

**Einfluss der eIF4A bindenden Domäne aus eIF4G auf  
Konformation und Aktivität der minimalen DEAD Box  
Helikase eIF4A aus *Saccharomyces cerevisiae***

**Inauguraldissertation**

zur  
Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie  
vorgelegt der  
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Basel

von Manuel Hilbert  
aus Marbach am Neckar, Deutschland

Basel, 2009

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

auf Antrag von

Prof. Dr. Dagmar Klostermeier  
Prof. Dr. Joachim Seelig

Basel, den 10. November 2009

Prof. Dr. Eberhard Parlow  
(Dekan)



Dieses Werk ist unter dem Vertrag „Creative Commons Namensnennung-Keine kommerzielle Nutzung-Keine Bearbeitung 2.5 Schweiz“ lizenziert. Die vollständige Lizenz kann unter [creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ch](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ch) eingesehen werden.



# I. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Aktivität der minimalen DEAD Box Helikase eIF4A (eIF4Ay) und ihre Regulation durch die eIF4A bindende Domäne von eIF4G (eIF4Gy(572-853) aus *S. cerevisiae* charakterisiert.

eIF4Gy(572-853) beschleunigt die ATP Hydrolyserate  $k_{cat}$  von eIF4Ay um den Faktor 2,5, von  $0,004 \text{ s}^{-1}$  auf  $0,010 \text{ s}^{-1}$ . Gleichzeitig steigt der  $K_M$ -Wert für polyU RNA von  $30 \text{ }\mu\text{M}$  auf  $125 \text{ }\mu\text{M}$ . Die Geschwindigkeit der dsRNA Entwindung wird durch die Gegenwart von eIF4Gy(572-853) aber halbiert.

Die Stimulierung der ATPase Aktivität wird nicht durch die Erhöhung der Nukleotidaffinität verursacht. Im Gegenteil reduziert eIF4Gy(572-853) die Affinität von eIF4Ay für ADP von  $K_D = 50 \text{ }\mu\text{M}$  auf  $90 \text{ }\mu\text{M}$  und für ATP von  $K_D = 20 \text{ mM}$  auf über  $30 \text{ mM}$ , wie unabhängig in ITC und Fluoreszenztitrationen gezeigt wurde. Stattdessen deutet die Verdopplung der mADP Dissoziationsrate  $k_{off}$  von  $30 \text{ s}^{-1}$  auf  $60 \text{ s}^{-1}$  durch eIF4Gy(572-853) auf eine Funktion von eIF4Gy(572-853) als Nukleotidaustauschfaktor hin.

eIF4Ay und eIF4Gy(572-853) interagieren über zwei Bindungsstellen. In smFRET Experimenten wurde gezeigt, dass die sekundäre Bindungsstelle zwischen der N terminalen Domäne von eIF4Ay und der C terminalen Domäne von eIF4Gy(572-853) durch Einfügen drei negativ geladener Aminosäuren in eIF4Gy(572-853) (K831E, S834D und R835E) zerstört werden kann. Diese Mutationen verursacht im Vergleich zu wildtyp eIF4Gy(572-853) lediglich eine Erhöhung der Dissoziationskonstante des Komplexes von  $0,6 \text{ }\mu\text{M}$  auf  $1,1 \text{ }\mu\text{M}$ . Dementsprechend trägt die sekundäre Bindungsstelle weniger als 5% zur Wechselwirkungsenergie des eIF4Ay/Gy(572-853) Komplex bei.

smFRET Ergebnisse zeigten, dass eIF4Ay durch eIF4Gy(572-853) in einer Konformation stabilisiert, die sich deutlich von der geschlossenen (ATP und RNA gebundenen) und der offenen (ligandenlosen) Konformation unterscheidet. Für die Stabilisierung dieser Konformation ist der Kontakt über beide Bindungsstellen erforderlich. Mutationsstudien zeigten, dass eine Salzbrücke zwischen eIF4Gy(572-853)

R835 und E43 aus dem nukleotidbindenden Q Motiv von eIF4Ay für die Stimulierung der ATPase Aktivität notwendig ist. Außerdem vermittelt eIF4Gy(572-853) durch seinen Einfluss auf die Konformation von eIF4Ay den ersten Interdomänenkontakt zwischen den RNA bindenden Motiven Ib und QxxR und orientiert so die RNA Bindungsstelle.

Aufgrund dieser Daten kann folgendes Modell der Regulation der eIF4Ay Aktivität durch eIF4Gy(572-853) vorgeschlagen werden:

eIF4Gy(572-853) wird über die primäre Bindungsstelle an eIF4Ay verankert, während die deutlich schwächere Wechselwirkung der sekundären Bindungsstelle die Orientierung der Domänen verursacht. Der Kontakt in der sekundären Bindungsstelle kann transient abbrechen, sodass eIF4Ay zwischen der katalytisch aktiven geschlossenen Konformation und der eIF4Gy(572-853) gebundenen Konformation wechseln kann. Der Übergang von der geschlossenen in die eIF4G gebundene Konformation öffnet die Nukleotidbindungstasche und beschleunigt dadurch den Nukleotidaustausch, einen für DEAD Box Proteine ratenlimitierenden Schritt. Gleichzeitig bleibt aber der Interdomänenkontakt zwischen Motiv Ib und QxxR bestehen, sodass der Übergang zurück in die katalytisch aktive geschlossene Form erleichtert ist.

In einem methodisch orientierten Teil dieser Arbeit wurde an der Isolierung von Aptameren für die FRET Farbstoffe A488 und A546 zur Reinigung doppelmarkierter Proteine durch ‚*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*‘ (SELEX) gearbeitet. Weiter wurden Möglichkeiten zur Identifikation oberflächenexponierter Cysteinen durch chemische Fragmentierung der Proteine untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Grundlagen für einen *in vivo* Helikasetest mit RNA Thermometern entwickelt. Außerdem wurden nachfolgende Arbeiten zur Erforschung der Wechselwirkung von eIF4A mit eukaryotischen Translations Initiationsfaktoren durch die Klonierung von eIF4Am, eIF4Gm, eIF4Gm(686-1090), eIF4Gm(1226-1600), eIF4E und eIF4A<sub>leif</sub> vorbereitet. Der aktuelle Stand zur Erforschung der DEAD Box Proteine wurde in einem Übersichtsartikel zusammengefasst (Hilbert, M. *et al.* 2009 *Biol Chem.* 390(12), 1237–1250).

# I. summary

This work characterizes the activity of the minimal DEAD-box helicase eIF4A (eIF4Ay) and its regulation by the eIF4A binding domain of eIF4G (eIF4Gy(572-853)) from *S. cerevisiae*.

It is shown that eIF4Gy(572-853) enhances the rate of ATP hydrolysis  $k_{\text{cat}}$  of eIF4Ay by a factor of 2.5, from  $0.004 \text{ s}^{-1}$  to  $0.010 \text{ s}^{-1}$ . At the same time the  $K_{\text{M}}$ -value for polyU RNA increases from  $30 \text{ }\mu\text{M}$  to  $125 \text{ }\mu\text{M}$ . Nevertheless the velocity of eIF4A's ability to unwind dsRNA is impaired by eIF4Gy(572-853).

Stimulation of ATPase activity is not caused by higher nucleotide affinity. In the contrary eIF4Gy(572-853) reduces the affinity for ATP from  $K_{\text{D}} = 50 \text{ }\mu\text{M}$  to  $90 \text{ }\mu\text{M}$  and  $K_{\text{D}} = 20 \text{ mM}$  to more than  $30 \text{ mM}$  for ATP, as shown independently in ITC and fluorescence-titrations. In this light a two-fold increase in the rate of mADP dissociation  $k_{\text{off}}$  from  $30 \text{ s}^{-1}$  to  $60 \text{ s}^{-1}$  in presence of eIF4Gy(572-853) points towards its function as a nucleotide exchange factor.

eIF4Ay and eIF4Gy(572-853) interact via two binding sites. smFRET experiments revealed that the interaction of the secondary binding site, formed by the N-terminal domain from eIF4Ay and the C-terminal domain from eIF4Gy(572-853), can be inhibited by the introduction of three negatively charged residues in eIF4Gy(572-853). In comparison to wildtype eIFGy(572-853) these mutations cause only a moderate increase in the eIF4Ay/Gy(572-853) dissociation constant from  $0.6 \text{ }\mu\text{M}$  to  $1.1 \text{ }\mu\text{M}$ . Accordingly the secondary binding site contributes less than 5% to the overall interaction energy between eIF4Ay and eIF4Gy(572-853).

smFRET experiments revealed that both binding sites are necessary to influence the conformation of eIF4Ay. The eIF4G bound conformation is distinct from the 'closed' (with ATP and RNA) and 'open' (without ligands) conformation of eIF4Ay. Mutational studies identified a salt bridge between eIF4Gy(572-853) R835 and E43 from the nucleotide binding Q-motif in eIF4Ay, that is important to

stimulate ATPase activity. Furthermore the conformational change introduced by eIF4Gy(572-853) enables the first interdomain contact between the RNA binding motifs Ib and QxxR and therefore orients the RNA binding site.

These data are integrated in a model for the regulation of eIF4Ay activity by eIF4Gy(572-853): eIF4Gy(572-853) is anchored to eIF4Ay by the primary binding site. The weaker interaction in the secondary binding site causes the conformational reorientation. Transiently the weak contact in the secondary binding site breaks and enables the transition between the eIF4Gy(572-853) bound conformation to the catalytic `closed` conformation. The transition from the closed to the eIF4Gy(572-853) bound form opens the nucleotide binding pocket and thereby enhances nucleotide exchange, a rate limiting step for DEAD-box helicases. At the same time the interdomain contact between motifs Ib and QxxR persists, thereby facilitating the back-transition to the catalytic closed conformation.

A methodic part of this thesis contains the work on the isolation of aptamers for the FRET dyes A488 and A546 by 'Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment' (SELEX). These Aptamers would enable the purification of double labelled proteins. Diverse methods to identify surface accessible cysteins were tested. This work also sets the basis for an *in vivo* helicase assay based on RNA thermometer. To continue the characterization of eIF4A with different translation initiation factors the work with eIF4Am, eIF4Gm, eIF4Gm(686-1090), eIF4Gm(1226-1600), eIF4E, eIF4H and eIF4Aleif was started. The current view on the mechanism of DEAD-box helicases was summarized in a review article (Hilbert, M. *et al.* 2009 *Biol Chem.* 390(12), 1237–1250).

## Inhaltsverzeichnis

I.	Zusammenfassung .....	4
I.	summary.....	6
II.	Einleitung.....	11
1.	Helikasen und DEAD Box Proteine.....	11
2.	Spezielle Substrate für eIF4A.....	19
	BC1 RNA .....	19
	RNA Thermometer.....	19
3.	Spezielle Techniken.....	20
	Förster Resonanz Energie Transfer (FRET) als molekulares Lineal.....	20
	SELEX.....	23
4.	Nomenklatur .....	25
5.	Zielsetzung.....	26
III.	Materialien und Methoden .....	27
1.	Materialien .....	27
	Vektoren.....	27
	Bakterienstämme .....	28
	Nukleinsäuren und Nukleotide.....	28
	Puffer und Stammlösungen.....	29
2.	Allgemeine Methoden .....	29
	Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS PAGE).....	29
	Native Polyacrylamid Gelelektrophorese (native PAGE).....	30
	Agarose Gelelektrophorese.....	30
	Analytische Größenausschlusschromatographie (SEC).....	30
	Pufferaustausch und Konzentrieren von Lösungen.....	31
	Selektive Proteinspaltung.....	31
	Aceton und TCA Proteinfällung .....	31
	GST-GSH <i>pull down</i> .....	31
	Absorptionsspektroskopie.....	32
3.	Proteinproduktion und –reinigung .....	32
	Fermentation.....	32
	Zellaufschluss.....	33
	Proteinreinigung.....	33
4.	Polymerase Ketten Reaktion (PCR) basierte Methoden .....	36
	Klonierung .....	36
	Terminale Deletionen .....	36
	Gerichtete Mutagenese .....	37
	Kolonie PCR .....	37
	Plasmid Extraktion aus Bakterien .....	38
	<i>in vitro</i> Transkription (IVT).....	38
5.	Enzymcharakterisierung.....	39
	ATP Hydrolyse im Fließgleichgewicht .....	39
	RNA Entwindungstests.....	40
	Hydroxapatit-Chromatographie .....	41
	<i>in vivo</i> Helikase Aktivitäts Test .....	41
6.	Biophysikalische Methoden .....	42
	Circulardichroismus (CD) Spektroskopie.....	42
	Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) .....	42
	Intrinsische Protein Fluoreszenz.....	44

