Abschnitt 3.9.2 aufgeführt.

3.11.1 Schwierigkeiten bei Einzelmolekülmessungen

Bei Kontrollmessungen ergaben sich verschiedene Probleme. Unregelmäßig trat eine apparative Störung auf, die sich in einem periodischen Signal mit einer Frequenz von 20 Hz äußerte. Die Ursache konnte nicht sicher festgestellt werden (Spreitler, 2006). Daher wurden Messungen, in denen die Störung auftrat, verworfen und erneut durchgeführt.

Eine Messung mit Puffer zeigte, dass dieser fluoreszierende Verunreinigungen enthielt, die durch Behandlung mit Aktivkohle entfernt werden konnten. Die Zugabe von ATP erhöhte das Untergrundsignal im Allgemeinen leicht. Bei der RNA schwankte der Einfluß auf den Untergrund je nach Qualität der Präparation. Alle im folgenden gezeigten Messungen wurden mit RNA durchgeführt, die keine große Änderung des Untergrunds verursachte.

Ein Problem von Einzelmolekül-FRET-Experimenten ist die erhöhte Wahrscheinlichkeit des Bleichens der Fluorophore durch die hohe Intensität des gepulsten anregenden Lichts im Fokus. Das Bleichen des Akzeptors ist durch die Möglichkeit der Anregung in einen höheren als den ersten angeregten Zustand durch die geringere Wellenlänge des Lichts zusätzlich verstärkt (Eggeling *et al.*, 2006). Das Abfangen von Sauerstoff durch Ascorbinsäure (Ha, 2001) oder durch ein enzymatisches System aus Glucose-Oxidase und Katalase (Bates *et al.*, 2005b) kann diesen Effekt verringern. Allerdings führten beide Zusätze zu einem stark erhöhten Untergrund. Deswegen wurde auf den Einsatz verzichtet.

Die Tendenz von YxiN zur Oberflächenbindung wurde direkt beobachtet. Wird fluoreszenzmarkiertes YxiN in einer nicht vorbehandelten Kammer gemessen, so kann beobachtet wer-

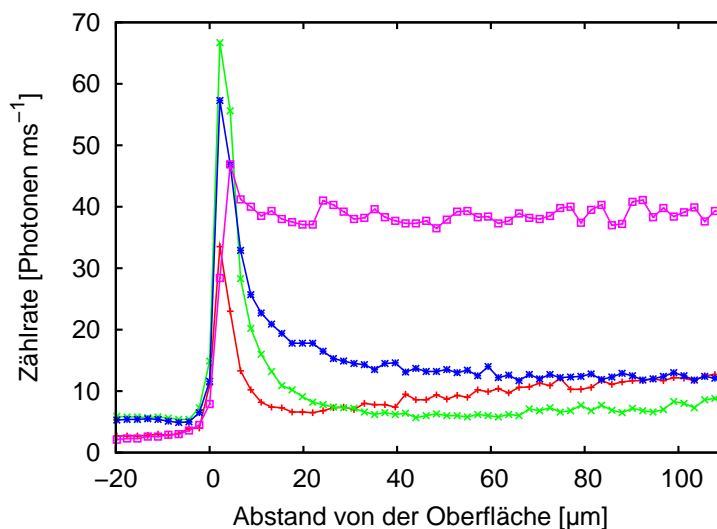


Abbildung 3.17: Bindung von YxiN an Oberflächen. In nicht vorbehandelten Kammern kann bei einer Messung von markiertem YxiN ein deutliches Maximum der Zählrate der APD an der Oberfläche des Deckgläschens beobachtet werden, wenn die Position des Fokus variiert wird (rot). Die Behandlung mit 400 mg/ml PEG (grün) oder 0,5 mg/ml BSA (blau) brachte keine deutliche Verbesserung. Erst die Vorbehandlung mit unmarkiertem YxiN führte zu einem Verschwinden des Maximums an der Oberfläche und zu einer deutlich erhöhten Zählrate in der Lösung. Unterschiede in der Intensität des Maximums können durch die Genauigkeit der Höheneinstellung und die Schrittweite der Messung ($2,2 \mu\text{m}$) beeinflusst werden. Eine Mischung aus 10 nM YxiN* Q47C Alexa488 und 10 nM YxiN* Q47C TMR wurde in 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 7,5, in Schritten von $2,2 \mu\text{m}$ gemessen. Die an der Donor-APD gemessene Zählrate ist gezeigt. Zur Vorbehandlung wurden die Kammern eine Stunde mit der entsprechenden Lösung inkubiert, mit Meßpuffer gespült und sofort verwendet.

den, dass die Fluoreszenz direkt an der Oberfläche des Objektträgers konzentriert ist (Abb. 3.17). Die Behandlung der Kammer mit Rinderserumalbumin (BSA) oder Polyethylenglycol (PEG) verhindert dies nicht. Erst die Behandlung mit mindestens $10 \mu\text{M}$ nicht markiertem YxiN führte dazu, dass das markierte Protein in Lösung blieb. Es wurde die YxiN-Mutante C267S K337C verwendet, die mit guter Ausbeute gereinigt werden konnte. Da es sich dabei um eine aktive Mutante handelt und sich ein Teil des Proteins eventuell wieder in der Meßlösung löst, beeinflusst dies die effektive YxiN-Konzentration in den Messungen.

3.11.2 Korrekturparameter

Für die Bestimmung der FRET-Effizienz aus den gemessenen Photonendaten müssen verschiedene Korrekturparameter berücksichtigt werden. Diese wurden mit der in Abschnitt 2.10.3 beschriebenen Methode bestimmt. Für den *crossstalk* α des Donors in den Akzeptorkanal wurde ein Wert von 0,3 ermittelt, für den Akzeptor-*crossstalk* β ein Wert von 0,05. Der Korrekturfaktor γ betrug 1,22. Für die direkte Anregung δ wurde mit der beschrie-

benen Methode ein sehr hoher Wert von 0,66 bestimmt; dieser führte in der Auswertung zu einer starken Verzerrung der Histogramme. Ein Vergleich der Absorptionsspektren der β -Mercaptoethanol-Addukte von Alexa488 und TMR zeigte, dass TMR bei der Anregungswellenlänge von 475 nm weniger als 15% der Absorption von Alexa488 hat. Da sich die Absorptionsspektren der Farbstoffe bei der Bindung an YxiN abhängig von der Position auch noch geringfügig ändern können, wurde als Näherung die direkte Anregung $\delta = 0$ gesetzt.

3.11.3 Optimierung von Messparametern

Die Aussagekraft von Einzelmolekülexperimenten wird stark von den verwendeten Bedingungen beeinflusst. Daher wurden zunächst verschiedene Parameter der Messung optimiert.

Proteinkonzentration

Für die konfokale Mikroskopie muss die Konzentration des untersuchten Proteins so gering sein, dass sich stets maximal ein fluoreszierendes Molekül im Fokus befindet. Dann beeinflusst der Fluorophor auch die Untergrundzählrate kaum. Die Konzentration sollte aber hoch genug sein, dass genügend Fluoreszenzereignisse während der Dauer einer Messung auftreten. Zur Bestimmung der optimalen YxiN-Konzentration wurde unter sonst gleichen Bedingungen die Konzentration variiert. (Abb. 3.18 A.). Die Häufigkeit der Fluoreszenzereignisse steigt ab etwa 10 pM YxiN deutlich an, der Untergrund wird erst verzögert ab etwa 20 pM erhöht. Für die weiteren Messungen wurden YxiN-Konzentrationen zwischen 20 pM und 50 pM verwendet, wo bereits mehr Ereignisse detektiert werden, der Untergrund aber noch nicht stark erhöht ist. Berücksichtigt werden muss jeweils der Markierungsgrad und damit die effektive Konzentration an fluoreszenzmarkiertem Protein. Daher wird im folgenden neben der YxiN-Konzentration auch jeweils die Konzentration des Donors Alexa488 angegeben. Bei dem hier verwendeten YxiN* Q47C Alexa488 betrug der Markierungsgrad 0,81. Der optimale Bereich von 20 pM bis 50 pM entspricht damit einer Alexa488-Konzentration von 16 pM bis 41 pM.

Anregungsleistung

Die Anregungsleistung in Einzelmolekülexperimenten muss so hoch sein, dass eine ausreichende Zahl von Photonen in einem Fluoreszenzereignis beobachtet werden kann. Zu hohe Intensität führt jedoch zu verstärktem Bleichen der Fluorophore. Bei der Variation

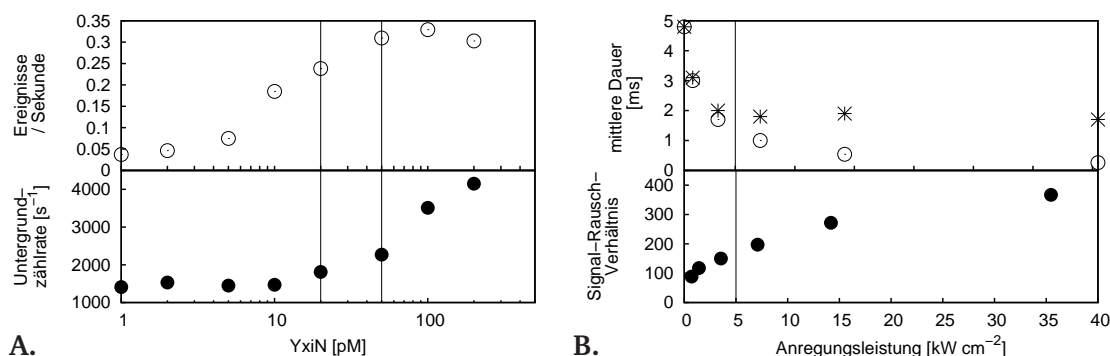


Abbildung 3.18: Bestimmung der optimalen Parameter für Einzelmolekül-FRET-Messungen. **A.** Konzentrationsabhängigkeit. Die Konzentration von YxiN* Q47C Alexa488 wurde variiert und die Häufigkeit der Ereignisse (\circ) sowie die Untergrundzählrate (\bullet) im Donorkanal bestimmt. Möglichst viele Ereignisse bei gleichzeitig möglichst geringem Untergrund erhält man im Bereich von 20 μM bis 50 μM . Bei hohen Konzentrationen sinkt die Zahl der Ereignisse wieder, da sie über dem erhöhten Untergrund nicht mehr detektiert werden können. Für diese Messungen wurde 10 Minuten lang mit einer Leistung von $10,2 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$ angeregt. **B.** Einfluß der Anregungsleistung. 50 μM YxiN* A115C S2229C Alexa488 TMR (35 μM Alexa488) wurde mit unterschiedlicher Leistung jeweils 5 Minuten lang angeregt. Die Erhöhung der Leistung führt zu einer deutlichen Verkürzung der durchschnittlichen Dauer der Ereignisse (\circ). Dies ist vor allem auf das verstärkte Auftreten extrem kurzer Ereignisse, aber auch auf eine allgemeine Verkürzung der Dauer der Ereignisse zurückzuführen. Berücksichtigt man nur Ereignisse, die mindestens 1 ms dauern (\star), so ist die Änderung der Dauer deutlich geringer. Das Verhältnis der durchschnittlichen Zählrate in einem Fluoreszenzereignis zur Quadratwurzel der Untergrundzählrate wurde als Signal-Rausch-Verhältnis aufgetragen (\bullet) und steigt mit zunehmender Anregungsleistung an. Für die weiteren Messungen wurde im Allgemeinen eine Anregungsleistung von $5,1 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$ verwendet. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur in 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, pH 7,5.

der Anregungsleistung (Abbildung 3.18 B.) sinkt die mittlere Dauer einzelner Fluoreszenzereignisse mit zunehmender Leistung. Allerdings ist dies hauptsächlich auf das gehäufte Auftreten extrem kurzer Ereignisse zurückzuführen, die vermutlich von Verunreinigungen verursacht werden. Wurden diese nicht berücksichtigt, so zeigte die Leistung einen deutlich geringeren Einfluß auf die Dauer der Fluoreszenzereignisse. Die Zahl der Photonen in einem Ereignis und damit auch das Verhältnis von Fluoreszenz zu Untergrund steigt mit zunehmender Leistung. Aufgrund der gemessenen Abhängigkeit wurde im Allgemeinen eine Anregungsleistung von $5,1 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$ verwendet.

Minimale Zahl an Photonen in einem Fluoreszenzereignis

Bei der Auswertung wird für die Berücksichtigung von Fluoreszenzereignissen eine minimale Anzahl an Photonen vorausgesetzt. Abbildung 3.19 zeigt die Histogramme, die durch Variation dieses Schwellenwerts in einer Messung mit Puffer oder markiertem YxiN erhalten wurden. Nahezu alle im Puffer gemessenen Signale werden bei einem Schwellenwert

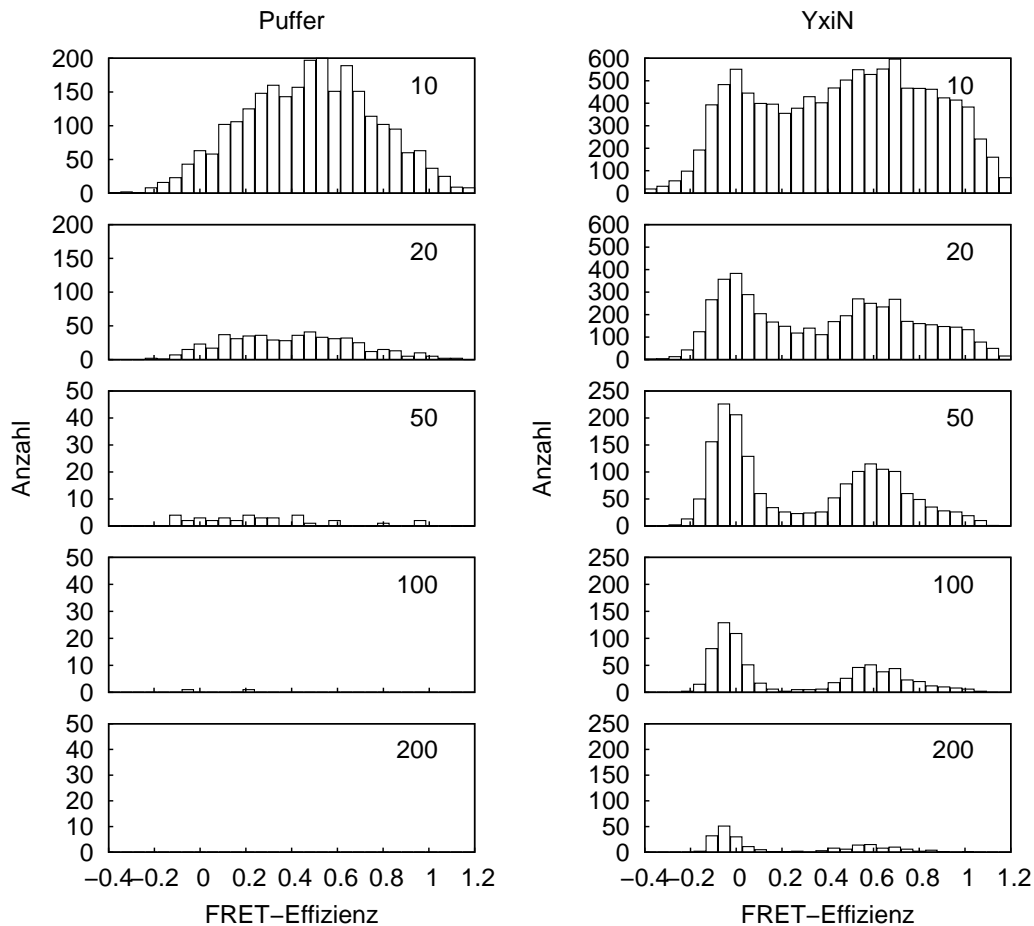


Abbildung 3.19: Auswirkung der Variation der minimalen Photonenzahl in einem Fluoreszenzereignis auf FRET-Histogramme. Eine Messung mit Puffer (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 7,5) und eine Messung mit 60 pM YxiN* S108C S229C Alexa488 TMR (40 pM Alexa488) in diesem Puffer wurden mit unterschiedlichen Schwellenwerten (jeweils in der Abbildung angegeben) für die minimale Photonenzahl eines Ereignisses ausgewertet. Liegt dieser Schwellenwert sehr niedrig, werden im Puffer viele Ereignisse detektiert, die die Analyse der Proteinmessung erschweren. Eine Erhöhung auf 50 Photonen unterdrückt nahezu alle vom Puffer verursachten Signale. Bei einer weiteren Erhöhung wird ein großer Teil der von markiertem YxiN verursachten Ereignisse verworfen. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur mit einer Anregungsintensität von 5,1 kW·cm⁻².

von 50 Photonen verworfen, während in der Messung mit markiertem YxiN noch keine Information verlorengeht. Daher wurden für die weiteren Auswertungen 50 Photonen als Schwellenwert verwendet.

Für Einzelmolekül-FRET-Messungen wurden also Konzentrationen zwischen 16 pM und 41 pM Alexa488 eingesetzt. Die YxiN-Konzentration wurde anhand des Markierungsgrads angepasst. Die gewählte Anregungsleistung betrug 5,1 kW·cm⁻². Der Schwellenwert für die Auswertung eines Fluoreszenzereignisses wurde auf 50 Photonen gesetzt.