	Nukleotidbindung von mantADP .....	44
	Messung schneller Kinetiken .....	46
	Fluoreszenzanisotropie Titrationsen .....	47
	Förster Resonanz Energie Transfer (FRET) .....	47
	Ensemble FRET Titration .....	48
	Einzelmolekül (sm)FRET Messung.....	48
	Korrekturparameter für smFRET Messungen.....	49
	Bestimmung des Försterradius (R0) .....	51
	Statistische Markierung von Proteinen.....	52
	Massenspektrometrie .....	53
7.	SELEX.....	53
IV.	Ergebnisse .....	57
1.	Reinigung der Translations Initiationsfaktoren .....	57
	Eukaryotischer Translations Initiationsfaktor 4A aus <i>Mus musculus</i> (eIF4Am) .....	58
	Eukaryotischer Translations Initiationsfaktor 4B aus <i>Mus musculus</i> (eIF4Bm) .....	60
	Eukaryotischer Translations Initiationsfaktor 4H aus <i>Mus musculus</i> (eIF4Hm).....	61
	Eukaryotischer Translations Initiationsfaktor 4G aus <i>Mus musculus</i> (eIF4Gm) .....	62
	Eukaryotischer Translations Initiationsfaktor 4E aus <i>Mus musculus</i> (eIF4Em).....	63
	Eukaryotischer Translations Initiationsfaktor 4A aus <i>Leishmania infantum</i> (eIF4A <sub>leif</sub> ) .....	63
	Eukar. Translations Initiationsfaktor 4A und 4G aus <i>S. cerevisiae</i> (eIF4A <sub>y</sub> und eIF4G <sub>y</sub> (572-853)).....	64
2.	Methodenentwicklung.....	65
	ATP Hydrolyse Aktivität.....	65
	Helikaseaktivität .....	66
	<i>in vivo</i> Helikasetest mit RNA Thermometern .....	67
	Trennung von donor- und akzeptormarkierten Proteinen.....	68
3.	Markierung von eIF4A für smFRET Experimente.....	69
	Identifikation markierbarer nativer Cysteine .....	70
	Einfluss nativer Cysteine auf die eIF4A Aktivität .....	71
	Cysteinen zur Immobilisierung von Fluoreszenzfarbstoffen .....	73
4.	Charakterisierung von eIF4A .....	74
	Helikase und ATPase Aktivität von eIF4A .....	74
	Substrat Bindung an eIF4A <sub>y</sub> .....	76
	Die Konformation von eIF4A in Lösung.....	79
5.	Einfluss von eIF4Bm auf eIF4Am.....	82
6.	Einfluss von eIF4G <sub>y</sub> (572-853) auf eIF4A <sub>y</sub> .....	82
	Wechselwirkung zwischen eIF4A <sub>y</sub> und eIF4G <sub>y</sub> (572-853).....	84
	Helikase und ATPase Aktivität des eIF4A <sub>y</sub> /G <sub>y</sub> (572-853) Komplex.....	88
	Die Substrataffinität des eIF4A <sub>y</sub> -G <sub>y</sub> (572-853) Komplex.....	90
	Die Konformation des eIF4A <sub>y</sub> - eIF4G <sub>y</sub> (572-853) Komplex in Lösung.....	93
V.	Diskussion.....	99
VI.	Ausblick .....	111
VII.	Anhang .....	114
	Abkürzungsverzeichnis.....	114
	Primersequenzen.....	115
	Stammsammlung.....	116
	SELEX Bedingungen.....	119
	Proteineigenschaften .....	120
	Literaturverzeichnis .....	120
VIII.	Danksagung .....	125
IX.	curriculum vitae .....	126

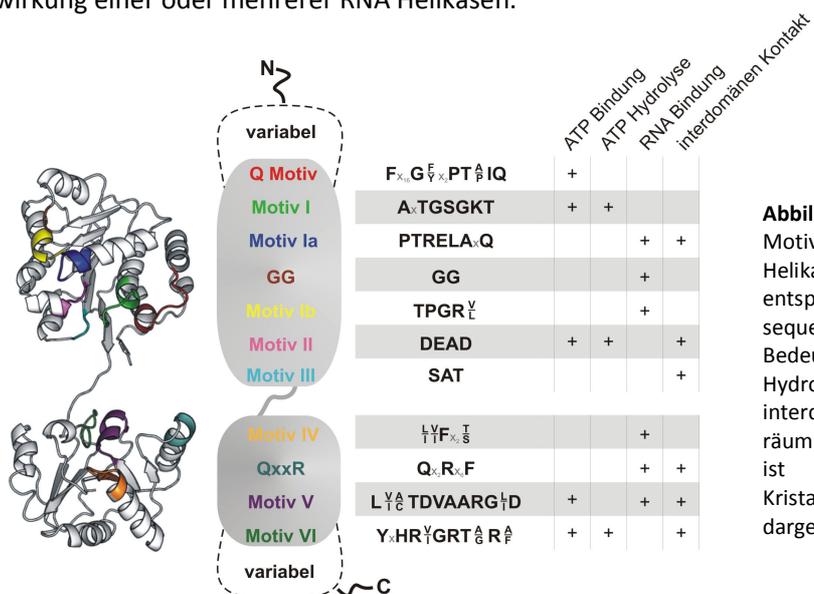


## II. Einleitung

### 1. Helikasen und DEAD Box Proteine

#### DEAD Box Proteine

Helikasen sind faszinierende und lebensnotwendige Proteine. Sie leisten weit mehr als die in Lehrbüchern beschriebenen Aufgaben in DNA Replikation und DNA Reparatur. Die neben DNA Helikasen ebenso wichtige Klasse von RNA Helikasen wird oft nicht einmal erwähnt [1]. RNA Helikasen sind aber an praktisch allen Prozessen mit RNA beteiligt. Von Ribosomenbiogenese [2], Entwicklung [3], Replikation im Allgemeinen [4] und im speziellen von Viren [5] über RNA spleißen [6], RNA Abbau [7] und Export, Translation und Transkription [8] – alle Prozesse erfordern die Mitwirkung einer oder mehrerer RNA Helikasen.



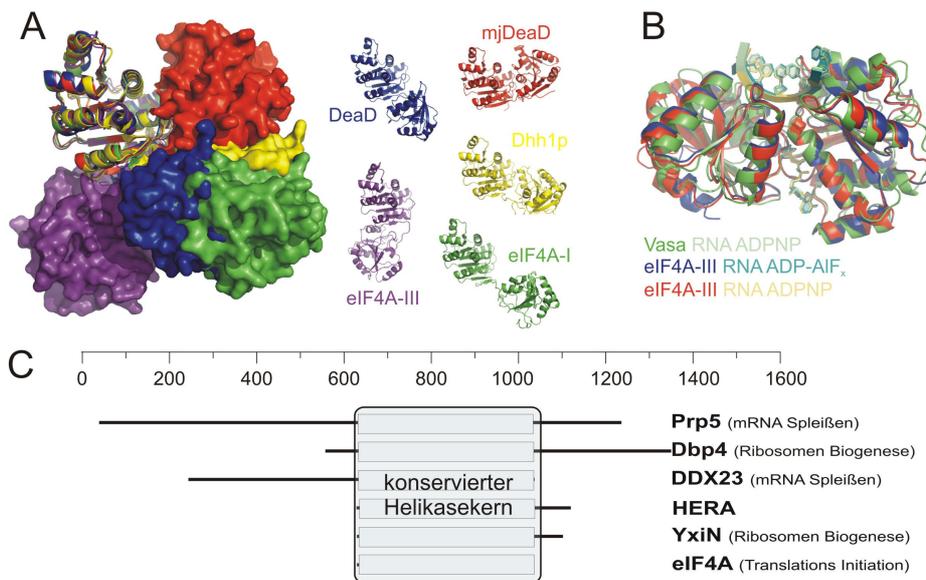
**Abbildung 1** Konservierte Motive des DEAD Box Helikasekern und die entsprechenden Konsensussequenzen, sowie ihre Bedeutung für ATP Bindung und Hydrolyse, RNA Bindung und interdomänen Kontakte. Die räumliche Position der Motive ist farblich in der Kristallstruktur von eIF4A dargestellt (PDB ID 1fu0).

Die mit Abstand größte Gruppe der RNA Helikasen, die Gruppe der DEAD Box Proteine, wird durch 11 konservierte Aminosäuresequenzmotive definiert (Abbildung 1). Anders als oft beschrieben, sind Helikasen nicht über die Fähigkeit zur Destabilisierung von Doppelsträngen, sondern durch konservierte Sequenzmotive definiert [9]. Für einige Vertreter wurde aber ATP abhängige Entwindung von RNA Doppelsträngen experimentell nachgewiesen und auch diese Arbeit nutzt die Helikaseaktivität als Kennzeichen der DEAD Box Proteine. Neben der Helikaseaktivität wurden aber auch die Doppelstrangbildung [10, 11, 12], RNA und RNP Umstrukturierung [13, 14] sowie RNP Desintegration [15, 16] gezeigt. Auch eine Rolle zur Verankerung großer Proteinkomplexe auf RNA wurde beschrieben [17]. Damit spiegelt die Variabilität der Aktivitäten die Vielfalt der Prozesse wider, in denen DEAD Box Proteine eine wichtige Rolle spielen. Der Name der DEAD Box Helikasen stammt aus einer Publikation mit dem Titel „*Birth of the D-E-A-D box*“ aus dem Jahre 1989, für den die Aminosäuresequenz von Motiv II (Aspartat, Glutamat, Alanin, Aspartat) Pate stand [18]. In den letzten zwanzig Jahren wurden weitere Sequenzmotive entdeckt und mit Funktionen in Verbindung gebracht (Abbildung 1). Motiv Q, Motiv I und das namensgebende Motiv II sowie die Motive V und VI sind an Nukleotidbindung und -hydrolyse beteiligt. Motiv I und Motiv II sind Variationen der für ATPasen typischen Walker A und B Motive [19]. Mit der Bindung von RNA wurden die Motive Ia, GG, Motiv Ib sowie die Motive IV, QxxR und V verknüpft. Für den intramolekularen Kontakt zwischen N und C terminaler Domäne sind die Motive Ia, II, III und QxxR, V sowie VI wichtig. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde der aktuelle Stand der Erforschung der DEAD Box Proteine in einem Übersichtsartikel zusammengefasst [20].

### **Der konservierte Helikasekern**

Obwohl DEAD Box Proteine in der Regel deutlich größer sind, konzentrieren sich alle Sequenzmotive auf einem Bereich von ca. 400 Aminosäuren, dem sogenannten Helikasekern (Abbildung 1). Im Gegensatz zum Helikasekern variieren die flankierenden N- oder C-terminalen Bereiche stark in Größe und Sequenz.

Neben den Sequenzmotiven ist auch die Faltung des Helikasekerns konserviert. Der Helikasekern faltet in zwei unabhängige RecA artige Domänen, die durch einen flexiblen Linker verbunden sind (Abbildung 1). Die N-terminale RecA artige Domäne ermöglicht die dreidimensionale Positionierung der Motive I bis III, die C-terminale Domäne bildet das Proteingerüst für die Motive IV bis VI. Beim Vergleich der verfügbaren Kristallstrukturen von DEAD Box Proteinen wird deutlich, dass die Struktur der Domänen weitgehend unverändert bleibt, während sich die Orientierung der Domänen



**Abbildung 2** Offene (A) und geschlossene (B) Konformation des DEAD Box Helikasekerns. Im Gegensatz zu einer definierten geschlossenen Konformation gibt es keine einheitliche offene Konformation der DEAD Box Proteine. Möglicherweise sind die Domänen in der offenen Konformation beweglich. **(A)** Überlagerung der NTD der Kristallstrukturen von mjDeaD (*M. jannaschii*, rot, PDB-ID 1hv8), Dhh1p (*S. cerevisiae*, gelb, PDB-ID 1s2m), eIF4A-I (*S. cerevisiae*, grün, PDB-ID 1fuu), DeaD (*S. tokodaii*, blau, PDB-ID 2z0m) und eIF4A-III (*H. sapiens*, violett, PDB ID 2hxy). Die NTD ist in Cartoon-, die CTD in der Oberflächenrepräsentation dargestellt. **(B)** Überlagerung der Kristallstrukturen von Vasa (*D. melanogaster*, PDB-ID 2db3, grün) im Komplex mit RNA und ADPNP (hellgrün), eIF4A-III/ADPNP/RNA (*H. sapiens*, PDB-ID 2hyi, blau/cyan) und eIF4A-III/ADP-AIFx/RNA (*H. sapiens*, PDB-ID 3ex7, rot/gelb) **(B)** Größenvergleich ausgewählter DEAD Box Proteine. Der Helikasekern wird häufig von N oder C terminalen Domänen flankiert. Im Gegensatz dazu besteht eIF4A nur aus dem Helikasekern.

zueinander stark unterscheidet (Abbildung 2) [13, 21, 22]. Der Vielzahl von verschiedenen Konformationen ohne Substrat steht ein definierter RNA und ATP gebundener Zustand gegenüber. Diese sogenannte geschlossene Form wurde unabhängig für vier verschiedene Protein und zwei unterschiedliche ATP Analoga gefunden (Abbildung 2) [23, 17, 24, 25, 26, 27]. Die erste Kristallstruktur eines DEAD Box Proteins im geschlossenen Zustand [17] identifizierte eine  $\alpha$  Helix (u.a. mit Motiv Ib), die für einen Knick in der gebundenen RNA verantwortlich gemacht wurde. Das Knicken der RNA und damit verbunden die Bildung des geschlossenen Komplex, wurden als RNA Duplex destabilisierendes Element im Mechanismus der Helikaseaktivität postuliert. Nach der ersten Erwähnung von Konformationsänderungen während des katalytischen Zyklus [28] wurden viele indirekte Hinweise auf die Bewegung der Domänen (z. B. durch Zugänglichkeit bei limitierter Proteolyse) zusammen getragen [13, 29, 30]. 2008 konnte die Konformationsänderung von offener zu geschlossener Form schließlich direkt in Einzelmolekül Förster Resonanz Energie Transfer (smFRET) Experimenten gezeigt werden [31]. Nachfolgende Untersuchungen ergaben aber, dass die Konformationsänderung zwar notwendig, aber nicht ausreichend für die Helikaseaktivität von DEAD Box Proteinen ist [32]. Nach neuen Erkenntnissen ermöglicht das ATP Übergangszustandsanalogon

ADP-BeF<sub>x</sub> unter Einzelumsatzbedingungen die Entwindung von RNA [33]. Durch die Population der geschlossenen Konformation mit RNA und ADP-BeF<sub>x</sub> konnte die Bindung von RNA in diesem Zustand gezeigt werden [34]. Auf Basis der neuen experimentellen Daten wurde ein Mechanismus, der auf der sequenziellen Freisetzung der RNA Stränge beruht vorgeschlagen [20].