3.11.4 Messungen an YxiN-Mutanten

Die Auswahl der markierten YxiN-Mutanten für die Einzelmolekül-FRET-Experimente wurde in Abschnitt 3.9.2 beschrieben. Im folgenden sind die relevanten Eigenschaften der untersuchten Proteine jeweils kurz zusammengefasst, bevor auf die Ergebnisse der Einzelmolekülmessungen eingegangen wird.

YxiN* Q47C I275C

Die wichtigsten Eigenschaften des Proteins sind in Tabelle 3.10 zusammengefasst. Mit dieser YxiN-Mutante wurde in drei Markierungsansätzen ein Markierungsgrad über 1 für beide Farbstoffe gemeinsam erreicht, der eine Messung vielversprechend macht. Mit den Proteinen der drei Markierungsansätze wurden Einzelmolekülmessungen in Abwesenheit und in Anwesenheit von ATP durchgeführt (Abb. 3.20). In allen drei Fällen ist ein deutliches Maximum bei einer FRET-Effizienz von etwa 0 zu beobachten. Dieses Maximum entsteht durch YxiN, das nur den Donor Alexa488, aber kein TMR oder bereits gebleichten Akzeptor trägt. Das Maximum liegt bei einer FRET-Effizienz von -0,05, was im Rahmen der Genauigkeit gut mit einem erwarteten Maximum bei 0 übereinstimmt. Eine negative FRET-Effizienz ist nicht sinnvoll; sie wird durch statistische Schwankungen aufgrund der geringen Photonenanzahl in einem Ereignis und durch die Fehler, v.a. in den Korrekturfaktoren, verursacht.

Außer diesem Maximum ist eine breite Verteilung von FRET-Effizienzen zu sehen, die alle nur mit einer recht geringen Häufigkeit auftreten. Es ist kein weiteres Maximum sicher zu identifizieren. Dafür sind verschiedene Ursachen denkbar. Zum einen könnte YxiN in einer

Tabelle 3.10: Eigenschaften von YxiN Q47C I275C.*

| Parameter | Wert | vgl. Kapitel |
|----------------------------|-------------------------|--------------|
| app. K_D (RNA) | 10 nM | 3.8.1 |
| K_M (ATP) | 870 μ M | |
| Erwartete Abstände | | 3.9.2 |
| offen | 2,9 nm bzw. 3,0 nm | |
| geschlossen | 2,4 nm bzw. 1,7 nm | |
| Förster-Abstand | | 3.10 |
| Alexa488 an Position Q47C | 6,5 nm | |
| Alexa488 an Position I275C | 5,3 nm | |
| Markierung 1 | 0,65 Alexa488, 0,46 TMR | 3.9.2 |
| Markierung 2 | 0,59 Alexa488, 0,59 TMR | |
| Markierung 3 | 0,89 Alexa488, 0,66 TMR | |

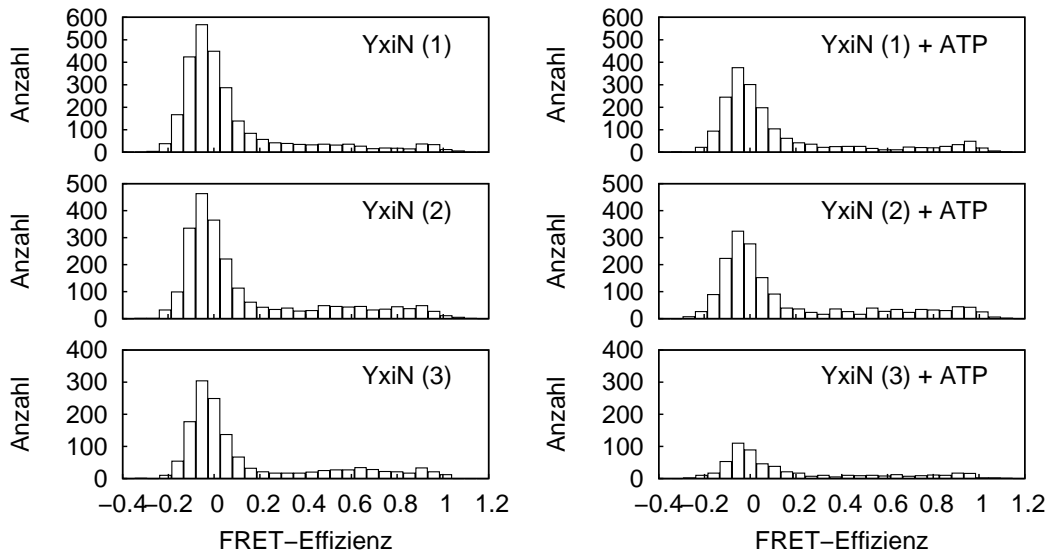


Abbildung 3.20: Histogramme der FRET-Effizienzen verschiedener Markierungsansätze von YxiN* Q47C I275C. Es wurde jeweils eine Donor-Konzentration von 30 pM verwendet. Die resultierenden YxiN-Konzentrationen waren 46 pM (1), 51 pM (2) und 34 pM (3). YxiN in Abwesenheit von Substrat und in Gegenwart von 2 mM ATP wurde jeweils gemessen. Es ist in allen Messungen ein deutliches Maximum bei einer FRET-Effizienz von -0,05 vorhanden. Zudem ist eine breite Verteilung von FRET-Effizienzen mit jeweils wenigen Ereignissen zu erkennen. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur in 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 7,5 mit einer Anregungsleistung von 5,1 kW·cm⁻² für 20 Minuten.

Konformation vorliegen, in der der Abstand der Fluorophore so groß ist, dass kein Transfer auftreten kann. Das ist aufgrund der aus den Homologiemodellen erwarteten Abstände sehr unwahrscheinlich. Zum anderen könnte die Markierung so erfolgt sein, dass es keine Spezies gibt, die gleichzeitig den Donor Alexa488 und den Akzeptor TMR trägt. Dies ist aufgrund der Markierungseffizienzen zumindest für die ersten beiden Messungen möglich.

Eine weitere Komplikation bei dieser Mutante ist der Förster-Abstand. Dieser hängt davon ab, an welche Position Alexa488 gebunden ist. Aufgrund der ungerichteten Markierung ist Alexa488 aber an beiden Positionen zu finden. Daher führen gleiche Abstände zu einer unterschiedlichen FRET-Effizienz, was zu einer Verbreiterung der Verteilung der FRET-Effizienzen führt. Auch eine schnelle Bewegung innerhalb der Dauer des Fluoreszenzsignals kann zu einer breiten Verteilung der FRET-Effizienz führen. Aufgrund der kurzen Dauer der Ereignisse ist das aber unwahrscheinlich.

Es konnte mit keinem der drei Markierungsansätze von YxiN* Q47C I275C ein klares, auswertbares Maximum der FRET-Effizienz beobachtet werden. Daher wurde diese Mutante nicht weiter untersucht.

YxiN* S108C E224C

In Tabelle 3.11 sind die Eigenschaften dieser YxiN-Mutante angegeben. Von dieser und den folgenden Mutanten wurden jeweils vollständige Meßreihen durchgeführt. Dazu wurden drei verschiedene Nukleotide eingesetzt: ATP, ADP und ATP γ S als nicht hydrolysierbares ATP-Analogon. Einzelmolekülmessungen mit jedem der Nukleotide, mit RNA und mit den Nukleotiden in Gegenwart von RNA wurden durchgeführt. Abbildung 3.21 zeigt eine solche Meßreihe für den zweiten Markierungsansatz von YxiN* S108C E224C.

Die Messung des markierten YxiN zeigt neben dem bereits beschriebenen Maximum bei einer FRET-Effizienz von -0,05 ein deutliches zweites Maximum. Dieses liegt bei einer FRET-Effizienz von 0,61. Das entspricht einem Abstand von 5,7 nm, wenn man einen Förster-Abstand von 6,1 nm zugrunde legt. Bei einem Förster-Abstand von 6,3 nm erhält man einen Abstand von 5,9 nm. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass das Maximum relativ breit ist. Ein Teil dieser Verbreiterung ist ein statistisches Problem, da nur eine begrenzte Anzahl Photonen pro Ereignis zur Auswertung zur Verfügung stehen. Zum anderen liegt das Protein in Lösung nicht starr vor, sondern zeigt eine gewisse Flexibilität in seiner Struktur. Zudem sind die Farbstoffe über eine flexible Verbindung an YxiN gebunden, so dass deren Bewegung eine gewisse Fluktuation der Abstände verursachen kann. Im Rahmen dieser Einschränkung liegt der ermittelte Abstand zwischen den Werten, die aus den Homologiemodellen für die offene Form erhalten wurden. Er stimmt besser mit dem Modell nach MjDEAD überein.

Die Zugabe von ATP, ADP oder ATP γ S führt nur zu geringen Änderungen in der Position des FRET-Maximums. Bei der Zugabe von RNA wird, unabhängig von der Gegenwart der Nukleotide, eine breitere Verteilung der FRET-Effizienzen gemessen. Möglicherweise

Tabelle 3.11: Eigenschaften von YxiN* S108C E224C.

| Parameter | Wert | vgl. Kapitel |
|----------------------------|--------------------------|--------------|
| app. K_D (RNA) | 15,8 nM | 3.8.1 |
| K_M (ATP) | 590 μ M | |
| Erwartete Abstände | | 3.9.2 |
| offen | 7,2 nm bzw. 5,3 nm | |
| geschlossen | 4,0 nm bzw. 5,3 nm | |
| Förster-Abstand | | 3.10 |
| Alexa488 an Position S108C | 6,1 nm | |
| Alexa488 an Position E224C | 6,3 nm | |
| Markierung 1 | 0,43 Alexa488, 0,73 TMR | 3.9.2 |
| Markierung 2 | 0,27 Alexa 488, 0,64 TMR | |

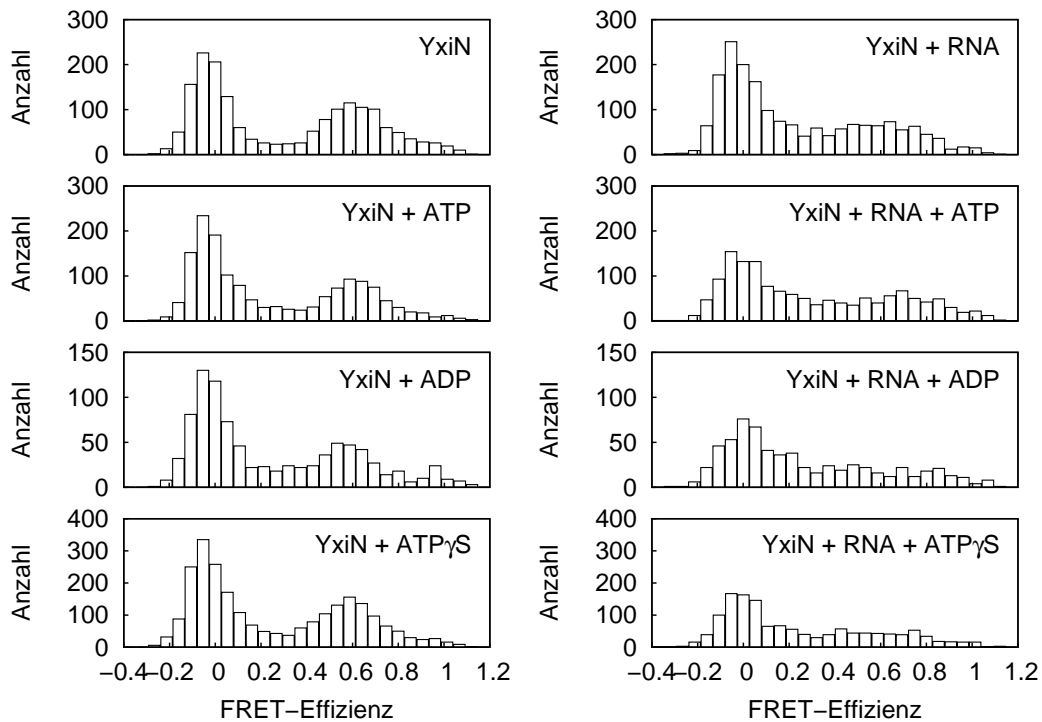


Abbildung 3.21: Histogramme der FRET-Effizienzen der zweiten Markierung von YxiN* S108C E224C. Das Protein zeigt ein deutliches Maximum, das sich bei Zugabe von Nukleotiden nicht ändert (links). Die Zugabe von RNA führt zu einer Verbreiterung des Maximum, die auch von einer Aufteilung in zwei Maxima verursacht werden kann (rechts). Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur in 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 7,5 mit einer Anregungsleistung von 5,1 kW·cm⁻² für 20 Minuten. Die Proteinkonzentration betrug 111 pM, die Konzentration an Alexa488 war 30 pM. 2 mM Nukleotide und 150 nM 154b-RNA wurden eingesetzt.

teilen sich die Signale in zwei Maxima auf, die aber beide relativ nahe beieinander liegen und insgesamt aus so wenig Ereignissen bestehen, dass sie unter diesen Bedingungen nicht mehr getrennt werden können. Es ist auch möglich, dass die Bewegung der Domänen so schnell erfolgt, dass in einem Fluoreszenzereignis mehrmals zwischen der offenen und der geschlossenen Konformation gewechselt wird; auch dies würde zu einer breiten Verteilung der FRET-Effizienzen führen. Allerdings ist dies aufgrund der relativ kurzen Dauer der einzelnen Ereignisse eher unwahrscheinlich und konnte in exemplarisch analysierten Ereignissen nicht beobachtet werden. Zudem sinkt nach der Zugabe von RNA und Nukleotiden die Gesamtzahl der Ereignisse deutlich. Ein Grund ist der etwas erhöhte Untergrund nach Zugabe von RNA, über dem Fluoreszenzsignale nicht mehr so gut detektiert werden. Außerdem sinkt mit der Messdauer die Zahl an Ereignissen, vermutlich durch Bleichen und langsame Adsorption des markierten YxiN an die Oberflächen. Da die Messung mit beiden Substraten nach einer entsprechenden Messung mit nur einem Substrat erfolgte, ist das

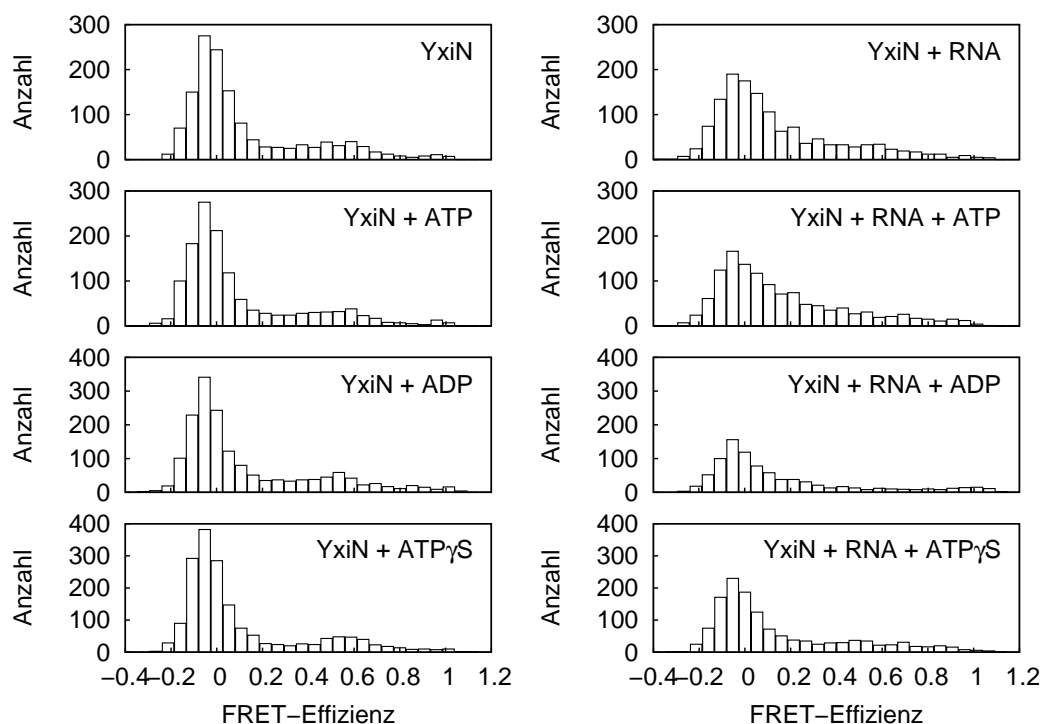


Abbildung 3.22: Histogramme der FRET-Effizienzen der ersten Markierung von YxiN* S108C E224C. Das in Abb. 3.21 deutlich zu erkennende Maximum ist hier nur schwach bei den Messungen von YxiN und YxiN in Anwesenheit der Nukleotide zu beobachten. Insgesamt ist die Signalstärke zu gering, um eine zuverlässige Aussage zu machen. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur in 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 7,5 mit einer Anregungsleistung von 5,1 kW·cm⁻² für 20 Minuten. Die Proteinkonzentration betrug 70 pM, die Konzentration an Alexa488 war 30 pM. 2 mM Nukleotid und 150 nM 154b-RNA wurden eingesetzt.

Bleichen in diesen Messungen eventuell schon weiter fortgeschritten.

In Abbildung 3.22 ist die analoge Messung mit dem anderen Markierungsansatz der gleichen YxiN-Mutante gezeigt. Auch hier kann das Maximum bei einer FRET-Effizienz von etwa 0,6 bei der Messung des Proteins identifiziert werden. Allerdings ist die Zahl der Ereignisse deutlich geringer und das Maximum damit sehr viel undeutlicher, während das Maximum bei einer FRET-Effizienz von -0,05 ähnlich viele Ereignisse zeigt wie in der anderen Messung. Eine genauere Auswertung dieser Meßreihe ist daher nicht möglich. Das zeigt deutlich, wie wichtig eine passende Markierung ist. In diesem Fall zeigt das Protein mit dem insgesamt geringeren Markierungsgrad den deutlich besser detektierbaren Effekt. Vermutlich ist der Anteil des nur mit Alexa488 markierten Proteins geringer.

Bei dieser YxiN-Mutante konnte also bei der Bindung von Nukleotiden keine Änderung der Konformation des Proteins beobachtet werden. Die Bindung von RNA hingegen führt zu einer Änderung; diese wird auch bei der zusätzlichen Bindung von Nukleotiden aufrechterhalten.

Aufgrund der zu breiten und zu undeutlichen Verteilung der FRET-Effizienzen ist es nicht möglich, Abstände in dieser zweiten Konformation zu bestimmen.

YxiN* S108C S229C

Mit YxiN* S108C S229C wurde eine gerichtete Markierung erhalten. Alexa488 befand sich bevorzugt in der C-terminalen Domäne, TMR in der N-terminalen Domäne (vgl. Abb. 3.15, Seite 78). Die Eigenschaften dieser YxiN-Mutante finden sich in Tabelle 3.12.

Die zugehörige Meßreihe ist in Abbildung 3.23 gezeigt. Die Histogramme für YxiN ohne Substrat und in Gegenwart von Nukleotiden zeigen ein Maximum. Dieses liegt bei einer FRET-Effizienz von 0,47; dies entspricht einem Abstand von 6,6 nm ($R_0 = 6,5$ nm). Da die Markierung in dieser YxiN-Mutante gerichtet erfolgte, muss der R_0 von 6,5 nm verwendet werden; bei Verwendung von $R_0 = 6,1$ nm würde sich allerdings nur ein geringfügig anderer Abstand von 6,2 nm ergeben. Die Bindung von Nukleotiden ändert diesen Wert kaum. In Gegenwart von ATP beträgt die FRET-Effizienz 0,45 und der Abstand 6,7 nm, bei ADP-Bindung 0,48 und 6,6 nm, bei der Zugabe von ATP γ S 0,49 und 6,5 nm. YxiN scheint hier in einer offenen Konformation vorzuliegen. Die gemessenen Abstände liegen zwischen den aus den Homologiemodellen für eine offene Konformation bestimmten Werten.

Die Bindung von RNA führt zu einer deutlichen Änderung. Es sind zwei Maxima bei einer FRET-Effizienz von 0,47 und 0,89 zu erkennen, wobei mehr Signale mit der geringeren FRET-Effizienz auftreten. Dies entspricht Abständen von 6,6 nm und 4,6 nm. Die offene Konformation bleibt also erhalten, und es bildet sich eine zweite, geschlossene Konforma-

Tabelle 3.12: Eigenschaften von YxiN* S108C S229C.

| Parameter | Wert | vgl. Kapitel |
|----------------------------|--|--------------|
| app. K_D (RNA) | 2,9 nM | 3.8.1 |
| K_M (ATP) | 5800 μ M | |
| Erwartete Abstände | | 3.9.2 |
| offen | 7,7 nm bzw. 5,5 nm | |
| geschlossen | 4,6 nm bzw. 5,8 nm | |
| Förster-Abstand | | 3.10 |
| Alexa488 an Position S108C | 6,1 nm | |
| Alexa488 an Position S229C | 6,5 nm | |
| Markierung | | 3.9.2 |
| Markierungsgrad | 0,66 Alexa488, 0,87 TMR | |
| Richtung | Alexa488 an Position S229C, TMR an Position S108C | |

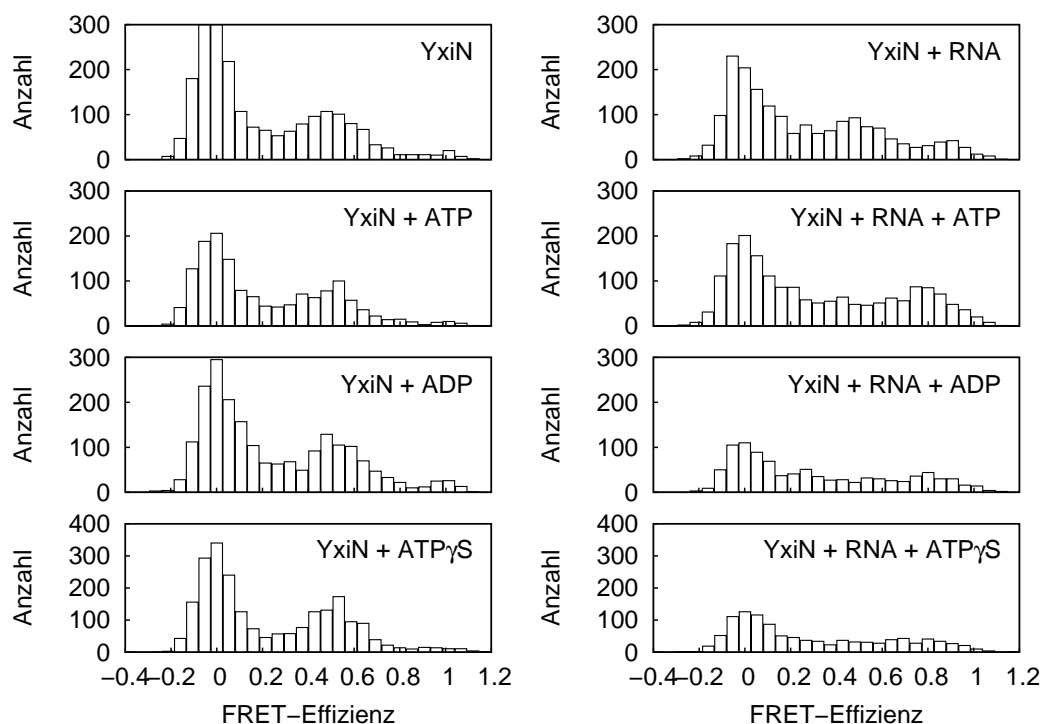


Abbildung 3.23: Histogramme der FRET-Effizienzen von YxiN* S108C S229C Alexa488 TMR. YxiN allein und in Anwesenheit von Nukleotiden zeigt ein einzelnes Maximum. Bei der Bindung von RNA sind zwei Maxima zu erkennen, die einer geöffneten und einer geschlossenen Konformation entsprechen könnten. Die Zugabe von Nukleotiden ändert die relativen Intensitäten dieser beiden Maxima. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur in 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 7,5 mit einer Anregungsleistung von 5,1 kW·cm⁻² für 20 Minuten. Die Proteinkonzentration betrug 60 pM, die Konzentration an Alexa488 war 40 pM. 2 mM Nukleotid und 150 nM 154b-RNA wurden eingesetzt.

tion. Der Abstand der Fluorophore in dieser Konformation von 4,6 nm stimmt mit dem Abstand, der aus dem Homologiemodell nach dem menschlichen UAP56 für diese Positionen bestimmt wurde, überein. In Gegenwart von RNA und Nukleotiden sind jeweils keine sehr deutlichen Maxima zu erkennen. Tendenziell scheint sich jedoch in allen drei Fällen vor allem das Verhältnis der in Gegenwart von RNA bereits beobachteten Maxima zu verschieben. Bei der zusätzlichen Bindung von ATP wird die geschlossene Konformation stärker populiert. Aufgrund der ATP-Hydrolyserate von YxiN bei diesen Bedingungen und dem großen Überschuss an Nukleotid ist nicht zu erwarten, dass das ATP bereits im Lauf der Messung zu einem nennenswerten Anteil hydrolysiert wird. Eine Betrachtung der ersten Minuten der Messung ergab keinen klaren Unterschied zur Gesamtmessung; allerdings ist die Zahl der Ereignisse dann sehr gering. Die Messungen mit ADP und ATP γ S zeigen kein eindeutiges Maximum, so dass von einer Bewegung der Domänen oder einer breiten Verteilung der Konformationen ausgegangen werden kann.

Mit dieser YxiN-Mutanten konnten also eindeutig zwei Konformationen unterschieden werden, wobei die kompaktere Konformation nur in Gegenwart von RNA zu beobachten war.

YxiN* A115C S229C

Die Markierung dieser YxiN-Mutante ergab einen hohen Markierungsgrad; zudem zeigte die Markierung ein gewisses Maß an Orientierung. Die Eigenschaften der Mutante sind in Tabelle 3.13 zusammengefasst.

In Abbildung 3.24 ist die zugehörige Meßreihe gezeigt. YxiN zeigt ein Maximum der FRET-Effizienz, das auch in Gegenwart von Nukleotiden erhalten bleibt. Allerdings ist dieses Maximum nicht sehr ausgeprägt und seine Lage nicht genau zu bestimmen, da es sich auch mit den Ausläufern des Maximums bei einer FRET-Effizienz von -0,05 überlagert. Die Anpassung einer Gauss-Kurve an die Messung mit YxiN ergibt eine FRET-Effizienz von 0,30 für das Maximum; das würde einem Abstand von 7,3 nm entsprechen (Förster-Abstand von 6,3 nm aufgrund der Orientierung; bei 6,5 nm wären es 7,5 nm). Bei der Bindung von RNA verteilen sich die gemessenen FRET-Effizienzen noch weiter. Es wäre möglich, dass in Gegenwart von RNA und ATP ein drittes Maximum bei einer höheren FRET-Effizienz auftritt. Allerdings ist die Zahl der Ereignisse an dieser Stelle zu gering, um eine definitive Aussage zu machen.

Trotz der eigentlich vielversprechenden Markierungseffizienz und -orientierung konnte also mit dieser Mutante keine definitive Konformationsänderung beobachtet werden.

Tabelle 3.13: Eigenschaften von YxiN* A115C S229C.

| Parameter | Wert | vgl. Kapitel |
|----------------------------|--|--------------|
| app. K_D (RNA) | 8,7 nM | 3.8.1 |
| K_M (ATP) | 2280 μ M | |
| Erwartete Abstände | | 3.9.2 |
| offen | 8,2 nm bzw. 6,1 nm | |
| geschlossen | 5,4 nm bzw. 6,7 nm | |
| Förster-Abstand | | 3.10 |
| Alexa488 an Position A115C | 6,3 nm | |
| Alexa488 an Position S229C | 6,5 nm | |
| Markierung | | 3.9.2 |
| Markierungsgrad | 0,69 Alexa488, 1,03 TMR | |
| Richtung | Alexa488 bevorzugt an Position S229C, TMR bevorzugt an Position A115C | |

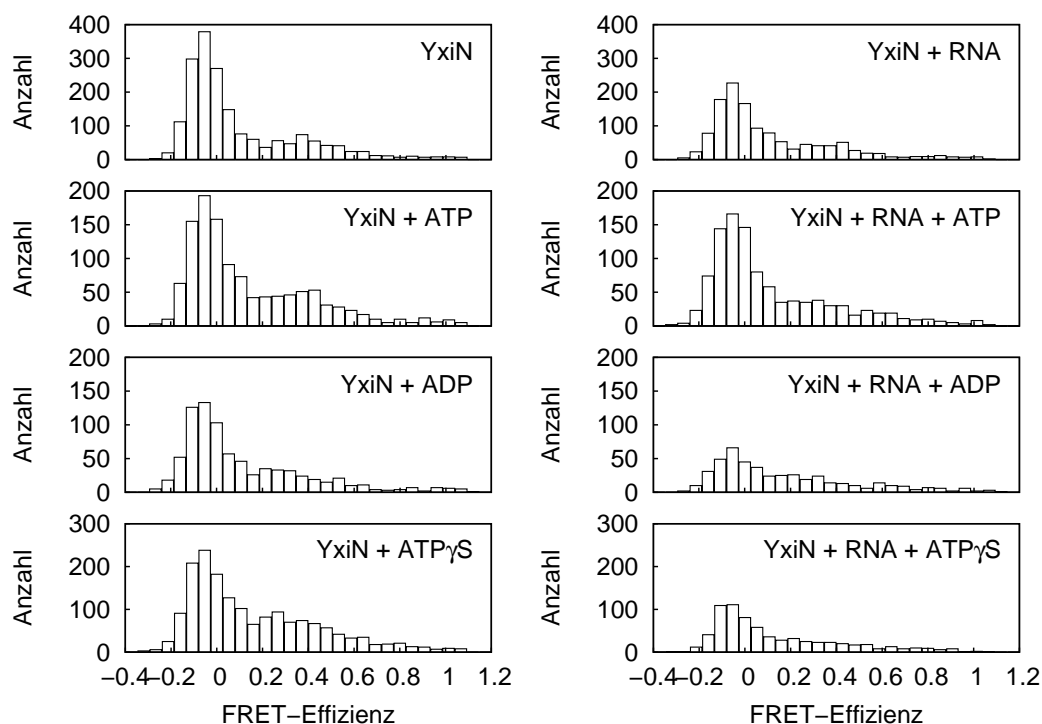


Abbildung 3.24: Histogramme der FRET-Effizienzen von YxiN* A115C S229C Alexa488 TMR. Es ist ein Maximum bei einer FRET-Effizienz von 0,30 zu erkennen, das auch bei der Bindung von Nukleotiden erhalten bleibt. Bei der Bindung von RNA verbreitert sich dieses Maximum, eine genaue Analyse ist nicht mehr möglich. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur in 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 7,5 mit einer Anregungsleistung von 5,1 kW·cm⁻² für 20 Minuten. Die Proteinkonzentration betrug 43 pM, die Konzentration an Alexa488 war 30 pM. 2 mM Nukleotide und 150 nM 154b-RNA wurden eingesetzt.

YxiN* S108C I275C

Die Eigenschaften dieser YxiN-Mutante sind in Tabelle 3.14 zusammengefasst. Die Markierung ergab eine deutlich effizientere Reaktion mit Alexa488 als mit TMR. Dies sieht man auch an den Messungen in Abbildung 3.25 an der sehr hohen Intensität des Maximums bei einer FRET-Effizienz von -0,05. Ganz schwach ist in den Messungen von YxiN und in Gegenwart von Nukleotiden ein zweites Maximum mit einer FRET-Effizienz von etwa 0,6 zu sehen. Bei der RNA-Bindung scheint sich dieses Maximum wiederum zu verbreitern oder in zwei Maxima aufzuspalten; eine genaue Analyse ist aufgrund der geringen Zahl an Ereignissen nicht möglich. Zudem ergibt sich für diese YxiN-Mutante für den Donor an den beiden möglichen Positionen ein deutlich unterschiedlicher Förster-Abstand. Dies führt, wie bereits bei der Mutante YxiN* Q47C I275C erläutert, zu einer Verbreiterung der Verteilung der FRET-Effizienzen. In dieser YxiN-Mutante war also der beobachtete Energietransfer zu gering, um Konformationsänderungen verfolgen zu können.

Tabelle 3.14: Eigenschaften von YxiN* S108C I275C.

| Parameter | Wert | vgl. Kapitel |
|----------------------------|-------------------------|--------------|
| app. K_D (RNA) | 11,5 nM | 3.8.1 |
| K_M (ATP) | 1680 μ M | |
| Erwartete Abstände | | 3.9.2 |
| offen | 5,8 nm bzw. 3,4 nm | |
| geschlossen | 2,2 nm bzw. 3,1 nm | |
| Förster-Abstand | | 3.10 |
| Alexa488 an Position S108C | 6,1 nm | |
| Alexa488 an Position I275C | 5,3 nm | |
| Markierung | 0,95 Alexa488, 0,53 TMR | 3.9.2 |

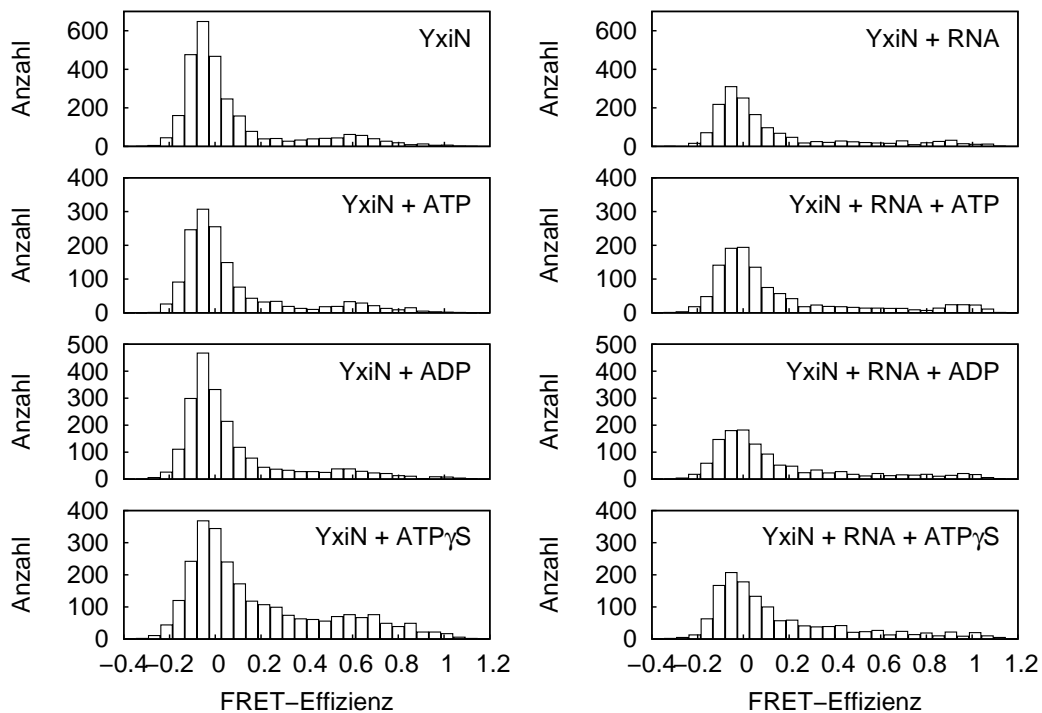


Abbildung 3.25: Histogramme der FRET-Effizienzen von YxiN* S108C I275C Alexa488 TMR. Die Histogramme werden deutlich von dem Maximum bei einer FRET-Effizienz von $-0,05$ dominiert. Die zu erkennenden Signale bei höheren FRET-Effizienzen sind zu schwach, um eine klare Interpretation zu erlauben. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur in 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 7,5 mit einer Anregungsleistung von $5,1 \text{ kW}\cdot\text{cm}^{-2}$ für 20 Minuten. Die Proteinkonzentration betrug 32 μ M, die Konzentration an Alexa488 war 30 μ M. 2 mM Nucleotide und 150 nM 154b-RNA wurden eingesetzt.