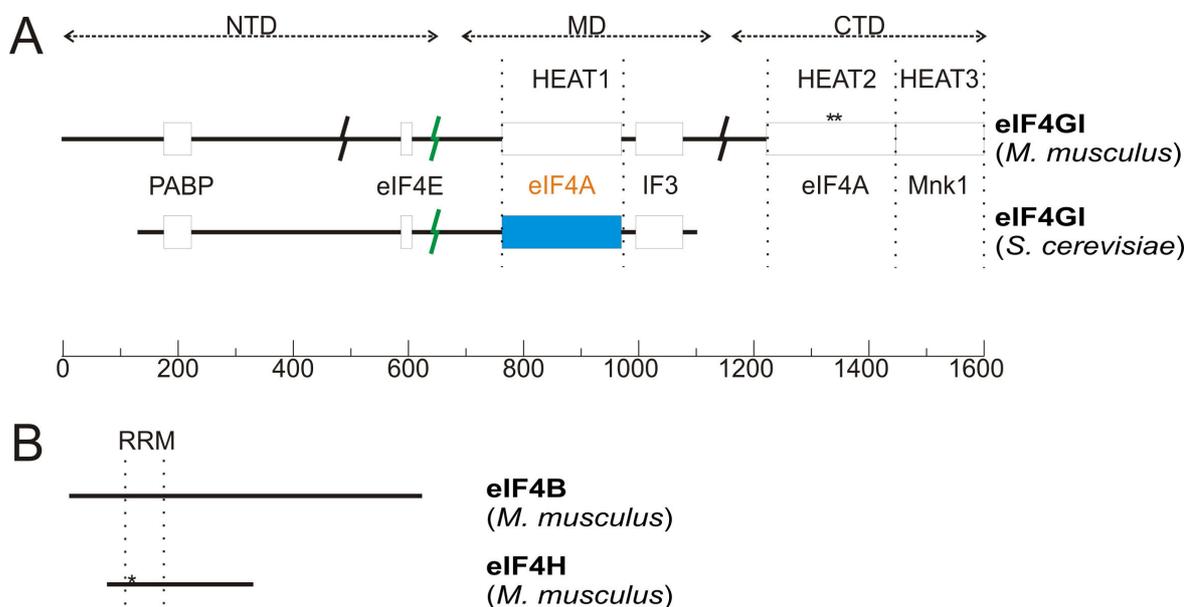
Ein Problem der Erforschung von DEAD Box Proteinen ist die fehlende direkte Vergleichbarkeit von Eigenschaften und Ergebnissen verschiedener DEAD Box Proteine untereinander. Oft ist nicht klar, welchen Einfluss die N- und C-terminalen Domänen zu verantworten haben, und welche Eigenschaften auf den Helikasekern zurück zu führen sind. Aus Experimenten mit dem eukaryotischen Translations Initiationsfaktor 4A (eIF4A), der nur aus dem Helikasekern besteht, wurde klar, dass bereits der Helikasekern alle notwendigen Funktionalitäten eines DEAD Box Proteins besitzt und die flankierenden Domänen die Aktivität des Helikasekerns lediglich modulieren, die Bindung von RNA Substraten vermitteln oder die Lokalisation des Proteins bestimmen. Da eIF4A aber mit einer Vielzahl von Initiationsfaktoren (eIF4B, eIF4E, eIF4H, eIF4G) und anderen Proteinen (z.B. Pdc5) interagiert, liegt die Vermutung nahe, dass die Rolle der flankierenden Domänen von den interagierenden Proteinen übernommen wird.

Um die Wechselwirkung zwischen dem DEAD Box Helikasekern und interagierenden Domänen zu verstehen, bietet es sich daher an mit der Charakterisierung von eIF4A zu beginnen und darauf aufbauend die Änderungen durch die wechselwirkenden Initiationsfaktoren zu bestimmen. Neben Erkenntnissen über den Einfluss von zusätzlichen Domänen auf den DEAD Box Kern führt dieses Vorgehen zu einem tieferen Verständnis der eukaryotischen Translations Initiation.

#### **Der eukaryotische Translations Initiationsfaktor 4A (eIF4A)**

Mit einer Größe von etwa 46 kDa besteht eIF4A ausschließlich aus dem Helikasekern. Zusätzliche Domänen, die den Mechanismus beeinflussen oder Substrataffinität vermitteln könnten, sind nicht vorhanden. Trotzdem zeigt eIF4A schwache Helikaseaktivität und entwindet ATP abhängig kurze RNA Doppelstränge. Im Gegensatz zu anderen DEAD Box Proteinen ist die Entwindungseffizienz nicht von einem 3' oder 5' Einzelstrangüberhang abhängig [35]. Mit etwa 50 µM ist die Konzentration von eIF4A *in vivo* extrem hoch [36, 37]. eIF4A zeigt, wenn auch teilweise stark reduziert, die für DEAD Box Proteine charakteristischen Eigenschaften wie RNA stimulierte ATPase und Helikase Aktivität, sowie die durch das Q Motiv verursachte Selektivität der Hydrolyse für (d)ATP [38, 39]. Daher gilt der eukaryotische Translations Initiationsfaktor 4A (eIF4A) als Prototyp der DEAD Box Proteine [40].

Eine umfangreiche thermodynamische Charakterisierung der Interaktion von eIF4A mit RNA, ADP und ATP erfolgte 1998 von Lorsch und Herschlag [41]. Für die Nukleotide und RNA wurde schwache Affinität mit einer Dissoziationskonstante im mittleren bis hohen mikromolaren Bereich ermittelt. In derselben Publikation wurde ein Puffer mit reduzierter Salzkonzentration und reduziertem pH (Puffer B, Seite 29) beschrieben, der zu erhöhter Nukleotid- und RNA Affinität führte. Anhaltspunkte für eine physiologische Bedeutung dieser Pufferbedingungen fehlen allerdings. Trotzdem wurde dieser Puffer oft von nachfolgenden Arbeiten und auch in dieser Arbeit aufgegriffen, um die Nukleotid und RNA Affinität zu verbessern.

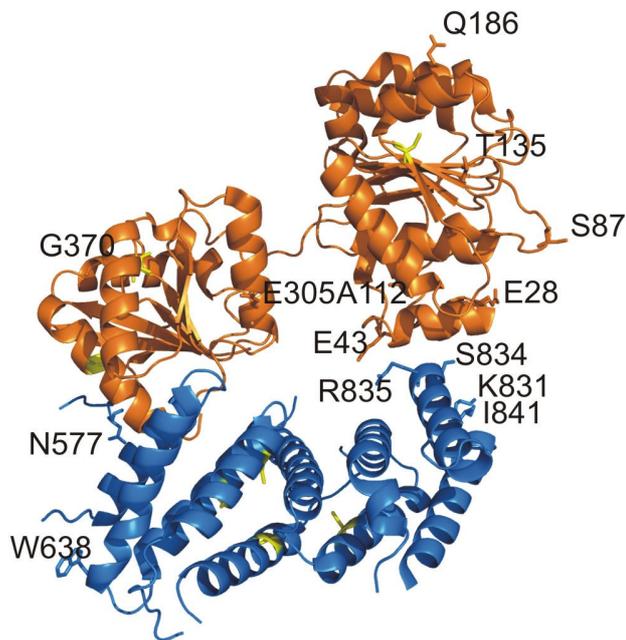


**Abbildung 3 (A)** Vergleich von eIF4G1 aus *M. musculus* und *S. cerevisiae* und Illustration ausgewählter Proteinbindungsstellen. eIF4G wird in drei Regionen eingeteilt. Die regulatorische C terminale Domäne (CTD), die in eIF4G aus *S. cerevisiae* (eIF4Gy) fehlt, die für die Translations Initiation essentielle mittlere Domäne (MD) und die N terminale Domäne (NTD). Die Abgrenzung der NTD erfolgt anhand der Spaltstelle viraler Proteasen (grüner Blitz). Die NTD bindet das CAP bindende Protein (eIF4E) und das polyA bindende Protein (PABP) und ermöglicht dadurch die Erkennung von 5' und 3' Anfang und Ende von mRNA. eIF4G MD bindet neben eIF4A auch den Initiationsfaktor 3 (IF3) und vermittelt über diesen den Kontakt zur kleinen Ribosomenuntereinheit. Die CTD bindet neben eIF4A die MAP Kinase interagierende Kinase 1 (Mnk1), die zur Phosphorylierung von eIF4E führt. Die beiden eIF4A Bindungsstellen und die Mnk1 Bindungsstellen bestehen aus HEAT Domänen. In blau ist das im experimentellen Teil dieser Arbeit verwendete Fragment eIF4Gy(572-853) dargestellt. Als schwarze Blitz sind die Caspase3 Spaltstellen gezeigt, die die Regulation der Proteinbiosynthese während der Apoptose ermöglichen. Damit ist lediglich eine Auswahl der Proteinbindungs- und Proteasestellen in eIF4G gezeigt. Es existieren weiter verschiedene RNA bindende Regionen und Phosphorylierungsstellen, sowie in jedem Organismus mehrere verschiedene eIF4G Isoformen. **(B)** Vergleich von eIF4B und eIF4H aus *M. musculus*. eIF4H ist über die gesamte Länge homolog zu eIF4B. Beide Proteine enthalten ein RNA Erkennungsmotiv (RRM). Die für die Klonierung hinderlichen NcoI Schnittstellen sind durch einen Stern gekennzeichnet.

### Interaktionspartner von eIF4A

In Übereinstimmung mit der Interpretation von interagierenden Proteinen als Ersatz für die fehlenden flankierenden Domänen in eIF4A, konnte eine Aufgabe *in vivo* nur im Komplex mit anderen Proteinen ermittelt werden. Die Translations Initiation ist ein präzise regulierter Prozess. Dementsprechend komplex ist das Zusammenspiel zwischen den beteiligten Proteinen. Im Folgenden wird eine kurze Einführung der verwendeten Proteine und für diese Arbeit wichtigen Aspekte gegeben.

eIF4G, eIF4B und eIF4H interagieren direkt mit eIF4A. Rogers *et. al.* haben ihren Einfluss auf eIF4A allgemein als leichte Erhöhung der Prozessivität und die Notwendigkeit für längere RNA Substrate für effiziente Stimulierung beschrieben [40]. Der **eukaryotische Translations Initiationsfaktor 4G (eIF4G)** aus Maus ist ein 175 kDa großes Protein von zentraler Bedeutung in der Translations Initiation. Zwar hat eIF4G selbst keine ATP Hydrolyse oder Helikase Aktivität, besitzt aber multiple Protein Bindungsstellen und dient als Gerüst für die Bildung des Multiprotein Translations Initiationskomplex (Abbildung 3). Sowohl in Hefe als auch in Säugetieren existieren verschiedene Variationen von eIF4G, die unterschiedliche Regulation ermöglichen. Alle eIF4G werden in eine N terminale (NTD), eine mittlere und eine C terminale (CTD) Domäne unterteilt (Abbildung 3). In der mittleren und der C terminalen Domäne wurde je eine eIF4A Bindungsstelle identifiziert [42, 43]. Die zweite eIF4A Bindungsstelle ist jedoch nicht essentiell für die Translations Initiation [44]. Beispielsweise fehlt die komplette CTD in eIF4G aus Hefe (Abbildung 3). Die zweite eIF4A Bindungsstelle hat vermutlich regulatorische Funktion. Beide eIF4A Bindungsstellen bestehen aus sogenannten HEAT Domänen, die aus jeweils 5 antiparallel angeordneten Paaren von  $\alpha$  Helices bestehen. Die HEAT Faltung ist typisch für Proteine, die am Zusammenbau von großen Multiproteinkomplexen beteiligt sind. Dieser Faltungstyp wurde nach vier Proteinen mit diesem Faltungsmuster (Huntingtin, Elongationsfaktor 3, Untereinheit A der Protein Phosphatase 2A und TOR1) benannt [45]. Neben den beiden eIF4A Bindungsstellen (HEAT1 und HEAT2) enthält eIF4G eine weitere HEAT Domäne (HEAT3). Auch HEAT3 hat regulatorische Funktion und rekrutiert die MAP Kinase interagierende Kinase 1 (Mnk1) an den Translations Initiation Komplex. Abbildung 4 zeigt die Kristallstruktur von eIF4A im Komplex mit HEAT1 aus Hefe. Es ist deutlich zu erkennen, dass eIF4G beide Domänen von eIF4A kontaktiert.



**Abbildung 4** Cartoon Darstellung der Struktur von eIF4A (orange) im Komplex mit eIF4G(572-853) (blau) aus *S. cerevisiae* (PDB ID 2vso). Deutlich sind die 10 antiparallelen  $\alpha$  Helices der HEAT Faltung von eIF4G(572-853) und die RecA artige N (rechts, orange) und C terminalen Domänen (links, orange) von eIF4A zu erkennen. Die N terminale Domäne von eIF4A kontaktiert den C terminalen Bereich von eIF4G(572-853) und umgekehrt. In gelb sind nativen Cysteine dargestellt. Die im Verlauf dieser Arbeit ausgetauschte Aminosäuren sind benannt.

Neben eIF4A bindet eIF4G auch eIF4E [42, 46]. Der Komplex aus eIF4G, eIF4A und eIF4E wird als eIF4F bezeichnet. eIF4E erkennt spezifisch das 5' Ende von mRNA (CAP) und wird deshalb auch als CAP bindendes Protein bezeichnet. eIF4E und eIF4G binden kooperativ an die CAP Struktur der mRNA [47] und positionieren damit eIF4A. eIF4A verursacht unter Verbrauch von ATP eine Konformationsänderung der mRNA und ermöglicht dadurch das Laden der kleinen Ribosomenuntereinheit auf die mRNA [48, 49]. Auch das Laden der kleinen Ribosomenuntereinheit erfordert eIF4G. eIF4G sorgt über die Wechselwirkung mit eIF3 für die Orientierung der kleinen Ribosomenuntereinheit. Im Komplex mit eIF4E und dem *polyA binding protein* (PABP) [43] ermöglicht eIF4G die Zirkularisierung der mRNA [50], und damit die Qualitätskontrolle ob die mRNA vollständig ist. Darüber hinaus bindet eIF4G die Mnk1 Kinase, deren Substrat eIF4E ist [51]. Aber auch eIF4G selbst wird durch Phosphorylierung reguliert. Allein die mittlere Domäne von eIF4G hat drei Phosphorylierungsstellen [52]. Neben den in Abbildung 3 gezeigten Wechselwirkungen hat eIF4G aber auch drei RNA Bindungsstellen [53] und interagiert mit mindestens 5 weiteren viralen oder regulatorischen Proteinen [54].