Zusammenfassung der Einzelmolekülexperimente

Mit zwei der untersuchten doppelt markierten YxiN-Mutanten konnte in Einzelmolekülexperimenten Energietransfer beobachtet werden. Messungen mit zwei verschiedenen Mar-

kierungsansätzen von YxiN* S108C E224C haben gezeigt, dass nicht nur die zugrunde liegende YxiN-Mutante, sondern vor allem die Markierung einen deutlichen Einfluß darauf hat, ob Energietransfer beobachtet werden kann.

Mit dem zweiten Markierungsansatz von YxiN* S108C E224C konnten deutliche Änderungen der FRET-Effizienz beobachtet werden. Messungen mit YxiN* S108C S229C stimmten mit diesen Änderungen überein, waren aber nicht so eindeutig zu interpretieren. Es wurden zwei unterscheidbare Konformationen beobachtet. Ohne Substrate liegt YxiN in einer offeneren Konformation vor. Die Zugabe von Nukleotiden beeinflusst die Abstände nicht und induziert daher vermutlich keine Bewegung. Die Bindung von RNA hingegen führt in einem Teil der Moleküle zum Schließen der Struktur. In Gegenwart von ATP und RNA scheint die geschlossene Konformation stärker populiert zu sein. Die Zugabe von Nukleotiden führt in Gegenwart von RNA zu einer breiteren Verteilung der Abstände. Im katalytischen Zyklus der RNA-Helikase YxiN treten also deutliche Konformationsänderungen auf.

Kapitel 4

Diskussion

RNA-Helikasen sind an allen Prozessen in der Zelle beteiligt, in denen RNA eine Rolle spielt. Ihre Funktion ist dabei die Aufhebung von RNA-Sekundärstrukturen und RNA-Protein-Wechselwirkungen. In dieser Arbeit wurde die RNA-Helikase YxiN aus *Bacillus subtilis* mittels Einzelmolekül-FRET-Experimenten untersucht, um Hinweise auf konformationelle Änderungen im katalytischen Zyklus der RNA-Entwindung zu erhalten. Im folgenden wird gezeigt, dass das als Fusionsprotein gereinigte YxiN dem in der Literatur beschriebenen rekombinanten YxiN entspricht und dem homologen Protein DbpA aus *Escherichia coli* ähnelt. Anschließend wird der Effekt der Einführung von Cystein-Mutanten auf YxiN und die Markierung von YxiN mit zwei verschiedenen Farbstoffen diskutiert. Mit Einzelmolekül-FRET-Experimenten konnten zwei verschiedene Konformationen von YxiN identifiziert werden. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wird ein modifiziertes Modell für den Mechanismus der RNA-Helikase YxiN vorgeschlagen. Abschließend werden weiterführende Ideen, vor allem für die Überprüfung des vorgeschlagenen Modells, zusammengestellt.

4.1 Biochemische Charakterisierung von YxiN

In diesem Abschnitt werden die Eigenschaften von YxiN, vor allem die Substratbindung und Aktivität, zusammengefasst und mit den Literaturwerten verglichen. Ein Vergleich mit den Eigenschaften von DbpA, einer zu YxiN homologen Helikase aus *Escherichia coli*, die biochemisch gut charakterisiert ist, zeigt, dass sich beide Proteine stark ähneln.

4.1.1 Rekombinantes YxiN kann in nativer Form aus *Escherichia coli* gereinigt werden

Voraussetzung für die Untersuchung von YxiN war die Produktion und Reinigung ausreichender Mengen des nativen Proteins. YxiN wurde als Fusionsprotein mit der Glutathion-S-Transferase in *Escherichia coli* produziert und über Affinitätschromatographie und Größenausschlußchromatographie gereinigt. Die Ausbeute schwankte zwischen 0,1 mg/l und 7 mg/l Zellkultur und war hauptsächlich abhängig von der Effektivität des Zellaufschlusses, der Aggregationstendenz der entsprechenden YxiN-Mutante und der Effektivität der Spaltung des Fusionsproteins mit der TEV-Protease. Von der Größenausschlußchromatographiesäule eluierte YxiN als Monomer.

Der Mittelpunkt der thermischen Entfaltung des gereinigten YxiN lag bei 60°C. Die Fluoreszenz der aromatischen Aminosäuren im nativen Zustand und in Gegenwart von Denaturierungsmittel unterscheidet sich deutlich. Beide Experimente zeigen, dass das gereinigte, rekombinante YxiN gefaltet vorliegt.

4.1.2 YxiN bindet RNA und Adenin-Nukleotide

Voraussetzung für die Funktion als RNA-Helikase ist die Bindung von ATP und RNA durch YxiN. Für den Komplex aus YxiN und dem kurzen RNA-Substrat (9b und 32b-Fragment) wurde bei 25°C eine Dissoziationskonstante von 5,0 nM abgeschätzt. Dies stimmt gut mit der Dissoziationskonstante von 4,6 nM überein, die von Karginov *et al.* (2005) aus einem Gelretardationsexperiment mit dem 32b Fragment bestimmt wurde. Die apparente Dissoziationskonstante, die aus RNA-abhängigen ATPase-Tests bei 37°C mit dem 154b RNA-Fragment bestimmt wurde, ist mit 10,0 nM etwas höher. Von Kossen und Uhlenbeck (1999) wurde hierfür ein Wert von 2,8 nM gemessen. Für das kurze RNA Fragment wurde von Kossen *et al.* (2002) mit Messungen unter ähnlichen Bedingungen eine apparente Dissoziationskonstante von 6 nM bestimmt. Wird die Temperatur von 37°C auf 25°C gesenkt, steigt dieser Wert auf 20 nM (Kossen *et al.*, 2002) bzw. 31 nM (Karginov *et al.*, 2005). Die RNA-Bindung von DbpA liegt mit Dissoziationskonstanten zwischen 0,44 nM (Polach und Uhlenbeck, 2002) und 700 nM (Tsu *et al.*, 2001) im gleichen Bereich und hängt von der Größe des verwendeten RNA-Fragments und der Messmethode ab.

Bei der gleichen Temperatur liegt die apparente Dissoziationskonstante aus ATPase-Tests etwas höher als die direkt gemessene Dissoziationskonstante. Dieser Effekt wurde von Polach und Uhlenbeck (2002) für DbpA in stärkerem Ausmaß beobachtet und ist darauf zurückzuführen, dass in der indirekten Bestimmung der Dissoziationskonstanten durch ATPase-

Experimente nicht nur die Bindung von RNA, sondern auch spätere Schritte des katalytischen Zyklus eine Rolle spielen können. Für weitere Aussagen müsste die RNA-Bindung direkt unter verschiedenen Bedingungen gemessen werden.

Die Bindung von Adenin-Nukleotiden durch YxiN in Abwesenheit von RNA wurde mittels Fluoreszenz-Gleichgewichts-Titration untersucht. Die Dissoziationskonstante des ADP-YxiN-Komplexes beträgt bei 20°C 70 μM . Die Bindung von ATP ist etwas schwächer, der K_D beträgt 310 μM . Dieser Wert entspricht dem in ATP-abhängigen ATPase-Experimenten gemessenen K_M von 370 μM in Anwesenheit von 154b-RNA und bei 37°C. Dies entspricht auch den K_M -Werten, die von Kossen und Uhlenbeck (1999) (235 μM) und Karginov *et al.* (2005) (210 μM) gemessen wurden. Der K_M -Wert steigt, wenn bei den ATPase-Experimenten nicht das 154b-Fragment, sondern ein kleineres, 81 Basen umfassendes Fragment eingesetzt wird (Kossen und Uhlenbeck, 1999). Ein solcher Effekt würde aufgrund der Ähnlichkeit der Werte aus den ATPase-Experimenten (in Gegenwart von 154b-RNA) und der Fluoreszenztitration (in Abwesenheit von RNA) nicht erwartet werden und ist möglicherweise ein Hinweis darauf, dass der K_M -Wert nicht ausschließlich die ATP-Bindung widerspiegelt.

Die Dissoziationskonstante des ATP γ S-YxiN-Komplexes von 370 μM entspricht dem Wert für ATP. Die Bindung von AMPPNP hingegen ist deutlich geschwächt; die Dissoziationskonstante liegt über 1 mM. Dieser Effekt wurde von Polach und Uhlenbeck (2002) in Filterbindungsexperimenten auch für DbpA beobachtet. Der K_D des ATP-DbpA-Komplexes liegt bei 36 μM und ähnelt dem Wert für den ADP-DbpA-Komplex von 44 μM . Der AMPPNP-DbpA-Komplex hat eine Dissoziationskonstante von über 1,3 mM. In Gegenwart der 154b-RNA sinkt diese Dissoziationskonstante auf 21 μM . Die direkte Messung der ATP-Bindung in Gegenwart von RNA ist aufgrund der hohen RNA-stimulierten ATP-Hydrolyserate nicht möglich. Die stärkere Bindung von AMPPNP durch DbpA in Gegenwart von RNA lässt jedoch vermuten, dass auch die ATP-Bindung durch RNA verstärkt werden könnte. Mit Fluoreszenz-Gleichgewichts-Titration wurde von Talavera und Cruz (2005) auch für DbpA eine schwächere Bindung von ATP ($K_D \approx 400 \mu\text{M}$) beobachtet.

Die Substratbindung des in dieser Arbeit verwendeten YxiN ähnelt also den in der Literatur beschriebenen Werten, zudem verhält sich YxiN ähnlich wie DbpA. Die Bindung von RNA erfolgt mit hoher Affinität, die Bindung von Adennukleotiden ist mindestens um einen Faktor 1000 schwächer. Die aus ATP-Hydrolyse-Experimenten bestimmten Werte für die apparente Dissoziationskonstante von RNA bzw. die K_M -Werte für ATP stimmen mit den direkt für die Bindung bestimmten Werten überein und sollten ein gutes Maß für die Bindung der jeweiligen Substrate sein.

4.1.3 YxiN ist eine RNA-abhängige ATPase

Die ATPase-Aktivität von YxiN wird durch RNA stimuliert. Die maximale Hydrolyserate in Gegenwart von RNA beträgt $4,6 \text{ s}^{-1}$ und ist damit etwas höher als der Literaturwert von $3,0 \text{ s}^{-1}$ (Kossen und Uhlenbeck, 1999) bzw. $3,5 \text{ s}^{-1}$ (Kossen *et al.*, 2002). Die Hydrolyserate ist von der Temperatur abhängig und bei 25°C um einen Faktor 2,5 geringer als zwischen 35°C und 40°C . Die maximale ATP-Hydrolyserate von DbpA liegt mit 10 s^{-1} (Tsu und Uhlenbeck, 1998) unter geringfügig anderen Bedingungen etwas höher. Auch für DbpA wurde von Tsu und Uhlenbeck (1998) ein starker Anstieg der Aktivität zwischen 5°C und 42°C beschrieben.

Der unterschiedliche Einfluß der verschiedenen RNA-Substrate auf die ATPase-Aktivität wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Das kurze 32b RNA-Fragment zeigt bei 37°C keine stabile Sekundärstruktur, entsprechende Untersuchungen können also nur bei niedrigeren Temperaturen durchgeführt werden. Kossen *et al.* (2002) haben bei 25°C mit dem kurzen RNA-Substrat eine maximale ATP-Hydrolyserate von $0,68 \text{ s}^{-1}$ bestimmt; das ist etwa ein Fünftel der bei 37°C und mit dem 154b RNA-Fragment bestimmten Rate. Für DbpA hingegen wurden nur geringe Änderungen der maximalen ATP-Hydrolyserate, aber eine deutlich verringerte apparente Bindung des 32b-Fragment gegenüber dem 154b-Fragment beobachtet (Tsu *et al.*, 2001).

Die in dieser Arbeit gezeigte RNA-abhängige ATPase-Aktivität stimmt also gut mit den Literaturwerten überein. Auch hier verhält sich YxiN ähnlich wie DbpA. Das verwendete YxiN ist aktiv; die für die Produktion und Reinigung eingeführten beiden zusätzlichen N-terminalen Aminosäuren beeinflussen die ATPase-Aktivität nicht.

4.1.4 YxiN ist eine ATP-abhängige RNA-Helikase

Der Verlauf der RNA-Entwindung durch Helikasen wird im Allgemeinen mit Hilfe radioaktiv markierter RNA oder DNA beobachtet. In dieser Arbeit wurde ein auf Fluoreszenz basierender alternativer Helikase-Test entwickelt.

Die Beobachtung der Aktivität einer DNA-Helikase anhand von Fluoreszenzanisotropie wurde von Xu *et al.* (2003) beschrieben. Ein ähnlicher Versuch zur Untersuchung der Helikase-Aktivität von DbpA und YxiN mit Fluoreszein-markierter 9b-RNA wurde von Nachtmann (2003) durchgeführt. Ein deutlicher Anstieg der Anisotropie der Fluoreszenz bei der Bildung des Doppelstranges mit dem 32b-RNA-Fragment sowie ein geringer Anstieg der Anisotropie bei der Bindung der RNA durch YxiN konnte beobachtet werden. Allerdings sank die Anisotropie bei der Zugabe von ATP nicht wie erwartet auf den Wert des freien Ein-

zelstranges ab, sondern erreichte einen Anisotropiewert ähnlich zu dem des Doppelstrangs. Eine Freisetzung der doppelsträngigen RNA von YxiN durch ATP-Bindung ist unwahrscheinlich; vermutlich wurde lediglich ein geringer Teil der RNA tatsächlich entwunden. Dennoch ist eine eindeutige Interpretation dieses Aktivitätstests für YxiN so nicht möglich. Daher wurde die Fluoreszenzanisotropie in dieser Arbeit nicht näher untersucht.

Eine Alternative ist die Beobachtung der Fluoreszenzintensität eines Reporterfluorophors. In dieser Arbeit wurden verschiedene fluoreszenzmarkierte RNA-Konstrukte eingesetzt, um diese Möglichkeit zu untersuchen. Unter den getesteten Bedingungen konnte keines dieser Konstrukte verwendet werden, um RNA-Entwindung zu beobachten. Prinzipiell sollte ein solcher Aktivitätstest möglich sein; vermutlich wurden nicht die richtigen Reaktionsbedingungen zur vollständigen Entwindung der RNA-Konstrukte durch YxiN gefunden.

Die Analyse radioaktiv markierter RNA erfolgt üblicherweise in Polyacrylamidgelen. Die Analyse fluoreszenzmarkierter Moleküle in Polyacrylamidgelen durch Anregung unter UV-Licht wurde von Huang *et al.* (2004) für das mit verschiedenen Alexa-Farbstoffen markierte Capsid des Bakteriophagen T7 beschrieben. Eine entsprechende Analyse fluoreszenzmarkierter RNA in Polyacrylamidgelen ermöglicht die Untersuchung der RNA-Helikase-Aktivität von YxiN. Die von Kossen *et al.* (2002) in klassischen Tests mit YxiN nachgewiesene ATP-abhängige RNA-Helikase-Aktivität konnte auch mit dieser Methode gezeigt werden. Der fluoreszenzbasierte Helikase-Test bietet also eine Alternative zu den auf Radioaktivität basierenden Experimenten.

In Abschnitt 3.8.2 wurde die ATP-abhängige Entwindung von RNA durch YxiN gezeigt. Betrachtet man die Kinetik dieser Reaktion, so erhält man eine monoexponentielle Reaktion mit einer Ratenkonstante von $0,013 \pm 0,001 \text{ s}^{-1}$. Die Rate der RNA-Entwindung liegt damit etwa um einen Faktor 400 unter der maximalen ATP-Hydrolyserate von $4,6 \text{ s}^{-1}$. Berücksichtigt man, dass die Reaktionsbedingungen (kurzes RNA-Substrat, 25°C) eine Reduktion der ATP-Hydrolyserate etwa um einen Faktor fünf erwarten lassen, würde dies immer noch bedeuten, dass für die Entwindung eines RNA-Stranges 80 ATP-Moleküle hydrolysiert werden. Für DbpA wurde von Tsu und Uhlenbeck (1998) ein Verhältnis von 70 ATP-Molekülen pro Doppelstrang-Entwindung abgeschätzt. Polach und Uhlenbeck (2002) haben die geringe Effizienz der Entwindung dem Fehlen des für die Kooperativität von ATP- und RNA-Bindung notwendigen RNA-Elements (Helix 89) zugeschrieben, das in dem 154b RNA-Fragment der am 5'-Ende gelegenen Sequenz entspricht, aber in dem 32b Fragment fehlt.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass das in dieser Arbeit verwendete YxiN in seinen Eigenschaften gut mit den Literaturwerten für YxiN übereinstimmt. YxiN zeigt in seinen biochemischen Eigenschaften deutliche Ähnlichkeit zu dem gut charakterisierten DbpA.

4.2 Markierung von YxiN mit Alexa488 und TMR

Für Einzelmolekül-FRET-Experimente musste YxiN mit zwei verschiedenen Farbstoffen markiert werden. Im Folgenden wird zunächst die Auswahl der hierfür notwendigen Mutationen und deren Einfluß auf die Stabilität und Aktivität von YxiN zusammengefasst. Anschließend wird der Unterschied der Reaktivität von Cysteinen mit DTNB und TMR-Maleimid diskutiert. Das Ergebnis der Markierungsversuche wird zusammengefasst und der Erfolg der verschiedenen Markierungsstrategien bewertet. Auch die Bedeutung von Richtung und Effizienz der Markierung für die Einzelmolekülexperimente wird diskutiert.

4.2.1 Die Entfernung der zugänglichen Cysteine in YxiN führt zu einer reduzierten Stabilität und Aktivität

Der Wildtyp von YxiN enthält vier Cysteine, von denen zwei im nativen Zustand für DTNB zugänglich sind. Diese beiden wurden vor der Einführung weiterer Cysteine für die Markierung durch Serin ersetzt. Die resultierende Ausgangsmutante YxiN C61S C267S (YxiN*) ist geringfügig destabilisiert und der Mittelpunkt der thermischen Denaturierung um 4°C erniedrigt. In Fluoreszenz-Gleichgewichts-Titrations zeigt YxiN* ähnliche Nukleotidbindung wie YxiN wt (vgl. Abschnitt 3.5.1), und der K_M -Wert aus den ATPase-Experimenten stimmt mit dem Wert für den Wildtyp überein. Die RNA-Bindung wurde nicht direkt gemessen. Die geringere apparente Dissoziationskonstante K_{app} für RNA aus den ATPase-Experimenten legt eine etwas festere RNA Bindung als im Wildtyp nahe. Die maximale ATP-Hydrolyserate ist um einen Faktor fünf von 4,59 s⁻¹ auf 0,97 s⁻¹ reduziert. Dennoch ist deutlich die RNA-abhängige ATPase-Aktivität zu beobachten.

Die RNA-Helikase-Aktivität wurde nur unter Standardbedingungen überprüft. Hierbei ist der Anteil an Doppelstrang, der entwunden wird, etwas geringer als der von YxiN wt entwundene Anteil. Vermutlich ist das auf eine reduzierte Geschwindigkeit der Entwindung zurückzuführen. Es ist aber auch möglich, dass der Anteil an Doppelstrang, der von YxiN* unter diesen Bedingungen entwunden werden kann, geringer ist als für YxiN wt. Ohne eine Untersuchung der Kinetik der Entwindung können diese Fälle nicht unterschieden werden. Insgesamt zeigt YxiN* gegenüber YxiN wt verringerte Stabilität und Aktivität. Die Mutante ist aber immer noch eine RNA-stimulierte ATPase und eine ATP-abhängige RNA-Helikase und eignet sich damit als Ausgangsvariante für die Einführung von Cysteinen zur Markierung mit Farbstoffen.

4.2.2 Das Homologiemodell eignet sich nur bedingt zur Auswahl oberflächenexponierter Positionen

Für die Markierung von YxiN mit Fluoreszenzfarbstoffen mussten lösungsmittelzugängliche Positionen für die Einführung von Cysteinen ausgewählt werden. Üblicherweise erfolgt die Auswahl solcher Positionen anhand der dreidimensionalen Struktur des entsprechenden Proteins. Da von den Helikasedomänen von YxiN keine Struktur bekannt ist, wurde ein Homologiemodell nach dem eukaryotischen Translations-Initiationsfaktor eIF4A zugrunde gelegt. Von den anhand dieses Homologiemodells ausgewählten 15 Positionen erwiesen sich lediglich sechs als zugänglich für das an die Farbstoffe gekoppelte Maleimid und fünf für das DTNB-Molekül. Die Vorhersage der Zugänglichkeit anhand des Homologiemodells war also nicht sehr zuverlässig. Das Problem dabei ist vermutlich, dass die oberflächenexponierten Aminosäureseitenketten in Schleifen zu den am wenigsten konservierten Elementen gehören und daher in der Homologiemodellierung deutlich schlechter vorausgesagt werden können als Sekundärstrukturen und konservierte Bereiche.

4.2.3 DTNB ist keine geeignete Referenz für die Reaktivität von Cysteinen mit farbstoffgekoppeltem Maleimid.

Die Zugänglichkeit der in YxiN eingeführten Cysteine und der beiden wildtypischen Cysteine an Position 61 und 267 wurde durch Reaktion mit DTNB und mit TMR-Maleimid getestet. Um DTNB als Referenzsubstanz für die Bestimmung der Zugänglichkeit zu verwenden, sollte die Zugänglichkeit für beide Substanzen übereinstimmen. Dies war jedoch nicht der Fall. Nur die Cysteine an Position 47 und 229 in YxiN reagierten mit DTNB und TMR-Maleimid. Mit DTNB reagierten Cysteine an fünf weiteren Positionen, mit TMR-Maleimid Cysteine an vier anderen Positionen. Die Reaktion mit DTNB ist also keine gute Referenz für die Reaktion mit Maleimid und damit für die Markierung von YxiN mit Farbstoffen. Ratner *et al.* (2002) konnten die Reaktivität mit DTNB erfolgreich als Referenz verwenden, um Cysteine mit unterschiedlicher Zugänglichkeit zu identifizieren. Allerdings konnten sie zur Auswahl lösungsmittelzugänglicher Positionen in der Adenylatkinase auf eine Struktur zurückgreifen. Vermutlich ist der Unterschied in der Reaktivität von DTNB und Maleimid zum einen in sterischen Effekten begründet; DTNB ist wesentlich kleiner als farbstoffgekoppeltes Maleimid und kann dadurch größtenteils verdeckte Positionen eher erreichen. Zum anderen können elektrostatische Effekte eine Rolle spielen: DTNB trägt bei dem verwendeten pH zwei negative Ladungen, während TMR-Maleimid keine Nettoladung trägt und die negative Ladung von Alexa488 räumlich weit von dem reaktiven Maleimid entfernt

ist. Negativ geladene Aminosäuren in der Umgebung der Cysteine können also die Reaktion mit DTNB erschweren. Tatsächlich befindet sich in einem Abstand von maximal drei Aminosäuren zu den Positionen, die für Maleimid, aber nicht für DTNB zugänglich sind, mindestens ein Glutamat oder Aspartat.

Die Reaktion von YxiN-Mutanten mit DTNB ist also keine geeignete Referenz für die Reaktivität der Cysteine mit farbstoffgekoppeltem Maleimid. Eine Überprüfung der Korrelation zwischen der Reaktivität mit DTNB und Maleimid scheint daher auch für andere Systeme empfehlenswert. Allerdings erlaubt die Markierungskinetik mit Farbstoffen in der Form, in der sie in dieser Arbeit untersucht wurde, keine Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten. Dafür wäre eine Quantifizierung der Fluoreszenz des markierten YxiN im Gel nötig.

4.2.4 Die Einführung von Cysteinen führt nur zu geringen Änderungen der Stabilität und Aktivität von YxiN.

Die Eigenschaften von YxiN dürfen sich durch die Einführung von Cysteinen für die Markierung mit Fluorophoren nicht stark verändern. Daher wurde die Stabilität und die Aktivität der YxiN-Mutanten untersucht. Die Änderung der Stabilität war gering, der Mittelpunkt des thermischen Übergangs lag für die Varianten zwischen 54°C und 58°C und ähnelt damit der Ausgangsmutante YxiN* mit einem Mittelpunkt bei 56°C. Nur die Einführung eines Cysteins an Position 238 führte zu einer deutlichen Verringerung der Stabilität. Cystein an dieser Position ist außerdem nicht für TMR-Maleimid zugänglich und die Mutante wurde daher nicht für Einzelmolekülexperimente verwendet.

Die Einführung von Cysteinen an den meisten Positionen hatte auch keinen deutlichen Einfluß auf die ATP-Hydrolyse. Lediglich für die Mutanten K70C, N239C und R288C, die alle keine Reaktion mit TMR-Maleimid zeigten, wurde eine reduzierte Aktivität gegenüber YxiN* beobachtet. Die genauere Untersuchung der RNA-abhängigen ATPase-Aktivität der tatsächlich für die Einzelmolekülmessungen verwendeten YxiN-Mutanten mit zwei zugänglichen Cysteinen ergibt Maximalwerte der ATP-Hydrolyse zwischen $0,62 \text{ s}^{-1}$ und $1,09 \text{ s}^{-1}$; dies entspricht dem Wert für YxiN* von $0,97 \text{ s}^{-1}$. Die Substratbindung hingegen wurde verändert. Die apparente Dissoziationskonstante für den RNA-YxiN-Komplex variiert zwischen 2,9 nM und 20,3 nM und ist höher als der Wert für YxiN* von 0,12 nM. Die K_M -Werte der ATP-abhängigen Messungen schwanken zwischen 590 μM und 5,8 mM. Der Wert für YxiN* beträgt 570 μM , die ATP-Bindung ist also in einigen Mutanten deutlich geschwächt. Auch die ATP-abhängige RNA-Helikase-Aktivität wurde überprüft. Der Anteil an Doppelstrang, der von den verschiedenen YxiN-Mutanten innerhalb von 30 Minuten entwunden wurde, lag zwischen 21% und 92% des Anteils, der von YxiN wt entwunden wurde. Die

YxiN-Mutanten mit zwei zugänglichen Cysteinen, die für die Einzelmolekülmessungen verwendet wurden, zeigten aber alle eine Aktivität zwischen 71% und 88% der Aktivität des Wildtyps und waren gegenüber der Ausgangsmutanten YxiN* mit einem Wert von 83% nur geringfügig reduziert.

Insgesamt zeigten die YxiN-Mutanten, die tatsächlich für die Einzelmolekülmessungen eingesetzt wurden, eine zur Ausgangsmutante YxiN* sehr ähnliche Stabilität und Aktivität. Nur die Substratbindung ist in unterschiedlichem Ausmaß geschwächt.

4.2.5 YxiN kann mit zwei verschiedenen Farbstoffen markiert werden

Für FRET-Experimente mussten zwei verschiedene Fluorophore in YxiN eingeführt werden. Dazu wurden eine Reihe von Versuchen durchgeführt. Nur in acht Markierungsansätzen wurde ein Gesamtmarkierungsgrad für Donor und Akzeptor in der Summe von mindestens eins erzielt; diese wurden für Einzelmolekülmessungen verwendet. Der theoretisch maximal mögliche Markierungsgrad von zwei wurde nicht erreicht. Dafür sind verschiedene Ursachen denkbar. Eine mögliche Ursache ist die Oxidation der Thiolgruppen. Allerdings erfolgte die Reinigung der YxiN-Mutanten unter reduzierenden Bedingungen. Die spektrale Verschiebung der Absorptionsspektren von Alexa488 und TMR in YxiN kann zu einem Fehler in der Berechnung des Markierungsgrades führen. Vermutlich ist aber vor allem die Reaktivität der Cysteine an den entsprechenden Positionen in YxiN und unter den getesteten Reaktionsbedingungen nicht ausreichend hoch, um eine vollständige Markierung zu ermöglichen. Da YxiN zu Aggregation neigt, wurden längere Reaktionszeiten und höhere Temperaturen, die die Effektivität der Markierung verbessern könnten, nicht getestet.

Trotz dieser Probleme war es möglich, doppelt markierte YxiN-Mutanten zu erzeugen, die für Einzelmolekülmessungen eingesetzt werden konnten.

4.2.6 Limitierte Proteolyse bietet eine schnelle Methode, die Orientierung der Markierungsreaktion zu überprüfen

Die spektralen Eigenschaften eines Fluorophors können abhängig von seiner Umgebung deutlich variieren. Da aber von diesen Eigenschaften der Förster-Abstand abhängt, ist es für FRET-Experimente unter Umständen wichtig, dass die Markierung nicht zufällig, sondern gerichtet erfolgt oder dass die spektralen Eigenschaften der Farbstoffe nicht von der Position im Protein abhängen. Daher ist eine Methode zur Überprüfung der Orientierung der Fluorophore in YxiN wichtig. Im Allgemeinen ist die Orientierung entweder bekannt, da die verschiedenen einzeln markierten Spezies nach dem ersten Markierungsschritt durch

chromatographische Trennung identifiziert und getrennt werden können (Lillo *et al.*, 1997; Ratner *et al.*, 2002), oder sie wird ignoriert (Margittai *et al.*, 2003); dann werden oft nur Abstandsänderungen untersucht und keine absoluten Abstände bestimmt (Antikainen *et al.*, 2005). Eine Methode zur Überprüfung der Markierung ist die Analyse von Proteinfragmenten mittels Massenspektrometrie (Taylor *et al.*, 2002).

Die limitierte Proteolyse markierter Proteine und die anschließende Analyse der Fluoreszenz der Fragmente in einem SDS-Polyacrylamidgel bietet eine schnelle und unkomplizierte Möglichkeit, die Orientierung der Markierung zu überprüfen. Da YxiN durch Thermolysin vor allem in zwei Fragmente gespalten wird, die der N-terminalen Domäne und den beiden C-terminalen Domänen entsprechen, ist die Zuordnung einfach möglich. Die Fluoreszenz von Alexa488 und TMR kann im Gel unterschieden werden; allerdings ist keine quantitative Analyse möglich, so dass lediglich eine bevorzugte Orientierung mit Sicherheit festgestellt werden kann. Die chromatographische Trennung und spektroskopische Analyse der Fragmente würde auch eine Quantifizierung ermöglichen.

4.2.7 Die Orientierung von Fluorophoren in YxiN ist vor allem von den beteiligten Positionen abhängig

Für die Markierung von YxiN mit zwei Fluorophoren wurden verschiedene Strategien verwendet, die zu einer Orientierung der beiden Farbstoffe im Molekül führen sollte. Dies war nur in zwei von den acht untersuchten Markierungsansätzen erfolgreich. Die beiden sequentiellen Markierungsversuche mit YxiN* S108C E224C und YxiN* Q47C I275C führten zu keiner nachweisbaren Orientierung der Fluorophore in YxiN. Vermutlich waren die relativen Reaktivitäten der beiden Cysteine an den verschiedenen Positionen zu ähnlich. Wenn, wie im Falle von YxiN, eine chromatographische Trennung der an den beiden verschiedenen Positionen markierten Proteine nicht möglich ist, hat eine sequentielle Markierung damit keinen wesentlichen Vorteil gegenüber einer pseudosequentiellen Strategie. Diese führte bei insgesamt fünf Versuchen nur für YxiN* S108C S229C zu einer erfolgreichen präferentiellen Orientierung der Fluorophore.

Interessanterweise wurde für YxiN* A115C S229C eine ortsspezifische Markierung erhalten, obwohl die Markierung statistisch erfolgte, d.h. beide Farbstoffe gleichzeitig zugegeben wurden. Grund hierfür ist vermutlich eine nicht identifizierte sterische Unterscheidung der beiden Positionen durch die Farbstoffe; vermutlich aufgrund der unterschiedlichen Länge der Verbindung zwischen Maleimid und Alexa488 bzw. TMR.

Insgesamt war also für die Orientierung der Fluorophore in YxiN bei den hier durchgeführten Versuchen nicht so sehr die Markierungsstrategie als vielmehr die Reaktivität der Cysteine

an den verschiedenen Positionen entscheidend.

4.2.8 Markierungseffizienz und -orientierung sind entscheidend für Einzelmolekül-FRET-Experimente

Von den verschiedenen YxiN-Mutanten konnten nur fünf mit einer Gesamteffizienz von über eins markiert werden. Diese eigneten sich unterschiedlich gut für Einzelmolekül-FRET-Experimente (vgl. Abschnitt 3.11.4). Einen großen Einfluß zeigten die nur mit Donor markierten YxiN-Moleküle, da diese ein Maximum bei einer FRET-Effizienz von 0 verursachten, das oft sehr viel mehr Ereignisse zeigte als die interessanten Maxima bei höheren FRET-Effizienzen. Dieser Effekt trat besonders auf, wenn die Gesamtmarkierungseffizienz gering war (z.B. bei dem ersten Markierungsansatz von YxiN* S108C E224C mit einer Effizienz von 0,93 gegenüber dem zweiten Ansatz mit einer Effizienz von 1,16) oder die Markierung mit Alexa488 effizienter erfolgte als mit TMR (z.B. bei YxiN* Q47C I275C und YxiN* S108C I275C). Die Mutanten, die ein deutlich erkennbares zweites FRET-Maximum zeigten (YxiN* S108C E224C, YxiN* S108C S229C und YxiN* A115C S229C), enthielten alle mehr TMR als Alexa488. Der dritte wichtige Effekt ist die Orientierung der Fluorophore in YxiN. Diese ist nicht nur aufgrund der spektralen Eigenschaften der Farbstoffe wichtig, sondern führt auch zu einem höheren Anteil an mit Donor und Akzeptor markiertem YxiN gegenüber dem zweimal mit Donor markiertem Protein. Eine solche Orientierung wurde für YxiN* S108C S229C und YxiN* A115C S229C erreicht.