Neben der CAP abhängigen Translation kann die Proteinsynthese auch CAP unabhängig durch interne Ribosomen Eintrittsstellen (IRES) erfolgen. Beispielsweise erfolgt die Translations Initiation von eIF4G selbst über eine IRES [55]. Aber auch die Synthese vieler viraler Proteine startet CAP unabhängig über IRES. Von den vier bekannten IRES Typen erfolgt die Initiation an Typ 1 und 2 durch einen Komplex aus eIF4A und der mittlere Domäne von eIF4G [56, 57]. Die Freisetzung der mittleren

Domäne von eIF4G durch virale Proteasen ermöglicht so den Missbrauch der eukaryotischen Translationsmaschinerie zur Produktion viraler Proteine. Zeitgleich besetzt die N-terminale Domäne mit der eIF4E Bindungsstelle die CAP Struktur von mRNA und blockiert dadurch die CAP abhängige Translations Initiation [54, 58, 59]. Wie bei der CAP abhängigen Initiation restrukturiert eIF4A die IRES Region und ermöglicht die Bindung der kleinen Ribosomenuntereinheit [60]. Die gezielte Spaltung von eIF4G durch Caspasen ermöglicht aber auch die Translation ausgewählter Proteine während später Phasen der Apoptose [61, 62]. Weiter führten reduzierte eIF4F Konzentrationen zu längerer Lebenserwartung bei *C. elegans* [63]. Es ist zu vermuten, dass in allen Prozessen eIF4A als enzymatisch aktive Komponente von eIF4G rekrutiert wird. Auf welche Weise eIF4G oder Fragmente von eIF4G aber den Mechanismus von eIF4A beeinflussen ist nicht bekannt.

Zur Translations Initiation durch eIF4F trägt auch eIF4B bei [64]. eIF4B ist ein 69 kDa Protein und enthält ein RNA Erkennungsmotiv (RRM). Unter nativen Bedingungen bildet eIF4B ein Dimer. Bisher existierten hauptsächlich funktionelle Hinweise auf die Wechselwirkung zwischen eIF4A und eIF4B. Die direkte Wechselwirkung zwischen eIF4A und eIF4B in Gegenwart von RNA und ADPNP wurde aber erst vor Kurzem nachgewiesen [65]. Allerdings wurde in vorhergehenden Experimenten beschrieben, dass ADPNP nicht geeignet ist, um den eIF4A/B/RNA Komplex zu stabilisieren [40, 66]. eIF4B erhöht jede bekannte Aktivität von eIF4A [64]: Es erhöht die RNA und ATP Affinität und beschleunigt dementsprechend die Helikase, ATPase und Translations Initiations Aktivität [35, 67, 68]. In Säugern wurde mit eIF4H (27 kDa) ein monomeres Homolog zu eIF4B entdeckt. Im Menschen ist die Aminosäuresequenz von eIF4H zu 39% identisch und zu 62% ähnlich mit eIF4B [69]. Beide Proteine werden vom Herpes Simplex *virion host shutoff protein* (vhs) benutzt, um gezielt die mRNA der Wirtszelle abzubauen [70]. Im Gegensatz zu eIF4B bindet eIF4H RNA aber nur schwach und zeigt vergleichsweise geringe Stimulierung der eIF4A ATPase Aktivität [71]. eIF4B und H binden aber an die selbe Region von eIF4A [65]. Wahrscheinlich ermöglichen eIF4H und eIF4B unterschiedliche Regulierung der Translations Initiation [71]. Ähnlich wie für die eIF4A eIF4G Wechselwirkung (Abbildung 4) konnte gezeigt werden, dass eIF4H beide Domänen von eIF4A kontaktiert [65]. Die Homologie zu eIF4H lässt ähnliches für eIF4B vermuten (Abbildung 3). Der Kontakt zu beiden eIF4A Domänen legt die Regulation durch einen Eingriff in die konformationelle Dynamik von eIF4A nahe. Details über den Mechanismus der Stimulierung sind aber nicht bekannt. Während man davon ausgehen kann, dass die Komponenten der Translations Initiation weitgehend identifiziert sind steht die Aufklärung der gegenseitigen Regulation noch am Anfang.

## 2. Spezielle Substrate für eIF4A

Für eIF4A konnte keine Sequenzspezifität festgestellt werden. Die Entwindung eines RNA Duplex ist von der thermodynamischen Stabilität, jedoch nicht von dessen Basenabfolge abhängig [72]. Neben der Modulation der eIF4A Aktivität durch Proteine gibt es aber Hinweise auf spezifische Wechselwirkung mit nicht kodierenden RNAs [38, 73, 74, 75]. Das einzige physiologische relevante Substrat, das die Aktivität von eIF4A reguliert ist die sogenannte *brain cytosol 1* (BC1) RNA [74, 75].

### BC1 RNA

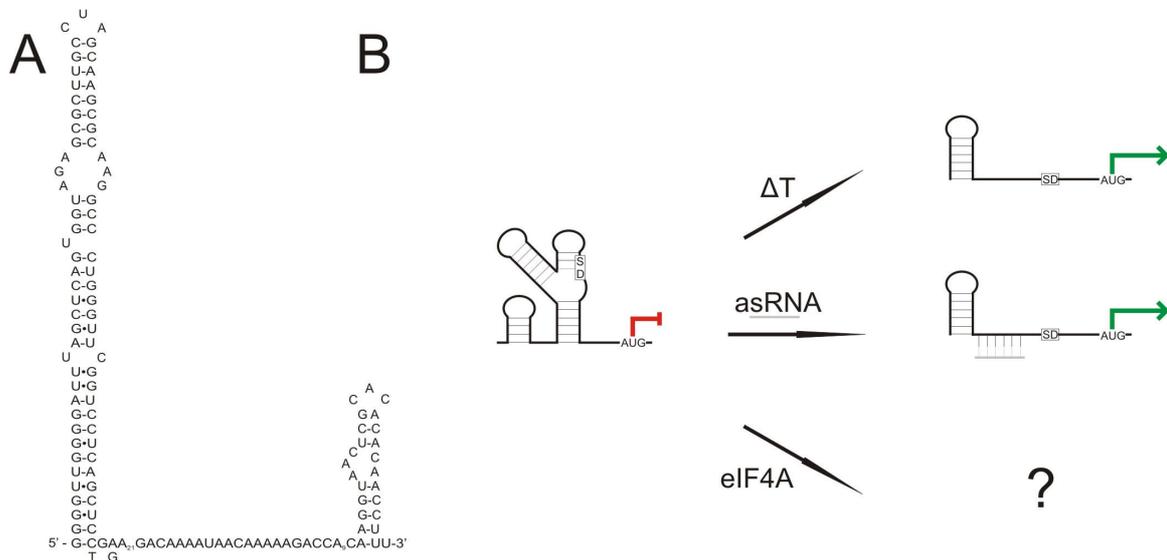
*Brain cytosol 1* (BC1) RNA wird fast ausschließlich in Nervenzellen expremiert [76] und korreliert mit deren synaptischer Aktivität [77]. Obwohl die Sequenz von tRNA<sup>Ala</sup> zu 75% identisch zu BC1 RNA ist, ist ihre Faltung verschieden. BC1 RNA besitzt eine lange 5' terminale Helix, die über einen einzelsträngigen polyA reichen Bereich mit einer kurzen Helix am 3' Ende verbunden ist (Abbildung 5, [78]). BC1 RNA bildet einen RNP Komplex [79] in dem neben eIF4A auch PABP identifiziert wurde [80]. Über die Funktion ist bekannt, dass BC1 RNA zwar die ATPase Aktivität von eIF4A erhöht, aber die *in vivo* Translationseffizienz und die *in vitro* Helikaseaktivität reduziert [74, 75]. Für die Repression der eIF4A abhängigen Translations Initiation ist die 3' terminale Hälfte von BC1 RNA ausreichend [80]. Der Mechanismus der Inhibition bzw. Stimulierung von eIF4A durch BC1 RNA ist nicht bekannt. Die Untersuchung der BC1 eIF4A Wechselwirkung verspricht aber ein besseres Verständnis der postsynaptischen Translation von dendritischer mRNA, die eine wichtige Rolle für Lernen und Gedächtnisbildung spielt [81].

### RNA Thermometer

RNA Thermometer sind sensorische RNA Sekundärstrukturen, die Ihre Faltung bei Variation der Umgebungstemperatur ändern, sodass regulatorische Elemente auf der RNA zugänglich gemacht oder blockiert werden (Abbildung 5). Häufig findet man RNA Thermometer in der 5' untranslatierten Region (UTR) von bakteriellen Genen, wo sie die temperaturabhängige Zugänglichkeit der Ribosomenbindungsstelle und damit die Regulation der Proteintranslation kontrollieren [82].

Der Einfluss von RNA Helikasen auf RNA Thermometer ist nicht charakterisiert. Es ist zu erwarten, dass RNA Helikasen, ähnlich wie die Erhöhung der Temperatur, zur Destabilisierung des Thermometers führen. Neben einer neuen Facette der Regulation durch RNA Thermometern würde dieses Verhalten einen *in vivo* Test der Helikase Aktivität ermöglichen. Das RNA Thermometer

kontrolliert dabei die Expression eines Reportergens, dessen Aktivität wäre ein Maß für die Aktivität der Helikase.



**Abbildung 5 (A)** 2D Darstellung der BC1 RNA Struktur. Die Helix am 5' Ende ist zu 75% identisch zu tRNA<sup>Ala</sup>. BC1 RNA aus *R. norvegicus* und *M. Musculus* sind zu 99% identisch. Die Unterschiede in der Sequenz sind als Alternativen im Bild gezeigt (C74T und A76G) **(B)** Schematische Darstellung der Funktionsweise von RNA Thermometern. Die Translation eines Reportergens ist reprimiert, da ein regulatorisches RNA Element (z.B. die Shine Dalgarno Sequenz, SD) in der RNA Thermometerstruktur nicht zugänglich ist. Erst durch Erhöhung der Temperatur ( $\Delta T$ ) ändert sich die Faltung des RNA Thermometers und das regulatorische Element wird zugänglich. Dadurch kann das Reportergen nur bei erhöhten Temperaturen translatiert werden. Durch *antisense* RNA (asRNA) in Kombination mit niedrigeren Temperaturen kann die Thermometerstruktur ähnlich beeinflusst werden. Der Effekt von RNA Helikasen auf RNA Thermometer ist nicht untersucht. Es ist aber zu vermuten, dass die RNA Helikase Aktivität mit der Expression des Reportergens korreliert. Auf dieser Grundlage könnte ein *in vivo* Helikase Aktivitätstest etabliert werden.

### 3. Spezielle Techniken

#### Förster Resonanz Energie Transfer (FRET) als molekulares Lineal

Im katalytischen Zyklus von eIF4A treten große Konformationsänderungen auf [28]. Da interagierende Proteine beide eIF4A Domänen gleichzeitig kontaktieren können (Abbildung 4, [65, 83, 84]), wäre die Regulation der eIF4A Aktivität durch Einfluss auf die konformationelle Dynamik von eIF4A möglich. Um die direkte Beobachtung der Konformation von eIF4A zu ermöglichen wurde die Abstandsabhängigkeit der Energietransfereffizienz von proteingekoppelten Farbstoffen ausgenutzt.

### **Förster Resonanz Energie Transfer**

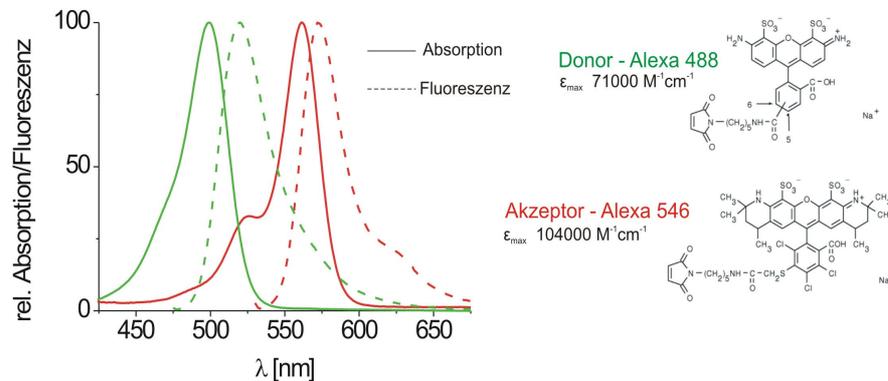
Überlappt der Emissionsbereich eines Fluoreszenzfarbstoffes (Donor) mit dem Absorptionsbereich eines anderen Fluorophors (Akzeptor), kann es zu strahlungsfreiem Energietransfer der Anregungsenergie vom Donor zum Akzeptor kommen. Der Formalismus für diesen Energietransfer wurde von Theodor Förster [85] beschrieben, weshalb man auch von Förster Resonanz Energie Transfer (FRET) spricht. Neben dem Überlapp des Absorptions- und Emissionsbereich (J) hat aber auch die Orientierung der Übergangsdipolmomente zueinander ( $\kappa$ ), der Brechungsindex des Medium (n) und die Quantenausbeute des Donors ( $\phi_D$ ), sowie der Abstand zwischen Donor und Akzeptor Einfluss auf den Energieübertrag. Gleichung 1 beschreibt die Energieübertragungseffizienz ( $E_{\text{FRET}}$ ) in Abhängigkeit des Abstands (r) zwischen den Fluorophoren und dem Försterradius ( $R_0$ ). Der Försterradius beschreibt den Farbstoffabstand bei dem die Hälfte der Anregungsenergie vom Donor auf den Akzeptor übertragen wird ( $E_{\text{FRET}} = 0,5$ ). Durch ihn kann das FRET Verhalten eines Donor-/Akzeptor Paares unter Berücksichtigung der oben erwähnten Parameter beschrieben werden (Gleichung 26). Auf die Berechnung des Försterabstandes wird in Material und Methoden eingegangen.

$$E_{\text{FRET}} = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad (1)$$

Die Abstandsabhängigkeit der FRET Effizienz kann als 'molekulares Lineal' zum Messen der Farbstoffabstände verwendet werden. Sind die Farbstoffe an definierten Stellen an ein Protein gekoppelt kann durch FRET die Konformation des Proteins beobachtet werden.

### **Donor und Akzeptor Farbstoff für FRET Experimente**

Als Donor und Akzeptor Paar für die FRET Experimente wurden Alexa Fluor® 488 (A488) und Alexa Fluor® 546 (A546) (*Molecular Probes*) verwendet. A488 und A546 sind photostabile Fluoreszenzfarbstoffe mit hohen Absorptionskoeffizienten und hoher Quantenausbeute. Sie sind kommerziell als thiolreaktive Maleimide erhältlich (Abbildung 6). Die, durch den Elektronenzug der benachbarten Sauerstoffe aktivierte, Doppelbindung des Maleimids kann von der deprotonierten Form eines Cystein nukleophil angegriffen werden (Michael Addition). Dies führt zur ortsspezifischen, kovalenten Immobilisierung des Farbstoffs auf einem Protein.



**Abbildung 6** Alexa 488 (A488) und Alexa 546 wurden als Donor bzw. Akzeptorfarbstoffe in FRET Experimenten verwendet. Absorption (durchgängige Linie) und Fluoreszenzemissionsspektren (gestrichelte Linie) von A488 (grün) und A546 (rot). Rechts sind die Strukturen der thiolreaktiven Farbstoffe und deren maximaler Absorptionskoeffizient ( $\epsilon_{\max}$ ) angegeben.

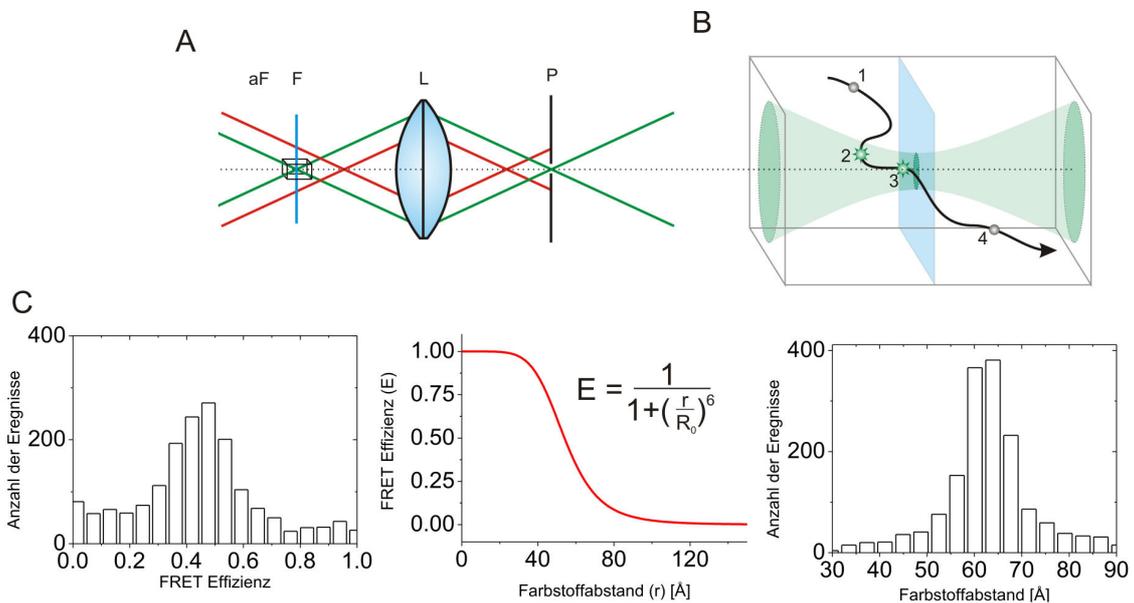
### Einzelmoleküldetektion

Die Energietransfereffizienz beschreibt das Verhältnis der Anregung des Akzeptorfarbstoffs ( $I'_A$ ) zur Anregung von Akzeptor und Donorfarbstoff ( $I'_A$  und  $I'_D$ , Gleichung 2). Um die FRET Effizienz aus den experimentell zugänglichen Werten für die Donor und Akzeptor Intensität ( $I_D$  und  $I_A$ ) zu ermitteln, sind allerdings noch die in Material und Methoden beschriebenen Korrekturen notwendig (Seite 49)

$$E_{\text{FRET}} = \frac{I'_A}{I'_A + I'_D} \quad (2)$$

Im Ensemble sind Donor- und Akzeptorintensität die Summe der Photonen aller Moleküle. Dementsprechend wird nur die mittlere FRET Effizienz aller Moleküle beobachtet. Im Gegensatz dazu ermöglicht die Detektion der FRET Effizienz von einzelnen Molekülen (smFRET) die Identifizierung unterschiedlicher Konformationen.

Die Detektion einzelner Moleküle wird durch ein konfokales Mikroskop ermöglicht. Zusätzlich zur Fokussierung des Anregungslichts in das Probenvolumen wird nur die Fokusebene detektiert, indem das Emissionslicht durch eine Lochblende gefiltert wird (Abbildung 7). Diese Unterdrückung des Fluoreszenzlichts aus außerfokalen Bereichen führt zu einer Einschränkung des Beobachtungsvolumens auf wenige Femtoliter. In Kombination mit einer entsprechend geringen Probenkonzentration (etwa 50 pM) befindet sich im Schnitt weniger als ein Molekül im Beobachtungsvolumen. Für jedes Molekül, das durch das Detektionsvolumen diffundiert, wird die FRET Effizienz ermittelt. Die Darstellung von mehreren hundert Einzelereignissen in Histogrammen (Abbildung 7) veranschaulicht die Verteilung der FRET Effizienzen oder nach Umrechnung von Gleichung 1 die Verteilung der Konformationen in der Probe.



**Abbildung 7 (A)** Selektion des konfokalen Volumens. Das Fluoreszenzlicht aus dem Fokus (F, Strahlengang grün) wird durch eine Linse (L) auf eine Lochblende (P) abgebildet. Dadurch wird Licht von Positionen außerhalb des Fokus' (aF, Strahlengang rot gestrichelt) effektiv entfernt. **(B)** Vergrößerte Darstellung des Fokus aus (A). Gezeigt ist der Diffusionsweg eines Teilchens. Außerhalb des Strahlengangs (grün) findet keine Anregung statt (1,4). Im Strahlengang wird das Molekül angeregt, aber nicht detektiert (2). Detektion erfolgt nur innerhalb der durch die Lochblende (P) selektieren Ebene (F) (3). Das Signal eines Moleküls, während es durch das Detektionsvolumen diffundiert, entspricht einem Ereignis. **(C)** Darstellung der smFRET Daten in FRET Effizienz- und Abstands- Histogrammen. Die Auftragung der Anzahl der Ereignisse gegen die entsprechende FRET Effizienz zeigt die Verteilung der FRET Effizienzen in der Probe (links). Durch den Zusammenhang zwischen der FRET Effizienz und dem Farbstoffabstand (Mitte, Gleichung 1) können dieselben Daten als Verteilung der Farbstoffabstände (respektive Konformationen) dargestellt werden (links). Dabei sind die unterschiedlichen Sensitivitäten für Abstandsänderungen zu beachten. Im Bereich des Försterradius verursachen Abstandsänderungen eine große Änderung der FRET Effizienz und können deshalb besonders sensitiv verfolgt werden.

## SELEX

Zur Messung der Proteinkonformation mit FRET müssen ein Donor- und ein Akzeptorfarbstoff an definierten Stellen des Proteins immobilisiert sein. Die gezielte Reinigung dieser doppelmarkierten Proteine würde die Qualität der resultierenden smFRET Daten deutlich verbessern. Aus diesem Grund wurde nach Aptameren für Donor- und Akzeptorfarbstoff gesucht. Aptamere sind Nukleinsäuren, die durch ihre dreidimensionale Faltung hohe Affinität zu ihrem Epitop aufweisen. *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment* (SELEX) ist eine *in vitro* Technik zur Isolierung von Aptameren aus einem Pool von Nukleinsäuren [86, 87]. Für die Selektion wird das Epitop auf magnetischen Kügelchen immobilisiert und mit einem RNA Pool inkubiert. Die Selektion erfolgt in einem iterativen Prozess aus den Schritten: Selektion, Amplifikation und RNA Synthese (Abbildung 8).

## **Selektion**

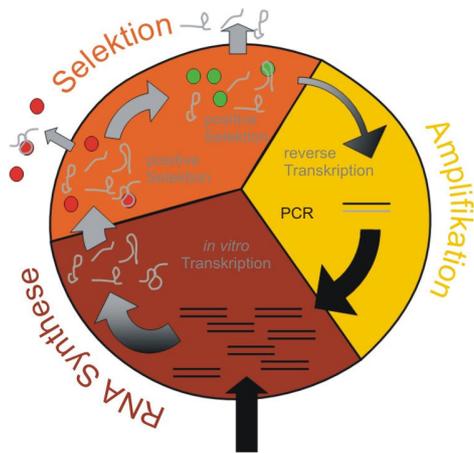
Man unterscheidet prinzipiell zwischen negativer und positiver Selektion. In der **negativen Selektion** werden RNA Sequenzen aus dem Pool entfernt, die anstatt des Zielmoleküls die Oberfläche der zur Immobilisierung verwendeten Kügelchen erkennen. Dazu werden die unmarkierten Kügelchen mit dem RNA Pool inkubiert und anschließend inklusive der gebundenen RNA verworfen. Um die Selektivität der Aptamere gezielt zu erhöhen, können in diesem Schritt auch Kügelchen mit komplementären Targets eingesetzt werden. In der negativen Selektion für die FRET Farbstoffe A488 und A546 wurde deshalb der jeweils andere Farbstoff eingesetzt. In der **positiven Selektion** wird der RNA Pool mit dem immobilisierten Zielmolekül inkubiert. Die gewünschten RNAs reichern sich an der Oberfläche der Kügelchen an. Der Überstand mit den Nukleinsäuren, die nicht oder nur schwach an das Zielmolekül binden, wird verworfen. Die an die markierten Kügelchen gebundene RNA wird im nächsten Schritt vermehrt. Um nur hochaffine Aptamere zu isolieren, werden die Inkubationsbedingungen für negative und positive Selektion von Runde zu Runde variiert. Die Inkubationszeiten sowie die Epitopkonzentration in der negativen Selektion werden kontinuierlich erhöht, während sie in der positiven Selektion verringert werden.

## **Amplifikation**

Während der Selektion nimmt die Variabilität im RNA Pool deutlich ab. Zeitgleich verringert sich aber auch die RNA Konzentration deutlich. Vor dem nächsten Selektionsschritt wird deshalb die RNA vermehrt. Dazu wird die RNA durch reverse Transkription (RT-PCR) in ssDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgt die Amplifikation durch PCR. Die PCR erfolgt durch definierte Primersequenzen, die die randomisierte Sequenz flankieren. Der entstehende dsDNA Pool wird als Template für die Neusynthese von RNA verwendet.

## **RNA Synthese**

Durch *in vitro* Transkription (IVT) wird der dsDNA Pool in ssRNA translatiert. Die Translation startet von einem T7 Polymerase Promotor der im 5´ Primer der PCR Amplifikation eingeführt wurde. Der erhaltene RNA Pool wird für weitere Selektionsrunden eingesetzt.



**Abbildung 8** Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX) besteht aus drei sich wiederholenden Phasen. Von einem dsDNA Pool ausgehend wird RNA synthetisiert (RNA Synthese, braun). In der negativen Selektion wird RNA, die unspezifisch bindet, aussortiert. Während der positiven Selektion werden potentielle Aptamere an die Zielmoleküle (grüne Kugeln) gebunden und isoliert (Selektion, orange). Anschließend erfolgt die reverse Transkription und Vermehrung der selektierten RNA (Amplifikation, gelb). Es werden etwa 10 Selektionsrunden mit schrittweiser Erhöhung der Konzentration der unspezifischen Bindungspartner (rote Kügelchen) und Verringerung der Konzentration der Zielmoleküle (grüne Kügelchen) durchgeführt. Grau bezeichnet RNA, schwarz DNA. Die Dicke der Pfeile symbolisiert die Nukleinsäurekonzentration während der Selektionsrunde.

## 4. Nomenklatur

Um die Übersicht über die große Anzahl der verwendeten Proteine und Mutanten aus teilweise verschiedenen Organismen zu gewährleisten, wurde eine pragmatische und übersichtliche Nomenklatur verwendet.

Zur Bezeichnung der eukaryotischen Translations Initiationsfaktoren wurden die gängigen Abkürzungen aus der Literatur übernommen (z.B. eIF4A bzw. 4A). Proteine aus *Mus musculus* werden durch ein „m“ ergänzt. „y“ steht für Proteine aus *Saccharomyces cerevisiae* und „leif“ für *Leishmania infantum*. eIF4Am bezeichnet dementsprechend den eukaryotischen Translations Initiationsfaktor A4 aus Maus. Bei Proteinfragmenten werden die Nummern der vorhandenen Aminosäuren (aa) in Klammern genannt. eIF4Bm(176-611) bezeichnet demnach das eIF4B Fragment von aa 176 bis 611.

Die Immobilisierung der FRET Farbstoffe erfolgt über nukleophile Addition an die Thiolgruppen von Cysteinen. Bei entsprechender Zugänglichkeit werden deshalb auch native Cysteine markiert. Um die Markierung nativer Cysteine zu verhindern, wurden zugängliche Cysteine identifiziert und entfernt. Um die Konfiguration nativer Cysteine zu kennzeichnen, wurde eine vereinfachte Nomenklatur verwendet, bei der die Cysteinpositionen chronologisch in ein Aminosäurecode genannt werden. Beispielsweise enthält eIF4Am 4 native Cysteine an den Positionen 66, 131, 134 und 264. Die Cysteindoppelmutante eIF4Am C131A C134A wird dementsprechend mit eIF4Am CAAC bezeichnet. Eine Übersicht über alle Cysteinmutanten findet sich im Anhang (Seite 116).