Für eine erfolgreiche Messung sollte also der Markierungsgrad mit TMR möglichst den von Alexa488 übersteigen. Die Markierung sollte insgesamt möglichst effizient und am besten gerichtet erfolgen.

4.2.9 Der Förster-Abstand hängt von der Position von Alexa488 in YxiN ab

Zur Berechnung von Abständen aus FRET-Effizienzen wird der Förster-Abstand der Farbstoffe benötigt. Dieser hängt jedoch von den spektralen Eigenschaften der Farbstoffe ab, die sich bei der Kopplung an YxiN ändern können. Das Absorptionsspektrum von TMR kann sich verschieben. Dieser Effekt konnte, wie bereits in Abschnitt 3.10 erläutert, nicht berücksichtigt werden, da eine Normierung auf die molare Extinktion nicht möglich war. Die Verwendung des Spektrums des freien Farbstoffs führt zu einer Unsicherheit in der Bestimmung des Förster-Abstands.

Ein weiterer Parameter ist die Quantenausbeute des Donors. Die Quantenausbeute von Alexa488 variiert bei der Anknüpfung an verschiedene Positionen in YxiN. Für die mei-

sten untersuchten Positionen ist dieser Einfluß allerdings gering: Die Quantenausbeute variiert zwischen 0,66 und 0,96, der berechnete Förster-Abstand schwankt dadurch zwischen 6,1 nm und 6,5 nm. Eine Ausnahme ist die Position I275C. Hier zeigt Alexa488 eine deutlich reduzierte Quantenausbeute von 0,29, der resultierende Förster-Abstand von 5,3 nm unterscheidet sich deutlich von den anderen berechneten Werten. Dies ist vor allem dann problematisch, wenn die Markierung ungerichtet erfolgt, da dann gleiche Abstände zu unterschiedlicher FRET-Effizienz führen. Sind hingegen die Förster-Abstände sehr ähnlich, so hat die Orientierung der Fluorophore in YxiN keinen großen Einfluß auf die Messung.

4.3 Einzelmolekül-FRET-Experimente zum katalytischen Zyklus von YxiN

Für den katalytischen Mechanismus von RNA-Helikasen wurden verschiedene Modelle vorgeschlagen. Zwei davon sagen deutliche Konformationsänderungen vorher. Solche Konformationsänderungen konnten mit YxiN in Einzelmolekül-FRET-Experimenten beobachtet werden. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wird eine modifizierte Form des Destabilisierungsmodells für den Mechanismus der RNA-Entwindung durch YxiN vorgeschlagen.

4.3.1 Einzelmolekül-FRET-Experimente ermöglichen die Beobachtung von Konformationsänderungen in YxiN

Da die substratbindenden Motive in RNA-Helikasen an der Oberfläche der beiden Helikasedomänen lokalisiert sind, die durch einen flexiblen Linker verbunden sind, wurde postuliert, dass es im katalytischen Zyklus der RNA-Entwindung zu einem Öffnen und Schließen des Spalts zwischen den beiden Domänen kommt. Diese Konformationsänderungen, die mit relativ großen intramolekularen Abstandsänderungen verbunden sind, wurden in dieser Arbeit mit Einzelmolekül-FRET-Experimenten mit der RNA-Helikase YxiN untersucht.

Mit drei verschiedenen markierten YxiN-Varianten konnte für das freie YxiN ein deutliches Maximum der FRET-Effizienz beobachtet werden (vgl. Abschnitt 3.11.4). Der Abstand der beiden Fluorophore, der aus dieser FRET-Effizienz berechnet werden konnte, lag in allen drei Fällen zwischen den Abständen, die aus den verschiedenen Homologiemodellen für die entsprechenden Positionen im YxiN in einer offenen Konformation vorhergesagt wurden. Diese offene Konformation blieb auch bei der Zugabe von Nukleotiden erhalten. Allerdings ist für YxiN* S108C S229C und YxiN* A115C S229C die ATP-Bindung deutlich geschwächt, so dass die verwendeten Nukleotidkonzentrationen eventuell nicht ausreichten, um YxiN mit Nukleotid zu sättigen. Daher konnten Konformationsänderungen unter

Umständen unter den verwendeten Bedingungen nicht detektiert werden. Allerdings konnte auch für YxiN* S108C E224C kein Effekt bei ATP-Bindung beobachtet werden. In dieser Mutante ist die ATP-Bindung nicht geschwächt, so dass die eingesetzte ATP-Konzentration ausreicht.

Erst bei der Zugabe von RNA konnte eine Veränderung der FRET-Effizienz und damit der Abstände von Donor und Akzeptor beobachtet werden. Nur für die Mutante YxiN* S108C S229C konnte eindeutig ein zweites FRET-Maximum detektiert werden; in den anderen Fällen ist die Zahl der Ereignisse zu gering, um eine genaue Aussage zu treffen. Dieses zweite Maximum entspricht einem Abstand der Fluorophore von 4,6 nm; dies entspricht dem Wert, der aus dem Homologiemodell nach UAP56 für den geschlossenen Zustand vorhergesagt wurde. Dennoch wäre eine Zuordnung zu diesem Modell aufgrund dieses einen Abstands voreilig, da etliche Faktoren wie die bewegliche Anknüpfung der Farbstoffe sowie die Ungenauigkeit der Förster-Abstände die Bestimmung dieses Abstandes unsicher machen.

Die geschlossene Konformation wird in Gegenwart von RNA und ATP stärker populiert. In Gegenwart von RNA und ADP bzw. ATP γ S können beide Maxima nicht mehr eindeutig identifiziert werden. Das Hauptproblem hierbei ist die geringere Zahl an detektierten Ereignissen und die Verbreiterung der Maxima durch eine Erhöhung des Untergrunds bei der Zugabe der Nukleotide, ein Effekt, der für ATP geringer ausfällt. Beeinflusst wird diese Messung eventuell durch die Hydrolyse von ATP durch YxiN. ATP γ S kann von den meisten Proteinen nicht hydrolysiert werden und eignet sich damit als Kontrolle. Allerdings kann eIF4A ATP γ S hydrolysieren (Peck und Herschlag, 2003); für YxiN liegen dazu keine Informationen vor.

In Einzelmolekül-FRET-Experimenten konnten also verschiedene Konformationen im katalytischen Zyklus der RNA-Helikase YxiN unterschieden werden.

4.3.2 Ein modifiziertes Destabilisierungsmodell für den Mechanismus der RNA-Helikase YxiN

Im Abschnitt 1.1.3 wurden drei verschiedene Modelle für den Mechanismus der RNA-Entwindung durch RNA-Helikasen vorgestellt. Das *active-rolling*-Modell erfordert eine Dimerisierung der Helikase. YxiN verhielt sich aber während der Reinigung wie ein Monomer. Für DbpA wurde die monomere Form unter verschiedenen Bedingungen und mit verschiedenen Methoden (Größenausschlusschromatographie, Sedimentationsgeschwindigkeit und Sedimentationsgleichgewicht) nachgewiesen (Nachtmann, 2003; Talavera *et al.*, 2006). Auch in Gegenwart von RNA konnte für DbpA durch chemische Vernetzung keine Dime-

risierung beobachtet werden (Talavera *et al.*, 2006). Daher trifft das *active-rolling*-Modell für diese Helikasen vermutlich nicht zu.

Das *inchworm*-Modell beschreibt eine ATP-abhängige Bewegung der Helikase entlang der RNA, die von einem Öffnen und Schließen der Domänen begleitet wird. Eine solche ATP-abhängige Konformationsänderung konnte in den FRET-Experimenten nicht beobachtet werden, was auch dieses Modell für YxiN unwahrscheinlich macht.

Das Destabilisierungsmodell geht davon aus, dass durch RNA-Bindung und ATP-Hydrolyse einige Basenpaare des RNA-Doppelstranges gelöst werden und dadurch ein kurzer Doppelstrang so destabilisiert wird, dass er dissoziieren kann. Dieses Modell bietet eine Erklärung für den Mechanismus der nicht-prozessiven Entwindung von RNA-Doppelsträngen. In Abbildung 4.1 ist eine modifizierte Form des Destabilisierungsmodells dargestellt, die aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit für die Entwindung von RNA-Doppelsträngen durch YxiN vorgeschlagen wird.

Freies YxiN (1) bindet in der N-terminalen Helikasedomäne ATP (2) und unabhängig davon in der C-terminalen RNA-Bindungsdomäne die Helix 92 des Peptidyltransferasezentrums der 23S rRNA (3,III). Beide Ereignisse beeinflussen die relative Anordnung der Helikasedomänen nicht. Allerdings ist es wahrscheinlich, dass kleinere Konformationsänderungen innerhalb der Domänen auftreten. Ist die C-terminale Domäne von YxiN an RNA gebunden, so ist die Bindung der Helikasedomänen an einzelsträngige RNA oder den Übergang vom Einzelstrang zum Doppelstrang aufgrund der räumlichen Nähe erleichtert (4,IV). Dies ist in Einklang mit den Ergebnissen von Karginov *et al.* (2005), die in Experimenten mit der C-terminalen Domäne und den beiden Helikasedomänen zeigen konnten, dass die spezifische RNA-Bindung von der C-terminalen Domäne vermittelt wird und von den Helikasedomänen unabhängig ist und dass die Helikasedomänen von YxiN in der Lage sind, sequenzunabhängig mit einer sehr viel geringeren Affinität als die C-terminale Domäne RNA zu binden. Die relativen Intensitäten der Maxima der FRET-Effizienz in den Einzelmolekülexperimenten legen nahe, dass das Gleichgewicht in Abwesenheit von ATP eher auf der Seite der offenen, nicht RNA-bindenden Konformation liegt und erst in Gegenwart von ATP auf der Seite der geschlossenen Konformation. Das würde auf eine kooperative Bindung von ATP und RNA in den Helikasedomänen hindeuten. Für DbpA konnte eine solche Kooperativität für RNA und AMPPNP gezeigt werden (Polach und Uhlenbeck, 2002), diese ist abhängig von der Art der eingesetzten RNA. Die notwendige Helix 89 ist in dem für Einzelmolekülexperimente verwendetem RNA-Substrat vorhanden. Unklar ist, ob die Bindung von ATP in der geschlossenen Konformation noch möglich ist oder ob die Bindungstasche dann unzugänglich ist (IV).

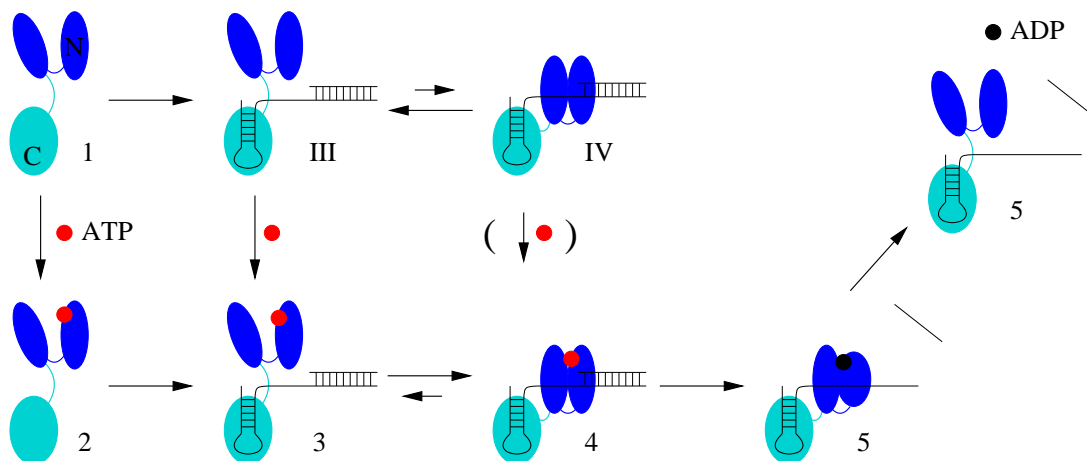


Abbildung 4.1: Modifiziertes Destabilisierungsmodell für den Mechanismus der RNA-Helikase YxiN. Das freie YxiN liegt in einer offenen Konformation vor (1). Es kann in der N-terminalen Domäne ATP (2) und in der C-terminalen RNA-Bindungsdomäne sequenzspezifisch RNA (3,III) binden, ohne die relative Anordnung der Helikasedomänen zu verändern. Erst die nicht sequenzspezifische Bindung von einzelsträngiger RNA führt zu einer geschlossenen Konformation, in der sich die beiden Helikasedomänen angenähert haben (4,IV). In Abwesenheit von ATP (III,IV) liegt das Gleichgewicht auf der Seite der offenen, nicht RNA-gebundenen Form, in Anwesenheit von ATP (3,4) ist die RNA-Bindung verstärkt. Vermutlich ist die Bindung von ATP aus sterischen Gründen nur in der offenen Konformation möglich. ATP-Hydrolyse in der RNA-gebundenen Konformation führt dann zu einer Konformationsänderung innerhalb der Helikasedomänen, die nicht mit einem Öffnen der Domänen assoziiert ist und deswegen in den FRET-Experimenten nicht detektiert werden kann. Diese Konformationsänderung führt zu einer Destabilisierung des Doppelstranges, der daraufhin dissoziiert (5). Anschließend können sich die Helikasedomänen von der RNA lösen und ADP dissoziieren (6). Die beiden Helikasedomänen sind blau dargestellt, die N-terminale Helikasedomäne ist in (1) mit N markiert. Die RNA-Bindungsdomäne ist türkis dargestellt und in (1) mit C gekennzeichnet. Als Beispiel wird das kurze RNA-Substrat aus dem 32b-Strang mit der spezifischen Bindungsstelle und dem 9 Basen langen komplementären Strang gezeigt. ATP ist als roter Kreis symbolisiert, ADP als schwarzer Kreis.

Erst wenn die Helikasedomänen von YxiN RNA und ATP gebunden haben, wird ATP hydrolysiert (5). Die Hydrolyse oder die Freisetzung von ADP und Phosphat induziert Konformationsänderungen innerhalb der Helikasedomänen. Solche nukleotidabhängigen Konformationsänderungen wurden von Henn *et al.* (2002) für DbpA gezeigt. Diese sind vermutlich nicht mit einer Änderung der relativen Anordnung der beiden Domänen verbunden, da in den Einzelmolekül-FRET-Experimenten kein Effekt bei der Bindung von Nukleotiden zu beobachten war. Durch diese Konformationsänderungen werden die Basenpaare am Übergang zwischen dem einzelsträngigen und dem doppelsträngigen Bereich destabilisiert. Eine solche Destabilisierung ist für den 9 Basenpaare langen Doppelstrang ausreichend, um eine Dissoziation hervorzurufen. Dieser Schritt entspricht dem klassischen Destabilisierungsmodell für den Mechanismus der Doppelstrang-Entwindung durch RNA-Helikasen, wie er in Abschnitt 1.1.3 vorgestellt wurde. Der genaue Ablauf der Destabilisierung und der Disso-

ziation des RNA-Einzelstranges und des ADP-Moleküls bleibt unklar.

Nach dem hier vorgeschlagenen Modell wird die C-terminale RNA-Bindungsdomäne nur benötigt, um YxiN an der richtigen Stelle in der RNA zu positionieren. Die Helikasedomänen binden dann an RNA in der näheren Umgebung und destabilisieren einige Basenpaare, wodurch eine kurze Doppelhelix dissoziieren kann. In anderen RNA-Helikasen wie eIF4A wird die Spezifität durch Bindungspartner wie eIF4B vermittelt, so dass dieses Modell auch für Helikasen ohne eigene RNA-Bindungsdomäne zutreffen kann.

4.4 Ausblick

Voraussetzung für die Untersuchung von YxiN mit Einzelmolekül-FRET-Experimenten war die Markierung mit zwei verschiedenen Fluorophoren. Eine Optimierung der Markierung bezüglich Effizienz und Orientierung der Fluorophore im Protein könnte zu deutlich klareren Ergebnissen in den Einzelmolekülexperimenten führen.

Dies könnte z.B. durch die Entwicklung einer effektiven Methode zur Trennung von einfach markiertem YxiN und von nicht und doppelt markiertem YxiN in einem sequentiellen Markierungsansatz erreicht werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die Auswahl zweier Cysteine mit sehr unterschiedlichen Reaktivitäten und die Beschleunigung des zweiten Markierungsschrittes durch eine Erhöhung der Flexibilität des Proteins mit Denaturierungsmitteln. Dann müssten jedoch die beiden noch vorhandenen Cysteine des Wildtyps durch ortsgerichtete Mutagenese entfernt werden, da sie sonst eventuell ebenfalls mit dem Farbstoff reagieren können. Ebenfalls möglich wäre der Einsatz zweier verschiedener chemischer Reaktionen, um die beiden Farbstoffe ortsspezifisch in YxiN einzubringen. Dafür eignet sich z.B. die Reaktion von Iodacetamid-Derivaten mit einem hierfür eingeführten Selenomethionin (Lang *et al.*, 2005) oder die enzymatische Modifikation eines exponierten Glutamins durch Transglutaminase (Jäger *et al.*, 2006).

Zur Verbesserung der Einzelmolekülexperimente gibt es verschiedene weitere Möglichkeiten. Ein wichtiger Punkt ist die Reduktion des fluoreszierenden Untergrunds, der durch die Nukleotid- und RNA-Lösungen erzeugt wird. Auch die getesteten Systeme zum Abfangen von Sauerstoff führten zu einer deutlichen Erhöhung der Untergrundfluoreszenz.