## 5. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des Einfluss wechselwirkender Translations Initiationsfaktoren auf das minimale DEAD Box Protein eIF4A. Der Schwerpunkt lag auf der Untersuchung der konformationellen Dynamik von eIF4A und anderen Initiationsfaktoren mit smFRET Experimenten. Die smFRET Experimente sollten durch die funktionelle Charakterisierung der Helikase- und ATPase-Aktivität sowie die Bestimmung der RNA und Nukleotid Substrataffinität von eIF4A und eIF4A in Gegenwart der wechselwirkenden Proteine ergänzt werden. Voraussetzung dazu ist die Charakterisierung der Protein-Protein Wechselwirkung zwischen eIF4A und den entsprechenden Initiationsfaktoren.

Um dieses Ziel langfristig zu erreichen, sollte in dieser Arbeit mit der Klonierung von eIF4A und den Initiationsfaktoren 4H, 4B, 4G und 4E, sowie der Entwicklung der Protokolle für rekombinante Proteinproduktion und –Reinigung begonnen werden. Zur Charakterisierung der Aktivität sollten ein Test für die Messung der ATP Hydrolyse- und Entwindungsgeschwindigkeit etabliert werden.

Als Vorbereitung auf smFRET Experimente sollte eine eIF4A Mutante konstruiert werden, die keine zugänglichen nativen Cysteine enthält aber dennoch wildtypisches Verhalten zeigt. Ausgehend von diesem Pseudowildtyp sollten smFRET Mutanten konstruiert werden, die an verschiedenen Positionen Cysteine für die Immobilisierung von smFRET Farbstoffen enthalten. Anhand der smFRET Mutante können Konformationsänderung in eIF4A beobachtet werden. Die Kombination der Abstandsinformationen von mehreren smFRET Mutanten ermöglicht die Rekonstruktion der Proteinkonformation.

Durch diese Experimente wird nicht nur ein tieferer Einblick in die komplexen Wechselwirkungen während der eukaryotischen Translations Initiation und die Aufgabe von eIF4A möglich. Die erwarteten Daten ermöglichen die exemplarische Beschreibung der Regulation des DEAD Box Helikasekerns durch zusätzliche Domänen, ein Phänomen, das für alle DEAD Box Proteine vermutet wird.

# III. Materialien und Methoden

## 1. Materialien

### Vektoren

Die nachfolgende Tabelle (Tabelle 1) zeigt ausgewählte Merkmale der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide. Mit Ausnahme von pBAD24Xho und pBCX607 handelt es sich um kommerziell erhältliche Plasmide. pBAD24Xho unterscheidet sich von pBAD24 durch die Einführung einer XhoI Schnittstelle im Polylinker (MCS). pBCX607 wurde von Prof. J. Brosius (Universität Münster) zur Verfügung gestellt und ist ein pUC13 basierter Vektor, der die Sequenz von BC1 RNA aus *Rattus norvegicus* trägt.

**Tabelle 1** ausgewählte Merkmale der verwendeten Plasmide

Name	Verwendung	Resistenz	Insert(Schnittstellen)	Promotor (Induktor)	
pET28a	Proteinproduktion	Cm	eIF4xm (NcoI/XhoI) eIF4xy ( Nde/XhoI)	T7 (IPTG)	
pETM30	Proteinproduktion	Cm	eIF4Am (NcoI/XhoI)	T7 (IPTG)	
pBAD24Xho	Proteinproduktion	Amp	eIF4Am (NcoI/XhoI)	araB (Arabinose)	T1339G
pBluescript II KS	Klonierung	Amp		T7 (IPTG)	
pYX-Asc	Klonierung	Amp	eIF4G IRAV		
pBCX607	IVT	Amp	BC1	T7 (IPTG)	

## Bakterienstämme

Für diese Arbeit wurden folgende *E. coli* B Stämme verwendet:

*E. coli* B trägt das *dam* Gen, dessen Proteinprodukt das N6-Adenin in der Sequenz GATC methyliert [88]. Weiter ist *E. coli* B defizient für die Ion Protease.

**BL21(DE3):** *E. coli* B F- *dcm ompT hsdS*( $r_B^- m_B^-$ ) *gal*  $\lambda$  (DE3)

Dieser Stamm ist für verbesserte Proteinstabilität *ompT* Protease defizient und enthält eine Insertion der DE3  $\lambda$  Prophagen mit Genen für die T7 RNA Polymerase und den lac Repressor.

**BL21-CodonPlus®(DE3)-RP (Stratagene):**

*E. coli* B F- *ompT hsdS*( $r_B^- m_B^-$ ) *dcm+* Tet<sup>r</sup> *gal*  $\lambda$  (DE3) *endA Hte* [*argU proL Cam*<sup>r</sup>]

wie BL21(DE3), trägt aber zusätzlich ein Plasmid, das Chloramphenicolresistenz vermittelt und die Verfügbarkeit der seltene tRNAs für Arginin und Prolin (AGG,AGA und CCC) erhöht.

**ArcticExpress™ (DE3) (Stratagene):**

Dieser Stamm hat denselben Genotyp wie BL21-CodonPlus®(DE3), koexprimiert aber zusätzlich unter Kontrolle eines T7 Promotors die Chaperone Cpn60 und Cpn10 aus dem psychrophilen Bakterium *Oleispira antarctica*.

**Rosetta 1/2 pRARE, [*argU proL ileY leuW Cam*<sup>r</sup>]** (Merck Bioscience):

wie BL21 (DE3), Rosetta 1 trägt aber zusätzlich ein Plasmid, das Chloramphenicolresistenz vermittelt und erhöht die Verfügbarkeit der seltenen tRNAs für Isoleucin, Leucin, Arginin und Prolin (AUA, CUA, AGG, AGA und CCC). Rosetta 2 codiert zusätzlich für weitere seltene Arginin tRNAs (CGG und CGA)

**XL1 blue (Stratagene):**

*endA1 gyrA96*(nal<sup>R</sup>) *thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'* [::Tn10 *proAB*<sup>+</sup> *lacI*<sup>q</sup>  $\Delta$ (*lacZ*)M15] *hsdR17*( $r_K^- m_K^+$ )

## Nukleinsäuren und Nukleotide

DNA Primer wurden von *SigmaAldrich* oder *Microsynth* synthetisiert. Eine Übersicht aller Primersequenzen findet sich im Anhang (Seite 115). Kurze RNAs wurden von *Microsynth* synthetisiert. BC1 RNA wurde durch *in vitro* Transkription (IVT, Seite 38) hergestellt. polyU RNA für ATPase Messungen stammt von *GE Healthcare*, polyG RNA von Sigma Aldrich.

Das ATP Analogon ADP-BeF<sub>x</sub> für smFRET Experimente wurde durch Mischen von Natriumfluorid mit Berylliumchlorid und ADP erzeugt (82,5 mM NaF; 82,5 mM BeCl<sub>2</sub>, 16,5 mM ADP). Das ATP Analogon ADPNP stammt von *SigmaAldrich*. Die fluoreszierenden methylantraniloyl (mant) Nukleotide stammen von Jena *Biosciences*.

## Puffer und Stammlösungen

Alle angegebenen pH Werte beziehen sich auf 4°C. Alle Puffer wurden aus steril filtrierten Stammlösungen hergestellt.

**Puffer A** [41]: 20 mM Tris/HCl pH 7,5; 80 mM KCl; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; 1% Glycerin

**Puffer B** [41]: 20 mM MES/NaOH pH 6,0; 10 mM KAc, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT

**Entwindungspuffer**[72]: 20 mM HEPES pH 7,5; 70 mM KCl; 2 mM DTT; 1 mM MgAc

**SEC und Proteinlagerpuffer**: 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 200 mM NaCl, 2 mM β-ME

**0,5x TBE**: 44,5 mM Tris, 44,5 mM Borat, 1 mM EDTA

**4x SDS Probenpuffer**: 130 mM Tris/HCl; pH 6,8; 200 mM DTT; 20% (v/v) Glycerin; 4% (w/v) SDS; 0,01% (w/v) Bromphenolblau)

## 2. Allgemeine Methoden

### Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS PAGE)

Die denaturierende Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) nach Lämmli [89]. Zur Probenvorbereitung wurden 10 µl Proteinprobe mit 8 µl 4x SDS Probenpuffer gemischt. Wenn nicht anders angegeben wurde der Proteinstandard Roti-Mark Standard (Roth), der Proteine der Masse 200, 119, 66, 43, 29, 20 und 14,5 kDa enthält, verwendet. Im Proteinsammelgel (125mM TRIS/HCl pH 6,6; 0,06% (w/v) SDS; 4,5% (v/v) Acrylamid; 0,1% (v/v) N,N'-Methylenbisacrylamid) wird die Probe fokussiert. Im Trenngel (375 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1% (w/v) SDS; 10 (bzw. 15)% (v/v) Acrylamid; 0,27% (v/v) N,N'-Methylenbisacrylamid) erfolgt die Trennung aufgrund des Molekulargewichts während ca. 50 min (30 mA). Die Gele wurden mit Coomassie-Brillantblau unter leichtem Schütteln gefärbt (30 min; RT; 50% (v/v) Ethanol; 10% (v/v) Essigsäure; 0,1% (w/v) Brillant Blau R-250) und anschließend entfärbt bis Proteinbanden sichtbar wurden (RT; 20% (v/v) Ethanol; 10% (v/v) Essigsäure). Bis zur Dokumentation wurden die Gele in MilliQ-H<sub>2</sub>O gelagert. Zur Dokumentation wurde eine UV-Wandelplatte verwendet.

## Native Polyacrylamid Gelelektrophorese (native PAGE)

Zur Trennung von Proteinen unter nativen Bedingungen wurden 8% PA Gele in 0,5x TBE verwendet. Nach mindestens 30 min Vorlauf (4°C, 7 V/cm, 0,5x TBE) wurden die Proben in Nativpuffer (10% Glycerin, 0,02% (w/v) Bromphenolblau, 0,02% (w/v) Xylencyanol) aufgetragen. Die Trennung erfolgte während 16 h bei 4°C (7 V/cm, 0,5x TBE). Die Detektion erfolgt analog zur SDS PAGE.

## Agarose Gelelektrophorese

Zur Analyse von PCR Produkten und Plasmiden wurde 0,8-2% (w/v) Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Die Agarose wurde in 0,5x TBE in der Mikrowelle bis zum Sieden erhitzt und zum Erstarren in die Gelform gegossen. Vor dem Auftragen werden die Proben mit einem Sechstel Volumen Ladepuffer (10 mM EDTA pH 8; 50% (v/v) Glycerin; 0,02% (w/v) Bromphenolblau; 0,02% (w/v) Xylencyanol) gemischt und während 20 min bei 16 V/cm getrennt. Zur Visualisierung wurden die Gele 30 min in Ethidiumbromid- (EtBr) Färbelösung (ca. 1 µg/ml EtBr in Wasser) inkubiert, danach kurz in Wasser gewaschen und anschließend unter UV Licht dokumentiert.

## Analytische Größenausschlusschromatographie (SEC)

Die Komplexbildung zwischen Proteinen unter nativen Bedingungen wurde durch analytische SEC untersucht. Dabei kamen eine Superdex 75 10/300 und eine Superdex 200 10/300 an einem ÄKTAPurifier (alle *GE Healthcare*) zum Einsatz. Die Wechselwirkung zwischen eIF4Am und eIF4Bm wurde in SEC Puffer, die Wechselwirkung zwischen eIF4Ay und eIF4G(572-853)y in 20 mM Tris/HCl pH 7,5; 80 mM KCl [83] untersucht (1ml/min). Zur Quantifizierung der Gleichgewichtskonzentrationen wurde der Absorptionsverlauf durch die Summe von drei Gaußkurven beschrieben. Variiert wurden die Flächen der Kurven sowie die Position und Breite der Gaußkurve, die den Komplex beschreibt. Position und Breite der Gaußkurven, die die isolierten Proteine beschreiben, wurden experimentell bestimmt. Mithilfe der entsprechenden Absorptionskoeffizienten und der Schichtdicke der ÄKTAPurifier Flusszelle ( $d=0,2\text{cm}$ ) wurden die Gleichgewichtskonzentrationen nach Lambert Beer bestimmt. Daraus wurde nach Gleichung 9 die Dissoziationskonstante  $K_D$  berechnet.

## Pufferaustausch und Konzentrieren von Lösungen

Auf dem Prinzip der Größenausschlusschromatographie (SEC) beruhen die Säulen MicroSpin P6, P30 (BioRad) und MicroSpin G-25 sowie NAP5 und NAP10 (GE-Healthcare). Die Anwendung erfolgte nach Herstellerangaben. Zum Pufferaustausch an Membranen wurden Mikrodialyse an Nitrozellulosemembranen (Millipore) oder an regenerierte Cellulose (Spektra/Por® MWCO 12-14 kDa) getestet. Konzentrieren von Proteinlösungen erfolgte in einer Amicon Ultrafiltration Zelle (MWCO 10 kDa; Millipore) oder Vivaspin 6 bzw. 20 Konzentratoren (10 kDa MWCO, Sartorius Stedim Biotech) nach Angaben der Hersteller.

## Selektive Proteinspaltung

Die Aspartat-Prolin Peptidbindung kann im sauren Milieu selektiv gespalten werden [90]. Dazu wurde das Protein in 10% Essigsäure gelöst und 4 Tage bei 37°C inkubiert [91]. Vor der Analyse wurden die Proben durch TCA gefällt (Seite 31). Die Beschleunigung der Spaltung (1 h; 95°C, mit Öl überschichtet) ist nicht möglich, da unter diesen Reaktionsbedingungen auch andere Peptidbindungen labil sind.

Die selektive Spaltung der Peptidbindung nach Methionin erfolgte durch Inkubation im Dunkeln über Nacht in 100 µM BrCN und 0,1 M NaCl. Nach Zugabe des 5 fachen Volumens Wasser wurde die Probe lyophilisiert und anschließend mit SDS PAGE (Seite 29) analysiert.