Ein großes Problem ist die Oberflächenbindung von YxiN. Die Sättigung der Oberfläche durch eine aktive YxiN-Mutante führt zu einer undefinierten potentiellen Erhöhung der YxiN-Konzentration in der Messlösung. Hierfür sollte entweder eine nicht aktive Mutante konstruiert oder eine alternative Methode zur Blockierung der Oberfläche gefunden werden.

Die zur Berechnung der FRET-Effizienz eingesetzten Korrekturparameter konnten anhand der durchgeführten Experimente nicht zuverlässig bestimmt werden. Eine Alternative ist die Bestimmung aus Einzelmolekülexperimenten statt aus Ensemblemessungen. Hierfür ist allerdings eine Spezies mit hoher FRET-Effizienz Voraussetzung. Ein Vergleich der mit beiden Methoden erhaltenen Werte sollte zu zuverlässigeren Korrekturparametern führen. Bessere Ergebnisse können nicht nur durch eine Verbesserung der Messung selbst, sondern auch durch eine Erweiterung der Messmethode erreicht werden. Eine deutlichere Trennung verschiedener Konformationen wäre z.B. auch durch die Einführung einer zweiten Dimension der Messung möglich. Hierfür würde sich z.B. Fluoreszenzanisotropie eignen. (Eggeling *et al.*, 2001).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse sollten durch Experimente mit YxiN-Mutanten, die Farbstoffe an anderen Positionen tragen, ergänzt werden. Können so mehrere intramolekulare Abstände bestimmt werden, so ist eine Bestimmung der Anordnung der Domänen in den verschiedenen Konformationen möglich. Weitere Einsicht in die Funktionsweise der RNA-Entwindung durch YxiN würde die Beobachtung der Dynamik der Konformationsänderungen im katalytischen Zyklus von YxiN bieten. Dies ist mit Einzelmolekül-FRET-Experimenten prinzipiell möglich. Allerdings waren die in dieser Arbeit erreichten Beobachtungszeiten für einzelne Moleküle zu kurz. Eine Verlängerung der Beobachtungszeit könnte durch eine Verlangsamung der Diffusion der fluoreszenzmarkierten YxiN-Moleküle erreicht werden. Eine solche Immobilisierung kann beispielsweise in Agarosegelen (Lu *et al.*, 1998) oder Polyacrylamidgelen (Dickson *et al.*, 1997) erfolgen. Die direkte Immobilisierung von YxiN an der Oberfläche durch Adsorption (Ha *et al.*, 1998) oder ein Bindungssystem wie z.B. Biotin-Streptavidin (Wennmalm *et al.*, 1997) ist für das zur Oberflächenbindung neigende YxiN nicht empfehlenswert. Das Einfangen von YxiN in oberflächenfixierten Vesikeln (Boukobza *et al.*, 2001) bietet eine weitere Möglichkeit. In Kombination mit einem funktionierenden System zur Entfernung von Sauerstoff sollte dadurch die Beobachtungszeit so verlängert werden, dass eine Beobachtung der Dynamik der Konformationsänderungen in Echtzeit und eine Untersuchung der Kinetik einzelner Schritte möglich wird. Ein Vergleich dieser Dynamik mit den Daten aus Ensemble-Experimenten sollte auch weitere Anhaltspunkte liefern, ob das vorgeschlagene Modell für den Mechanismus der RNA-Entwindung zutreffen kann.

Eine weitere Möglichkeit zur Überprüfung des Modells wäre die Untersuchung der Kooperativität der RNA- und ATP-Bindung durch wildtypisches YxiN und durch die Helikasedomänen ohne die C-terminale RNA-Bindungsdomäne. Das hier vorgeschlagene Modell erfordert eine kooperative Bindung von RNA und ATP in den Helikasedomänen. Auf die

festere, sequenzspezifische Bindung der RNA durch die C-terminale Domäne im wildtypischen YxiN sollte die ATP-Bindung keinen Einfluß haben.

Auch Experimente zur Verfolgung von Konformationsänderungen innerhalb einzelner Domänen wären von Interesse. Da die Abstände innerhalb von Domänen deutlich kürzer sind als die Abstände zwischen Positionen in verschiedenen Domänen, wären für entsprechende FRET-Experimente andere Farbstoffpaare mit einem kürzeren Förster-Abstand nötig. Dadurch könnte untersucht werden, welchen Einfluß die Nukleotidbindung auf die Konformation der beiden Domänen hat.

Im beschriebenen Modell ist unklar, wo auf der RNA die Helikasedomänen von YxiN binden. Experimente mit dem 32b RNA Fragment in Gegenwart und Abwesenheit des komplementären 9b-Stranges könnten klären, ob die Helikasedomänen auch an einzelsträngige RNA binden oder tatsächlich den Übergang zwischen Einzelstrang und Doppelstrang benötigen.

Die Entwindung von RNA-Helices durch YxiN könnte in Einzelmolekül-FRET-Experimenten mit einfach markiertem YxiN und fluoreszenzmarkierter RNA beobachtet werden. Eine Variation der Position des Fluorophors in YxiN könnte zusätzlich Informationen über die Anordnung der Helikase auf der RNA liefern. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass die Aktivität von YxiN durch die Verkürzung des RNA-Substrats, wie es für diese Experimente notwendig ist, beeinträchtigt wird. Ein Drei-Farben-System mit einem Fluoreszenzdonor und zwei unterschiedlichen Akzeptoren wurde von Hohng *et al.* (2004) und Clamme und Deniz (2006) beschrieben. Einzelmolekülexperimente mit dem Fluoreszenzdonor in YxiN und den beiden Akzeptoren in der zweiten Helikasedomäne von YxiN und an der RNA würden eine Korrelation der Konformationsänderungen mit einzelnen Schritten der RNA-Entwindung ermöglichen.

Zusammenfassung

Die Aufhebung von RNA-Sekundärstrukturen und RNA-Protein-Wechselwirkungen durch RNA-Helikasen ist für viele zelluläre Prozesse von grundlegender Bedeutung. Die RNA-Helikase YxiN aus *Bacillus subtilis* ist an der Biogenese der Ribosomen beteiligt. YxiN besitzt neben den beiden konservierten Helikasedomänen eine dritte, RNA-bindende Domäne, die für die Sequenzspezifität verantwortlich ist. In dieser Arbeit wurden Konformationsänderungen im katalytischen Zyklus von YxiN mittels Einzelmolekül-FRET-Experimenten untersucht, um Einblick in den Mechanismus der RNA-Entwindung zu erhalten.

Rekombinantes YxiN konnte in nativer Form aus *Escherichia coli* gereinigt werden. YxiN bindet Adeninnukleotide und zeigt eine feste Bindung von RNA. In gekoppelten spektroskopischen Tests wurde die RNA-abhängige ATP-Hydrolyse beobachtet. Die ATP-abhängige RNA-Entwindung wurde in einem dafür entwickelten fluoreszenzbasierten Test in Polyacrylamidgelen nachgewiesen.

Für Einzelmolekül-FRET-Experimente wurde YxiN mit zwei Fluorophoren markiert. Dazu mussten zunächst die zugänglichen Cysteine des Wildtyps durch Serin ersetzt werden. Anschließend wurden Cysteine an potentiell lösungsmittelzugänglichen Positionen eingeführt und durch Reaktion mit Dithionitrobenzoat (DTNB) und Tetramethylrhodamin-Maleimid auf ihre Zugänglichkeit getestet. Die Reaktivität der Cysteine mit farbstoffgekoppeltem Maleimid unterschied sich dabei deutlich von der Reaktivität mit DTNB. Die YxiN-Mutanten mit zugänglichen Cysteinen zeigten ähnliche Stabilität und Aktivität wie der Wildtyp. YxiN-Mutanten mit je einem zugänglichen Cystein in beiden Helikasedomänen wurden mit Alexa488 als Fluoreszenzdonor und Tetramethylrhodamin als Akzeptor markiert. Mit limitierter Proteolyse und anschließender Detektion der Fluoreszenz der Fragmente in Polyacrylamidgelen konnte die Orientierung der Fluorophore in YxiN überprüft werden.

In Ensemble-Fluoreszenzspektren von doppelt markiertem YxiN konnten keine Änderungen der FRET-Effizienz bei der Substratbindung detektiert werden. In Einzelmolekül-FRET-Experimenten hingegen konnten zwei verschiedene Zustände mit unterschiedlicher FRET-

Effizienz identifiziert werden, die zwei verschiedenen Konformationen entsprechen. Die offene Konformation des freien YxiN bleibt auch in Gegenwart von Nukleotiden erhalten. Die zweite, geschlossene Konformation tritt erst in Gegenwart von RNA auf und wird bei der Bindung von ATP stärker populiert.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wird für den Mechanismus der RNA-Entwindung durch YxiN ein erweitertes Destabilisierungsmodell vorgeschlagen. Die C-terminale RNA-Bindungsdomäne positioniert dabei die Helikase sequenzspezifisch auf der RNA. Die beiden Helikasedomänen binden unspezifisch an einzelsträngige RNA oder den Übergang von Einzelstrang zu Doppelstrang in der Umgebung. Dabei schließt sich der Spalt zwischen den Domänen. Die Hydrolyse von ATP oder die anschließende Freisetzung von ADP führt zu der Destabilisierung einiger Basenpaare des RNA-Doppelstranges, so dass ein kurzer RNA-Doppelstrang dissoziieren kann.

Einzelmolekül-FRET-Experimente eignen sich also zur Beobachtung von Konformationsänderungen in YxiN und liefern damit Einblick in den Mechanismus der RNA-Helikase. Weiterführende Experimente werden ein detailliertes Verständnis für den Mechanismus der RNA-Entwindung durch YxiN ermöglichen.

Summary

Dissolving RNA secondary structure and RNA-protein interactions by RNA helicases is of fundamental importance for various cellular processes. The RNA helicase YxiN from *Bacillus subtilis* is involved in ribosome biogenesis. YxiN consists of two conserved helicase domains and a third RNA-binding domain that confers sequence specificity. In this work conformational changes in the catalytic cycle of YxiN were investigated with single molecule fluorescence resonance energy transfer (FRET) experiments to gain insight into the mechanism of RNA unwinding.

YxiN has been purified in its native state as a recombinant protein from *Escherichia coli*. High affinity for RNA and binding of adenine nucleotides was demonstrated. RNA dependent ATP hydrolysis could be observed in a coupled spectroscopic assay. ATP dependent RNA unwinding was investigated in a newly developed fluorescence based assay in polyacrylamide gels.

For single molecule FRET experiments YxiN had to be labelled with two different fluorophores. Therefore, accessible cysteins in the wildtype were replaced by serins. Afterwards cysteins were introduced at potentially accessible positions. Their accessibility was assayed by a reaction with Ellman's reagent (DTNB) and tetramethylrhodamine-maleimide. Reactivity with DTNB and fluorophore coupled maleimid differed greatly. For labelling accessible cysteins were chosen in positions where they did not disturb the stability or activity of YxiN. YxiN mutants with one accessible cystein in each helicase domain were labelled with Alexa488 as fluorescence donor and tetramethylrhodamine as acceptor. Limited proteolysis followed by fluorescence detection in a polyacrylamide gel was used to check the orientation of the fluorophores in the YxiN molecule.

In ensemble fluorescence spectra of doubly labelled YxiN, no change in FRET efficiency upon substrate binding could be detected. In contrast, two states with different FRET-efficiency were detected in single molecule experiments, corresponding to two different conformations of YxiN. The open conformation populated in free YxiN is retained upon nucleotide addition. The second, more closed conformation cannot be detected before ad-

dition of RNA and shows increased population upon ATP binding.

Based on these results a modified destabilisation model for the RNA unwinding by YxiN is proposed. The C-terminal RNA binding domain is used to position YxiN within the RNA. Nonspecific binding of the helicase domains to single stranded RNA or a single strand - double strand junction in the neighbourhood induces closing of the domains. ATP hydrolysis or ADP release causes a destabilisation of a few RNA basepairs that may lead to dissociation of a short RNA duplex.

Thus single molecule FRET experiments are well suited for the study of conformational changes in the catalytic cycle of YxiN and provide insight into the mechanism of RNA helicases. Further experiments will enable a detailed understanding of the mechanism of RNA unwinding by YxiN.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|--|
| ADP | Adenosin-5'-Diphosphat |
| Alexa488 | Alexa Fluor 488 C ₅ Maleimid |
| APD | <i>Avalanche</i> Photo Diode |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| ATP | Adenosin-5'-Triphosphat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DTNB | 5,5'-Dithio-Bis-(2-Nitrobenzoesäure) |
| DTT | 1,4-Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz |
| FRET | Fluoreszenzresonanzenergietransfer |
| HEPES | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid |
| mantADP | 2'/3'-O-(N-Methyl-anthraniloyl)-adenosin-5'-diphosphat |
| MWCO | Ausschlußgröße (<i>Molecular Weight Cutoff</i>) |
| NADH | Nicotinamidadenindinukleotid, reduziert |
| OD ₆₀₀ | optische Dichte bei 600 nm |
| PEP | Phosphoenolpyruvat |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| TCEP | Tris-(2-carboxyethyl)phosphin Hydrochlorid |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| TMR | Tetramethylrhodamin-5-Maleimid |
| TRIS | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| YxiN* | YxiN C61S C267S |
| YxiN wt | YxiN Wildtyp |

Aminosäuren wurden mit dem üblichen Ein- oder Drei-Buchstabencode abgekürzt. Mutationen, durch die eine Aminosäure X an Position I durch die Aminosäure Y ersetzt wurde, wurden mit XIY bezeichnet.

Literaturverzeichnis

- Abdelhaleem, M. (2005). RNA helicases: regulators of differentiation. *Clinical Biochemistry* **38(6)**, 499–503.
- Antikainen, N. M., Smiley, R. D., Benkovic, S. J. und Hammes, G. G. (2005). Conformation coupled enzyme catalysis: single-molecule and transient kinetics investigation of dihydrofolate reductase. *Biochemistry* **44(51)**, 16835–16843.
- Arenas, J. E. und Abelson, J. N. (1997). Prp43: An RNA helicase-like factor involved in spliceosome disassembly. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* **94**, 11798–11802.
- Bates, G. J., Nicol, S. M., Wilson, B. J., Jacobs, A. F., Bourdon, J., Wardrop, J., Gregory, D. J., Lane, D. P., Perkins, N. D. und Fuller-Pace, F. V. (2005a). The DEAD box protein p68: a novel transcriptional coactivator of the p53 tumour suppressor. *The EMBO Journal* **24(3)**, 543–553.
- Bates, M., Blosser, T. R. und Zhuang, X. (2005b). Short-range spectroscopic ruler based on a single-molecule optical switch. *Physical Review Letters* **94(10)**, 108101.
- Bates, P. A., Kelley, L. A., MacCallum, R. M. und Sternberg, M. J. E. (2001). Enhancement of Protein Modelling by Human Intervention in Applying the Automatic Programs 3D-JIGSAW and 3D-PSSM. *Proteins: Structure, Function and Genetics, Supplement 5*, 39–46.
- Bessman, M. (1963). Deoxynucleoside monophosphate kinases: Deoxynucleoside monophosphate + ATP \rightleftharpoons deoxynucleoside diphosphate + ADP. *Methods in Enzymology* **6**, 166–176.
- Bird, L. E., Subramanya, H. S. und Wigley, D. B. (1998). Helicases: a unifying structural theme? *Current Opinion in Structural Biology* **8(1)**, 14–18.
- Böddeker, N., Stade, K. und Franceschi, F. (1997). Characterization of DbpA, an *Escherichia coli* DEAD box protein with ATP independent RNA unwinding activity. *Nucleic Acids Research* **25(3)**, 537–545.
- Boukobza, E., Sonnenfeld, A. und Haran, G. (2001). Immobilization in Surface-Tethered Lipid Vesicles as a New Tool for Single Biomolecule Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry* **105**, 12165–12170.

- Briggs, G. E. und Haldane, J. B. S. (1925). A note on the kinetic of enzyme action. *Biochemical Journal* **19**, 338–339.
- Carpousis, A. J. (2002). The *Escherichia coli* RNA degradosome: structure, function and relationship to other ribonucleolytic multienzyme complexes. *Biochemical Society Transactions* **30(2)**, 150–155.
- Caruthers, J. M., Johnson, E. R. und McKay, D. B. (2000). Crystal structure of yeast initiation factor 4A, a DEAD-box RNA helicase. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* **97(24)**, 13080–13085.
- Chen, Y. und Barkley, M. D. (1998). Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. *Biochemistry* **37(28)**, 9976–9982.
- Cheng, Z., Collier, J., Parker, R. und Song, H. (2005). Crystal Structure and Functional Analysis of DEAD-Box Protein Dhh1p. *RNA Journal* **11(8)**, 1258–1270.
- Clamme, J. P. und Deniz, A. A. (2006). Three-Color Single-Molecule Fluorescence Resonance Energy Transfer. *ChemPhysChem* **6**, 74–77.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. und Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* **96(8)**, 2110–2114.
- Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N. K. und Linder, P. (2005). The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* **367**, 17–37.
- Deniz, A. A., Dahan, M., Grunwell, J. R., Ha, T., Faulhaber, A. E., Chemla, D. S., Weiss, S. und Schultz, P. G. (1999). Single-pair fluorescence resonance energy transfer on freely diffusing molecules: Observation of Förster distance dependence and subpopulations. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* **96**, 3670–3675.
- Dickson, R. M., Cubitt, A. B., Tsien, R. Y. und Moerner, W. E. (1997). On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature* **388(6640)**, 355–358.
- Diges, C. M. und Uhlenbeck, O. C. (2001). *Escherichia coli* DbpA is an RNA helicase that requires hairpin 92 of 23S rRNA. *The EMBO Journal* **20(19)**, 5503–5512.
- Diges, C. M. und Uhlenbeck, O. C. (2005). *Escherichia coli* DbpA Is a 3' → 5' RNA Helicase. *Biochemistry* **44(21)**, 7903–7911.
- Eggeling, C., Berger, S., Brand, L., Fries, J. R., Schaffer, J., Volkmer, A. und Seidel, C. A. (2001). Data registration and selective single-molecule analysis using multi-parameter fluorescence detection. *Journal of Biotechnology* **86(3)**, 163–180.
- Eggeling, C., Widengren, J., Brand, L., Schaffer, J., Felekyan, S. und Seidel, C. A. (2006).

- Analysis of Photobleaching in Single-Molecule Multicolor Excitation and Förster Resonance Energy Transfer Measurements. *Journal of Physical Chemistry A* **110(9)**, 2979–2995.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue Sulfhydryl Groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **82**, 70–77.
- Emery, B., de la Cruz, J., Rocak, S., Deloche, O. und Linder, P. (2004). Has1p, a member of the DEAD-box family, is required for 40S ribosomal subunit biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* **52(1)**, 141–158.
- Förster, T. (1959). Transfer Mechanisms of Electronic Excitation. *Discussions of the Faraday Society* **27**, 7–17.
- Gill, S. C. und Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry* **182(2)**, 319–326.
- Gorbalenya, A. E. und Koonin, E. V. (1993). Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Current Opinion in Structural Biology* **3**, 419–429.
- Ha, T. (2001). Single-Molecule Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Methods* **25(1)**, 78–78.
- Ha, T., Enderle, T., Ogletree, D. F., Chemla, D. S., Selvin, P. R. und Weiss, S. (1996). Probing the interaction between two single molecules: Fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* **93(13)**, 6264–6268.
- Ha, T., Glass, J., Enderle, T., Chemla, D. S. und Weiss, S. (1998). Hindered Rotational Diffusion and Rotational Jumps of Single Molecules. *Physical Review Letters* **80**, 2093–2096.
- Henn, A., Shi, S. P., Zarivach, R., Ben-Zeev, E. und Sagi, I. (2002). The RNA helicase DbpA exhibits a markedly different conformation in the ADP-bound state when compared with the ATP- or RNA-bound states. *Journal of Biological Chemistry* **277(48)**, 46559–46565.
- Hiratsuka, T. (1983). New ribose-modified fluorescent analogs of adenine and guanine nucleotides available as substrates for various enzymes. *Biochimica Biophysica Acta* **742(3)**, 496–508.
- Hirling, H., Scheffner, M., Restle, T. und Stahl, H. (1989). RNA helicase activity associated with the human p68 protein. *Nature* **339(6225)**, 562–564.
- Hohng, S., Joo, C. und Ha, T. (2004). Single Molecule Three-Color FRET. *Biophysical Journal* **87**, 1328–1337.
- Huang, S., Wang, H., Carroll, C. A., ayes, S. J., Weintraub, S. T. und Serwer, P. (2004).

- Analysis of proteins stained by Alexa dyes. *Electrophoresis* **25(6)**, 779–784.
- Ikeda, R. A., Ligman, C. M. und Warshamana, S. (1992). T7 promoter contacts essential for promoter activity *in vivo*. *Nucleic Acids Research* **20(10)**, 2517–2524.
- Jäger, M., Nir, E. und Weiss, S. (2006). Site-specific labeling of proteins for single-molecule FRET by combining chemical and enzymatic modification. *Protein Science* **15(3)**, 640–646.
- Jankowsky, E., Gross, C. H., Shuman, S. und Pyle, A. M. (2001). Active Disruption of an RNA-Protein Interaction by a DExH/D RNA Helicase. *Science* **291**, 121–123.
- Kapanidis, A. N. und Weiss, S. (2002). Fluorescent probes and bioconjugation chemistries for single-molecule fluorescence analysis of biomolecules. *Journal of Chemical Physics* **117(24)**, 10953–10964.
- Karginov, F. V., Caruthers, J. M., Hu, Y., McKay, D. B. und Uhlenbeck, O. C. (2005). YxiN is a modular protein combining a DExD/H core and a specific RNA binding domain. *Journal of Biological Chemistry* **280(42)**, 35499–35505.
- Karow, A., Theissen, B. und Klostermeier, D. (2006). Eingereicht .
- Kim, J. L., Morgenstern, K. A., Griffith, J. P., Dwyer, M. D., Thomson, J. A., Murcko, M. A., Lin, C. und 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(1)**, 89–100.
- Klostermeier, D. und Millar, D. P. (2002). Energetics of hydrogen bond networks in RNA: hydrogen bonds surrounding G+1 and U42 are the major determinants for the tertiary structure stability of the hairpin ribozyme. *Biochemistry* **41(48)**, 14095–14102.
- Kossen, K., Karginov, F. V. und Uhlenbeck, O. C. (2002). The carboxy-terminal domain of the DExDH protein YxiN is sufficient to confer specificity for 23S rRNA. *Journal of Molecular Biology* **324(4)**, 625–636.
- Kossen, K. und Uhlenbeck, O. C. (1999). Cloning and biochemical characterization of *Bacillus subtilis* YxiN, a DEAD protein specifically activated by 23S rRNA: delineation of a novel sub-family of bacterial DEAD proteins. *Nucleic Acids Research* **27(19)**, 3811–3820.
- Kraulis, P. J. (1991). MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* **24**, 946–950.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227(5259)**, 680–685.
- Lakowicz, J. R. (Herausgeber) (1992), *Topics in Fluorescence Spectroscopy. Volume 6: Protein Fluorescence*. Plenum Press.

-
- Lang, S., Spratt, D. E., Guillemette, J. G. und Palmer, M. (2005). Dual-targeted labeling of proteins using cysteine and selenomethionine residues. *Analytical Biochemistry* **342**(2), 271–279.
- Lillo, M. P., Beechem, J. M., Szpikowska, B. K., Sherman, M. A. und Mas, M. T. (1997). Design and characterization of a multisite fluorescence energy-transfer system for protein folding studies: a steady-state and time-resolved study of yeast phosphoglycerate kinase. *Biochemistry* **36**(37), 11261–11272.
- Linder, P., Lasko, P. F., Ashburner, M., Leroy, P., Nielson, P. J., Nishi, K., Schnier, J. und Slonimski, P. P. (1989). Birth of the D-E-A-D box. *Nature* **340**(6230), 121–122.
- Long, D. A. (1977), *Raman Spectroscopy*. McGraw-Hill, Inc.
- Lorsch, J. R. und Herschlag, D. (1998). The DEAD box protein eIF4A. 2. A cycle of nucleotide and RNA-dependent conformational changes. *Biochemistry* **37**(8), 2194–2206.
- Lu, H. P., Xun, L. und Xie, X. S. (1998). Single-molecule enzymatic dynamics. *Science* **282**(5395), 1877–1882.
- Lüking, A., Stahl, U. und Schmidt, U. (1998). The protein family of RNA helicases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **33**(4), 259–296.
- Margittai, M., Widengren, J., Schweinberger, E., Schröder, G. F., Felekyan, S., Haustein, E., König, M., Fasshauer, D., Grubmüller, H., Jahn, R. und Seidel, C. A. (2003). Single-molecule fluorescence resonance energy transfer reveals a dynamic equilibrium between closed and open conformations of syntaxin 1. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* **100**(26), 15516–15521.
- Merritt, E. A. und Bacon, D. J. (1997). Raster3D: photorealistic molecular graphics. *Methods in Enzymology* **277**, 505–524.
- Michaelis, L. und Menten, M. L. (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift* **49**, 333–369.
- Milligan, J. F. und Uhlenbeck, O. C. (1989). Synthesis of small RNAs using T7 RNA polymerase. *Methods in Enzymology* **180**, 51–62.
- Nachtmann, N. (2003), *Entwicklung eines Fluoreszenz-Aktivitätstests für die RNA-Helikase DbpA*. Diplomarbeit, Universität Bayreuth.
- Parker, C. A. und Rees, W. T. (1960). Correction of Fluorescence Spectra and Measurement of Fluorescence Quantum Efficiency. *Analyst* **85**, 587–600.
- Pause, A., Methot, N. und Sonenberg, N. (1993). The HRIGRXXXR region of the DEAD box RNA helicase eukaryotic translation initiation factor 4A is required for RNA binding and ATP hydrolysis. *Molecular And Cellular Biology* **13**(11), 6789–6798.

- Pause, A. und Sonenberg, N. (1992). Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A. *The EMBO Journal* **11**(7), 2643–2654.
- Peck, M. L. und Herschlag, D. (2003). Adenosine 5'-O-(3-thio)triphosphate (ATP γ S) is a substrate for the nucleotide hydrolysis and RNA unwinding activities of eukaryotic translation initiation factor eIF4A. *RNA Journal* **9**, 1180–1187.
- Polach, K. J. und Uhlenbeck, O. C. (2002). Cooperative binding of ATP and RNA substrates to the DEAD/H protein DbpA. *Biochemistry* **41**(11), 3693–3702.
- Ratner, V., Kahana, E., Eichler, M. und Haas, E. (2002). A general strategy for site-specific double labeling of globular proteins for kinetic FRET studies. *Bioconjugate Chemistry* **13**(5), 1163–1170.
- Riddles, P. W., Blakeley, R. L. und Zerner, B. (1983). Reassessment of Ellman's Reagent. *Methods in Enzymology* **91**, 49–60.
- Rocak, S., Emery, B., Tanner, N. K. und Linder, P. (2005). Characterization of the ATPase and unwinding activities of the yeast DEAD-box protein Has1p and the analysis of the roles of the conserved motifs. *Nucleic Acids Research* **33**(3), 999–1009.
- Rogers, G. W., Komar, A. A. und Merrick, W. C. (2002). eIF4A: The godfather of the DEAD box helicases. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. **72**, 307–331.
- Rogers, G. W., Lima, W. F. und Merrick, W. C. (2001). Further characterization of the helicase activity of eIF4A. Substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry* **276**(16), 12598–12608.
- Rogers, G. W. J., Richter, N. J. und Merrick, W. C. (1999). Biochemical and kinetic characterisation of the helicase activity of eIF4A. Substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry* **274**(18), 12236–12244.
- Rozen, F., Edery, I., Meerovitch, K., Dever, T. E., Merrick, W. C. und Sonenberg, N. (1990). Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F. *Molecular Cell Biology* **10**(3), 1134–1144.
- Rozen, F., Pelletier, J., Trachsel, H. und Sonenberg, N. (1989). A lysine substitution in the ATP-binding site of eukaryotic translation initiation factor 4A abrogates nucleotide-binding activity. *Molecular Cell Biology* **10**, 1134–1144.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning - A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory press.
- Schmid, F. X. (1997), Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. In *Protein Structure: a practical approach*, herausgegeben von Creighton, T. E., Seiten 261–297, IRL Press.

-
- Schuler, B., Lipman, E. A. und Eaton, W. A. (2002). Probing the free-energy surface for protein folding with single-molecule fluorescence spectroscopy. *Nature* **419(6908)**, 743–747.
- Selvin, P. R. (2000). The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. *Nature Structural Biology* **7(9)**, 730–734.
- Shi, H., Cordin, O., Minder, C. M., Linder, P. und Xu, R. M. (2004). Crystal structure of the human ATP-dependent splicing and export factor UAP56. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* **101(51)**, 17628–17633.
- Silverman, E., Edwalds-Gilbert, G. und Lin, R. J. (2003). DExD/H-box proteins and their partners: helping RNA helicases unwind. *Gene* **312**, 1–16.
- Spreitler, F. (2006), *Einzelmolekül-FRET an Biomolekülen*. Diplomarbeit, Universität Bayreuth.
- Story, R. M., Li, H. und Abelson, J. N. (2001). Crystal structure of a DEAD box protein from the hyperthermophile *Methanococcus jannaschii*. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* **98(4)**, 1465–1470.
- Talavera, M. A. und Cruz, E. M. D. L. (2005). Equilibrium and kinetic analysis of nucleotide binding to the DEAD-box RNA helicase DbpA. *Biochemistry* **44(3)**, 656–970.
- Talavera, M. A., Matthews, E. E., Eliason, W. K., Sagi, I., Wang, J., Henn, A. und Cruz, E. M. D. L. (2006). Hydrodynamic Characterization of the DEAD-box RNA Helicase DbpA. *Journal of Molecular Biology* **355(4)**, 697–707.
- Taylor, R. M., Lin, B., Foubert, T. R., Burritt, J. B., Sunner, J. und Jesaitis, A. J. (2002). Cascade blue as a donor for resonance energy transfer studies of heme-containing proteins. *Analytical Biochemistry* **302(1)**, 19–27.
- Tsu, C. A., Kossen, K. und Uhlenbeck, O. C. (2001). The *Escherichia coli* DEAD protein DbpA recognizes a small RNA hairpin in 23S rRNA. *RNA Journal* **7(5)**, 702–709.
- Tsu, C. A. und Uhlenbeck, O. C. (1998). Kinetic analysis of the RNA-dependent adenosinetriphosphatase activity of DbpA, an *Escherichia coli* DEAD protein specific for 23S ribosomal RNA. *Biochemistry* **37(48)**, 16989–16996.
- Tuteja, N. und Tuteja, R. (2004). Unraveling DNA helicases. Motif, structure, mechanism and function. *European Journal of Biochemistry* **271**, 1849–1863.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. und 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. *The EMBO Journal* **1(8)**, 945–951.
- Wang, S., Hu, Y., Overgaard, M. T., Karginov, F. V., Uhlenbeck, O. C. und McKay, D. B.

- (2006). The domain of the *Bacillus subtilis* DEAD-box helicase YxiN that is responsible for specific binding of 23S rRNA has an RNA recognition motif fold. *RNA Journal* **12**, 1–9.
- Wennmalm, S., Edman, L. und Rigler, R. (1997). Conformational fluctuations in single DNA molecules. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* **94**, 10641–10646.
- Williams, T. und Kelley, C. (1993). www.gnuplot.info.
- Xu, H. Q., Zhang, A. H., Auclair, C. und Xi, X. G. (2003). Simultaneously monitoring DNA binding and helicase-catalyzed DNA unwinding by fluorescence polarization. *Nucleic Acids Research* **31(14)**, e70.
- Xu, Y. Z., Newnham, C. M., Kameoka, S., Huang, T., Konarska, M. M. und Query, C. C. (2004). Prp5 bridges U1 and U2 snRNPs and enables stable U2 snRNP association with intron RNA. *The EMBO Journal* **23(2)**, 376–385.
- Yoshida, K., Shindo, K., Sano, H., Seki, S., Fujimura, M., Yanai, N., Miwa, Y. und Fujita, Y. (1996). Sequencing of a 65 kb region of the *Bacillus subtilis* genome containing the *lic* and *cel* loci, and creation of a 177 kb contig covering the *gnt- sacXY* region. *Microbiology* **142(11)**, 3113–3123.
- Zhuang, X., Bartley, L. E., Babcock, H. P., Russell, R., Ha, T., Herschlag, D. und Chu, S. (2000). A single-molecule study of RNA catalysis and folding. *Science* **288(5473)**, 2048–2051.

Diese Arbeit wurde von März 2003 bis April 2006 unter der Anleitung von Dagmar Klostermeier am Lehrstuhl Experimentalphysik IV erstellt. Sie hat mir bei der Bearbeitung eines interessanten Themas viel Freiheit gelassen, hatte aber stets ein offenes Ohr, Interesse an meiner Arbeit und viele hilfreiche Anregungen.

Mein besonderer Dank geht an die Mitglieder meiner Arbeitsgruppe für viele anregende Diskussionen und eine angenehme Arbeitsatmosphäre: Thomas Göttler, Manuel Hilbert, Stefan Jungblut, Anne Karow, Martin Linden, Petra Müller, Niklas Nachtmann, Stefan Öllerer, Florian Spreitler. Insbesondere Florian Spreitler möchte ich für seine Hilfe mit den Einzelmolekülexperimenten danken. Ramona Heissmann und Andreas Schmidt danke ich für ihre unschätzbare Hilfe im Labor.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Prof. F. X. Schmid, der nicht nur die Betreuung der Arbeit übernommen hat, sondern auch seine Geräte zur Verfügung gestellt hat. Seinen Doktoranden danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und ihre grundsätzliche „Das ist kein Problem“-Einstellung.

Bei Prof. J. Köhler bedanke ich mich für die Möglichkeit, an seinem Lehrstuhl zu arbeiten. Ihm und den Mitgliedern von EP IV verdanke ich viele interessante Diskussionen und ein angenehmes Arbeitsumfeld.

Auch Prof. Rösch hat durch die Möglichkeit, in seinen Labors zu arbeiten, wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an meine Korrekturleser Stefan Jungblut und Michael Wunderlich.

Zuletzt möchte ich mich bei jenen bedanken, die bereits während des Studiums und auch jetzt während der Promotion mein Leben begleitet und bereichert haben: mein Mann Ulrich Theißen, meine Familie und meine Freunde.

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

Ferner erkläre ich, dass ich weder an der Universität Bayreuth noch an einer anderen Hochschule versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Promotionsprüfung zu unterziehen.

Bayreuth, 25. Juli 2006