## Aceton und TCA Proteinfällung

Nicht saure Proben wurden mit dem 3 fachen Volumen kaltem Aceton versetzt. Sehr saure Proben aus der Aspartat-Prolin Spaltung wurden durch Zugabe eines viertel Volumens 50% (w/v) TCA gefällt. Beide Fällungsarten wurden sorgfältig gemischt und mindestens 15 Minuten auf Eis inkubiert. Das Protein wurde durch Zentrifugation pelletiert (15 min; 16.000 g) und mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend mit SDS PAGE (Seite 29) analysiert.

## GST-GSH *pull down*

Zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen eIF4Am und eIF4Bm wurden 10 µM eIF4Am-GST Fusionsprotein und 20 µM eIF4Bm mit 100 µL GSH Säulenmaterial (*GE Healthcare*) für 10 min in Puffer A inkubiert. Anschließend wurde das GSH Säulenmaterial 3 mal mit je 100 µL Puffer

gewaschen. Die Elution erfolgte spezifisch durch TEV-Spaltung oder unspezifisch durch Kochen in 1x SDS Puffer.

## Absorptionsspektroskopie

Die Bestimmung der Konzentration ( $c$ ) von Lösungen erfolgte aus der Absorption ( $A$ ) nach Lambert Beer (Gleichung 3). Die entsprechenden Absorptionswerte ( $A$ ) wurden am Ultropec 2100 (*Amersham Biosciences*) in Quarzküvetten (Hellma, Schichtdicke  $d = 1$  cm) gemessen. Die Absorptionskoeffizienten für Proteine wurden durch ProtParam berechnet [92].

$$c = \frac{A}{\epsilon d} \quad (3)$$

## 3. Proteinproduktion und –reinigung

### Fermentation

Alle Proteine wurden rekombinant in *E. coli* überproduziert.

Die meisten eIF4Am Mutanten konnten erfolgreich in Rossetta1/2 Zellen in 4 L LB Medium (10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl, 20 µg/mL Km, 5 µg/ml Cm, *antifoam*) bei 37°C unter konstanter Pressluftzufuhr produziert werden. Die Induktion erfolgte bei einer Optischen Dichte (O.D.) von 0,4-0,6 etwa 2 h nach der Inokulation mit 40 mL ÜN Kultur mit 0,1 mM IPTG für 4h.

Einige schwerlösliche eIF4Am mehrfach Cysteinmutanten mussten in *ArcticExpress*<sup>™</sup> (DE3) Zellen als GSH Fusionsprotein produziert werden. Die Produktion in *ArcticExpress*<sup>™</sup> (DE3) Zellen erfolgt in 4 L LB Medium ohne Antibiotika bei 12°C und 1 mM IPTG während 24 h. Vor Induktion werden die Zellen für 4 h bei 37°C inkubiert, um höhere Zelldichten zu erreichen.

Alle Hefe Proteine und eIF4Bm wurden in 800 ml selbstinduzierendem Medium [93] während 24 h in 3 L Kolben mit Schikanen produziert. eIF4Ay wurde bei 37°C und 160 Umdrehungen pro Minute fermentiert, während eIF4G(572-853)y zur Verbesserung der Löslichkeit nach 4 h auf RT gekühlt werden musste.

Nach der Fermentation wurden die Zellen pelletiert und in 40 mL Aufschlusspuffer (100 mM NaCl (für eIF4Am), 200 mM für eIF4Bm, 500 mM für eIF4Am-GSH bzw. 1 M NaCl für eIF4Ay/Gy(572-853) und 50 mM Tris/HCl pH 7,5) resuspendiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

## Zellaufschluss

Die Zellen wurden ggf. aufgetaut, auf 2 mM  $\beta$ -ME eingestellt, mit einer halben Tablette Protease Inhibitor (complete, EDTA free, Roche) versetzt und homogenisiert, bevor sie in zwei Durchläufen in einem Microfluidizer (Microfluidics) aufgeschlossen wurden. Die Zelltrümmer wurden pelletiert (30 min, 4°C, 6 000 g) und der Überstand als Rohextrakt für die Proteinreinigung weiterverwendet.

Zu analytischen Zwecken erfolgte der Aufschluss enzymatisch, in dem 40 O.D. Einheiten Zellen in 10 mL Lysepuffer (100 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 2 mM  $\beta$ -ME; 0,1 mg/mL Lysozym; 0,1 mg/mL Natriumdeoxycholat; 0,05 Tabletten Proteaseinhibitor) resuspendiert und je 20 min bei RT und auf Eis inkubiert wurde. Nach Zentrifugation (30 min; 6 000 g; 4°C) wurden 20  $\mu$ L mit 4  $\mu$ L 4x SDS Puffer gemischt und durch SDS PAGE analysiert. Um höhere Proteinkonzentrationen zu erzielen kann das Volumen des Lysepuffers deutlich reduziert werden.

## Proteinreinigung

Proteinreinigung erfolgte mit Hilfe einer Pharmacia, ÄKTAprime oder ÄKTAprime(plus) FPLC (*GE Healthcare*) bei 4°C. Die verwendeten Säulen und Säulenmaterialien stammen von *GE Healthcare*. Ausgewählte Proteineigenschaften der verwendeten Proteine sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

### **Reinigung von eIF4Am**

Zur nativen Reinigung von eIF4Am wurden zwei Puffer-Stammlösungen verwendet: der Aufschlusspuffer und derselbe Puffer mit 2,1 M NaCl. Die im Reinigungsprotokoll angegebenen Salzkonzentrationen wurden durch Mischen der beiden Puffer direkt an der FPLC eingestellt.

Der Rohextrakt wurde auf eine selbstgepackte Q-Sepharose Säule appliziert. Unter Aufschlussbedingungen band das Zielprotein und konnte durch einen Stufengradient auf 200 mM NaCl (Puffermischungsverhältnis 5%) direkt auf eine blaue Sepharose Säule (*GE Healthcare*, 5 mL) eluiert werden. Von der blauen Sepharose Säule wurde das Protein in einem Gradienten (30 mL von 0,2 auf 2,1 M NaCl) eluiert und in 2 mL Fraktionen gesammelt.

Ausgewählte Fraktionen wurden konzentriert und auf einer Sephadex 75 Säule nach Größe getrennt. Wieder wurden ausgewählte Fraktionen vereinigt und konzentriert.

**Tabelle 2** Durchführung der Reinigung von eIF4Am

<b>Reinigungsprotokoll für eIF4Am</b>			
Aufschlusspuffer: 100 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 2 mM $\beta$ -ME, Proteaseinhibitor			
Auftragspuffer: 100 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 2 mM $\beta$ -ME			
Anionenaustausch- chromatographie (AEX)	Sepharose Q (2 mL/min)	Auftrag: 100 mM NaCl Elution mit 200 mM NaCl	Stufengradient
Affinitäts- chromatographie (AC)	Sepharose blue (2 mL/min)	Auftrag: 200 mM NaCl eluiert bei 400 mM	30 mL Gradient auf 2,1 M NaCl
Konzentrieren	Vivaspin 20		auf unter 2 mL
Größenausschluss- chromatographie (SEC)	Sephadex 75 (S75) (1 mL/min)	eluiert bei 55 ml	SEC Puffer
Konzentrieren	Vivaspin 20		

**Reinigung von eIF4Am-GST Fusion**

Das eIF4Am-GST Fusionsprotein wurden durch GSH-Affinitätschromatographie gereinigt. Der Rohextrakt wurde auf eine selbstgepackte GSH-Sepharose Säule bei 0,3 mL/min appliziert. Diese Flussrate trägt der Kinetik der GSH GST Bindung Rechnung. Im nächsten Schritt konnte das Zielprotein durch pH korrigierten Puffer mit zusätzlich 20 mM reduziertem Glutathion (GSH) eluiert werden. Das Eluat wird mit einem Aliquot selbstgereinigter TEV Protease versetzt und ÜN gegen Auftragspuffer mit 100 mM NaCl dialysiert. Nach Reinigung über eine Anionenaustauschchromatographie (AEX) wurden ausgewählte Fraktionen konzentriert und auf einer Sephadex 75 Säule nach Größe getrennt. Wieder wurden ausgewählte Fraktionen vereinigt und konzentriert.

**Tabelle 3** Durchführung der Reinigung von eIF4Am-GST

<b>Reinigungsprotokoll für eIF4Am-GST</b>			
Aufschlusspuffer: 500 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 2 mM $\beta$ -ME, Proteaseinhibitor			
Auftragspuffer: 500 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 2 mM $\beta$ -ME			
AC	GSH-Sepharose	Auftrag bei 0,3 mL/min Elution mit 20 mM GST, 1 mL/min	Stufengradient
TEV-Spaltung		TEV selbstgereinigt	ÜN Dialyse gegen 2x 1 L Aufschlusspuffer mit 100 mM NaCl
AEX	Q-Sepharose (2 mL/min)	Auftrag mit 100 mM NaCl Elution bei 400 mM NaCl	30 mL Gradient auf 2 M NaCl
Konzentrieren	Vivaspin 20		auf unter 2 mL
SEC	S75 (1 mL/min)	eluiert bei 57 mL	SEC Puffer
Konzentrieren	Vivaspin 20		

### Reinigung von eIF4Bm

Die besten Ergebnisse für die Reinigung von eIF4Bm wurden mit 2 M Harnstoff im Puffer erzielt. Harnstoff verbessert das Laufverhalten in der SEC. Bereits durch die Heparin Säule wird ein ausreichender Reinigungseffekt erzielt um im zweiten Schritt eine SEC einzusetzen.

**Tabelle 4** Durchführung der Reinigung von eIF4Bm

<b>Vorläufiges Reinigungsprotokoll für eIF4Bm</b>			
Aufschlusspuffer: 200 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 2 mM $\beta$ -ME, Proteaseinhibitor			
Auftragspuffer: 2M Harnstoff, 200 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 2 mM $\beta$ -ME			
AC	Heparin (1,5 mL/min)	Auftrag 200 mM Elution bei 400 mM	80 mL Gradient auf 2 M NaCl
Konzentrieren	Vivaspin 20		auf unter 2 mL
SEC	S200 (1 mL/min)	eluiert bei 55 ml	SEC Puffer mit 2 M Harnstoff
Konzentrieren	Vivaspin 20		

### Reinigung von eIF4Ay und eIF4Gy(572-853)

Beide Konstrukte enthalten einen Thrombin spaltbaren His-tag. Die Reinigung erfolgt deshalb über immobilisiertes Metall Affinität Chromatographie (IMAC). Der Rohextrakt wurde mit 10 mM Imidazol versetzt und mit 2 mL/min auf eine selbstgepackte Ni<sup>2+</sup> IMAC-Säule (10 mL, selbstgepackt) aufgetragen. Nach Elution mit 500 mM Imidazol wurde der His-tag während einer ÜN Dialyse gegen Aufschlusspuffer gespalten und erneut über IMAC gereinigt. Der Durchlauf wurde konzentriert und abschließend mit einer S 75 gereinigt.

**Tabelle 5** Durchführung der Reinigung von eIF4Ay und eIF4Gy(572-853)

<b>Reinigungsprotokoll für eIF4Ay/Gy(572-853)</b>			
Aufschlusspuffer: 1000 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 2 mM $\beta$ -ME, Proteaseinhibitor			
Auftragspuffer: 500 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 2 mM $\beta$ -ME			
AC 1	Ni <sup>2+</sup> IMAC (2 mL/min)	Auftrag: 10 mM Imidazol Elution mit 500 mM Imidazol	Stufengradient
Thrombinspaltung	Dialyse	5 U Thrombin/mg Protein	ÜN Dialyse gegen 2x 1 L Aufschlusspuffer
AC 2	Ni <sup>2+</sup> IMAC (2 mL/min)	Auftrag: 10 mM Imidazol Elution: 500 mM Imidazol	Stufengradient
Konzentrieren	Vivaspin 20		auf unter 2 mL
SEC	S75 (1 mL/min)	eIF4Ay eluiert bei 59 ml, eIF4Gy(572-853) bei 61 ml	SEC Puffer
Konzentrieren	Vivaspin 20		

## 4. Polymerase Ketten Reaktion (PCR) basierte Methoden

Im Folgenden werden die Methoden beschrieben, die auf der Polymerase Ketten Reaktion beruhen.

### Klonierung

Das Zielgen wurde durch PCR mit Klonierprimern (Seite 115) vermehrt und anschließend gereinigt (PCR-purification KIT, Qiagen). Der 5' Klonierprimer trägt eine NcoI Schnittstelle, dessen Startcodon im Leseraster mit der ersten Aminosäure liegt. Im 3' Klonierprimer ist nach dem Stoppcodon eine XhoI Schnittstelle angefügt. Um die effiziente Erkennung der Restriktionsstellen zu gewährleisten wurden die Klonierprimer über die Restriktionssequenz hinaus um drei Basen verlängert. PCR Fragment und der Zielvektor werden mit NcoI und XhoI geschnitten (NEB2+BSA Puffer; 37°C; 2h). Der Zielvektor wird zusätzlich mit HindIII geschnitten und dephosphoryliert (SAP). Bei einer Umklonierung entfällt die Fragment PCR, dafür wurde der Ursprungsvektor zusätzlich mit SmaI gespalten (1h, 25°C). Die gespaltenen Fragmente wurden erneut gereinigt (Nukleotid removal KIT, Qiagen oder Ethanol-fällung) und im Verhältnis 1 zu 3 oder 1 zu 6 gemischt und mit T4 Ligase inkubiert (ÜN; 16°C). Der Ligationsansatz wurde anschließend per Hitze- oder Elektrotransformation in XL1 *blue* Zellen transformiert und auf Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum plattiert. Für die Klonierung von Maus Genen wurde Maus cDNA (First Choice<sup>®</sup> PCR-Ready Mouse Liver cDNA, Ambion) verwendet. Das Gen für eIF4Gm wurde ausgehend von einem volllängen cDNA Klon (IRAVp968F07127D) amplifiziert. Für die Klonierung von *Leishmania* Genen wurde eine Mischung entpersonalisierter DNA aus humanem Rückenmark von *Leishmania infantum* Patienten verwendet. Die Proben wurden freundlicherweise Prof. H.P. Beck (STI, Basel) zur Verfügung gestellt.

### Terminale Deletionen

Zur Konstruktion von terminalen Deletionen kann auf die zeitaufwendige Neuklonierung verzichtet werden. An der entsprechenden Stelle wird über gerichtete Mutagenese eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle eingefügt, die der 5' oder 3' Restriktionsschnittstelle entspricht. Vor der Transformation in XL1 *blue* Zellen wurde mit dem entsprechenden Enzym geschnitten. Dadurch wurde das entsprechende Fragment ausgeschnitten und es bleiben zwei kohäsive DNA Enden, die sich mit ausreichender Wahrscheinlichkeit wiederfinden und ein vollständiges Plasmid formen. Durch Kolonie PCR (Seite 37) des gesamten Gens können die positiven Klone schnell identifiziert werden.

## Gerichtete Mutagenese

Der gezielte Austausch von einzelnen Aminosäuren wurde nach dem *QuikChange*<sup>TM</sup>-Prinzip der Firma *Stratagene* durchgeführt. Dabei wird das gesamte Plasmid durch PCR vermehrt (25 x(20 s 95°C; 20 s T<sub>a</sub>; 13 min 72°C) 1U Pfu Polymerase; 0,2 mM dNTP Mix; 0,4 µM 3' und 5' Primer; 50 ng Template). Im Gegensatz zur klassischen Fragment PCR werden zu sich selbst komplementäre Primer verwendet, welche etwa mittig die gewünschte Mutation tragen. Dadurch wird sichergestellt, dass jedes PCR-Produkt die Mutation enthält. Template Plasmid wurde aus XL1 *blue* Zellen isoliert und ist deshalb methyliert. DpnI (NEB) spaltet deshalb selektiv die template DNA, da es nur methylierte DNA erkennt. Der Mutageneseansatz wird anschließend per Hitze- oder Elektrotransformation in XL1 *blue* Zellen transformiert und auf Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum plattiert.

## Kolonie PCR

Ein häufiges Phänomen bei der gerichteten Mutagenese sind Insertionen durch den Einbau von mehreren Primern. Die Erhöhung der Schmelztemperatur um Insertionen zu verhindern stößt schnell an ihre Grenzen, da mit höherer Schmelztemperatur gleichzeitig auch die Ausbeute der Reaktion abnimmt. Um mehrere Klone schnell und effizient auf Insertionen zu testen wird ein Fragment von 200-300 Basen um die Mutationsstelle amplifiziert und in einem 2% Agarosegel auf seine Größe untersucht. Als DNA Template werden Bakterien ohne vorherige Plasmidisolierung verwendet. Im Vergleich mit dem selben Fragment mit gereinigtem wildtypischem Plasmid als Template können Insertionen identifiziert werden.

Da im Fall der Kolonie PCR eine hohe Kopiergenauigkeit nicht nötig ist, wurden *GoTaq* Polymerase in *GoTaq Green* Puffer (Promega) und sehr niedrige Anlagerungstemperaturen (T<sub>a</sub>) gewählt. Der PCR Zyklus (20 s 95°C; 20 s T<sub>a</sub>=52°C; 20 s 68°C) wurde 25 Mal durchgeführt.

Von einem positiven Klon aus der Kolonie PCR wurde die Plasmid DNA gereinigt und nach Sequenzierung der Mutagenesestelle (Microsynth) eine Glycerinkultur (150 µL Glycerin; 850 µL ÜN Kultur) zur Langzeitlagerung bei -80°C abgelegt.

## Plasmid Extraktion aus Bakterien

Die präparative Plasmidisolierung zur Lagerung oder Sequenzierung erfolgte mit dem Plasmid MiniPrep Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Für analytische Zwecke, z.B. zur schnellen Untersuchung vieler Plasmide aus Klonierungen, wurde die komplette DNA aus den Bakterien isoliert. Dazu wurden jeweils 300 µL einer ÜN-Bakterienkultur mit demselben Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) sorgfältig gevortext. Durch Zentrifugation (30 s; 16 000 g) wird die wässrige Phase von der organischen Phase getrennt. Die obere wässrige Phase wird anschließend drei Mal mit Chloroform extrahiert um Phenolreste aus der wässrigen Phase zu entfernen. Alternativ zur Phenolextraktion wurden die Zellen durch die Puffer des Qiagen MiniPrep Kit aufgeschlossen und die Proteine gefällt. Anschließend wurde die wässrige Phase 1:1 mit Isopropanol versetzt und die DNA bei -20°C für mindestens 1 h gefällt. Nach dem die Nukleinsäuren pelletiert wurden (30 min; 16 000 g), wird der Überstand verworfen und das Pellet mit 100 µL eiskaltem 70% Ethanol gewaschen. Nach kurzem Trocknen bei RT wird das Pellet in 50 µL Wasser aufgenommen. Im Gegensatz zur Reinigung von Plasmiden mit Plasmid MiniPrep Kit reinigt diese Methode aber auch Fragmente genomischer DNA. Dies ist bei der Auswertung der Restriktionsspaltungsmuster zu beachten.

## *in vitro* Transkription (IVT)

Die Produktion großer RNA Fragmente erfolgte *in vitro* durch *run off* Transkription (4 h; 37°C; 900 µl; 80 mM Tris/HCl pH 7,5; 22 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM Spermidin; 5 mM DTT; 0,12 mg/ml BSA; 16 U TIPP; 20 mM NTP-mix; 4 µg DNA Templat und ca. 5 U selbstgereinigte T7 RNA Polymerase). Das Templat wurde in einer PCR Reaktion hergestellt und durch Ethanol fällung (2 h; -20°C; 300 mM NaOAc; 30% EtOH) gereinigt. Die IVT wurde mit 50 mM EDTA gestoppt und die Produkte erneut mit Ethanol gefällt. Die pelletierte RNA (20 min; 4°C; 13000 rpm) wurde in RNA-Laufpuffer (95% Formamid; 20 mM EDTA; 0,025% SDS; BB; XC) aufgenommen und durch denaturierende PAGE getrennt (12% (Bis)Acrylamid; 8M Harnstoff; Vorlauf 20 min; Lauf 60 min; 25W). Unter UV Licht wurden die RNA Banden identifiziert und ausgeschnitten. Aus den Gelstücken wurde die RNA durch Elektroelution isoliert und anschließend bei -20°C gelagert.

## 5. Enzymcharakterisierung

### ATP Hydrolyse im Fließgleichgewicht

Die Geschwindigkeit der ATP Hydrolyse wurde im Flussgleichgewicht nach dem gekoppelten optischen Test von Otto Warburg durchgeführt. Dabei ist die Hydrolyse von ATP über Pyruvatkinase (PK) und Lactatdehydrogenase (LDH) an die Oxidation von einem Äquivalent NADH gekoppelt. Diese ist anhand der charakteristischen Absorptionsabnahme bei 340 nm leicht spektroskopisch zu verfolgen und mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetz (Gleichung 3) direkt quantifizierbar. Alle Messungen wurden bei 37°C in einem Ultrospec 2100 pro UV/VIS Spektrophotometer (*Amersham Biosciences*) in acht 80 µL Quarzküvetten (Hellma) durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen waren gleichbleibend 400 µM Phosphoenolpyruvat (PEP), 200 µM reduziertes Nikotinamiddinukleotid (NADH), 23 µg/mL PK und 13 µg/mL LDH. Es kamen Puffer A und Puffer B zum Einsatz (Seite 29, [41]). Die Mischung der Reaktionsansätze erfolgte so weit wie möglich in einer gemeinsamen Stammlösung. Enzyme wurden unmittelbar vor dem Versuch verdünnt und die Konzentration durch Absorptionsspektroskopie (Seite 32) bestimmt. Je nach Fragestellung wurde die RNA-, ATP- oder Proteinkonzentration variiert.

Der Verlauf der Auftragung der Geschwindigkeit der ATP Hydrolyse ( $v$ ) gegen die Substratkonzentration ( $[S]$ ) wurde nach Michaelis Menten (Gleichung 4) beschrieben.  $v_0$  und  $v_{\max}$  beschreiben die Geschwindigkeit der ATP Hydrolyse ohne bzw. bei Sättigung mit Substrat. Die Michaelis Menten Konstante  $K_M$  ist die Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Geschwindigkeit  $\frac{1}{2} v_{\max}$  erreicht wird. Um die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Enzymkonzentrationen zu ermöglichen, wurde die Umsatzzahl  $k_{\text{cat}}$  als Quotient aus der maximalen Geschwindigkeit und der Enzymkonzentration ( $[E]$ ) eingeführt (Gleichung 5).

$$v = v_0 + v_{\max} \frac{[s]}{[s] + K_M} \quad (4)$$

$$k_{\text{cat}} = \frac{v_{\max}}{[E]} \quad (5)$$

## RNA Entwindungstests

Der Entwindungstest basiert auf der Arbeit von Rogers *et al.* [72]. Getestet wird die Entwindung eines 50mer/10mer RNA Duplex (siehe Anhang) der berechneten Stabilität von 67,3 kJ/mol [94]. Auf das 3' Ende der 10mer RNA wurde in einer Polynukleotidkinase (PNK) katalysierten Reaktion radioaktives Phosphat<sup>32</sup> übertragen. Nach der Inaktivierung der PNK wurde überschüssiges ATP $\gamma$ P<sup>32</sup> mit einer Größenausschluss Spin Säule entfernt. Um freies markiertes 10mer zu vermeiden, wurde ein 10%iger Überschuss an 50mer zur Bildung des Duplex eingesetzt. Die Anlagerung erfolgt während langsamen Abkühlens von 80°C auf 4°C. Anschließend wurde der RNA Duplex auf 25 nM verdünnt (10x Stammlösung), um Wiederanlagerung nach erfolgter Entwindung kinetisch zu hindern. Dadurch kann auf den Einsatz eines trap Stranges verzichtet werden.

**Tabelle 6** Durchführung des RNA Entwindungstest

Puffer/Bedingungen: 10 $\mu$ L (1x PNK-Puffer, 1 $\mu$ M 10mer RNA)			
P <sup>32</sup> Markierung	37°C	30 min	+ 10 U PNK (NEB), + 10 $\mu$ Ci ATP $\gamma$ P <sup>32</sup> (3000 mCi/mmol, Hartmann Analytic)
Inaktivierung	65°C	20 min	
Reinigung	1000 g	2 min	ad 30 $\mu$ L 80 mM HEPES pH 7, 100 mM KCl MicroSpin G-25 ( <i>GE-Healthcare</i> )
Hybridisierung	von 80 auf 4°C	1,5 h	ad 50 $\mu$ L 80 mM HEPES pH 7, 100 mM KCl, + 1,1 $\mu$ M 50mer RNA
Verdünnung	4°C		ad 400 $\mu$ L HB-Puffer, Endkonzentration 25 nM, Lagerung bei -20°C

Die Entwindung erfolgt bei 25°C in Testpuffer. Der Start der Reaktion erfolgt durch Enzymzugabe. Gestoppt wurde durch Einstellung der Konzentration auf 10% Glycerin, 0,4% SDS, 4 mM EDTA (evtl. 0,1 mg/ml Proteinase K). Die Trennung von Doppel- und Einzelstrang erfolgt auf einem 12-20% nativen PAGE (4°C; 15 V/cm; 0,5x TBE; Vorlauf 1 h; Lauf 2,5 h). Nach Inkubation des Gels von bis zu 24 h auf einem *phosphor storage screen* (Molecular Dynamics) wurden die Signale an einem Storm 820 *phospho imager* (*GE Healthcare*) ausgelesen und mit der Software *image quant* ausgewertet.

## Hydroxapatit-Chromatographie

Das Trennprinzip von Hydroxapatit ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ )<sub>2</sub> beruht sowohl auf ionischen Wechselwirkungen zwischen Nukleinsäure und Hydroxapatit als auch auf spezifischen Wechselwirkungen. ds Nukleinsäuren binden stärker an Hydroxapatit, da die Phosphatgruppen regelmäßiger angeordnet sind. ss Nukleinsäuren hingegen wechselwirken nur schwach mit dem Säulenmaterial, da die Phosphatgruppen des Nukleinsäurerückgrats relativ ungeordnet vorliegen [95].

Hydroxapatit ist teilweise wasserlöslich. Von der Verwendung von reinem Wasser oder Tris Puffern wird deshalb abgeraten. In jedem Puffer (auch im EtOH Lagerpuffer) ist deshalb mindestens 5 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6,9) enthalten.

Die Hydroxapatitsäule (5 ml; Econo-Pac® CHT-II Ceramic Hydroxyapatite, BioRad) wurde an einen ÄKTApurifier (GE Healthcare) in 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6,9) equilibriert. Der Probenauftrag erfolgte automatisch (0,2 mL/min) aus einer 10 µL Auftragsschleife, die zuvor mit 30 µL Probe komplett gefüllt wurde. Während eines 15 mL Gradienten (1 mL/min) wurde die Natriumphosphatpuffer Konzentration auf 500 mM erhöht. Die Detektion der Absorption erfolgte bei 260 nm. Zur Auswertung wurden die Absorptionswerte um das Signal ohne Nukleinsäuren im Puffer korrigiert und die Flächen mit der Gerätesoftware (*Unicorn*) ermittelt.

## *in vivo* Helikase Aktivitäts Test

Die Tests zur Entwicklung eines *in vivo* Helikase Aktivitätstest mit RNA Thermometern wurden in Zusammenarbeit mit Prof. F. Narberhaus von Dr. B. Klinkert (Ruhr-Universität Bochum) durchgeführt. Als Reportergen wurde  $\beta$ -Galaktosidase unter der negativen Kontrolle eines RNA Thermometers verwendet. Der Einfluss von eIF4A auf das RNA Thermometer kann deshalb anhand der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität verfolgt werden.

## 6. Biophysikalische Methoden

### Circulardichroismus (CD) Spektroskopie

Um den Einfluss von Mutationen auf die globale Struktur von Proteinen zu untersuchen wurden nah UV Circulardichroismus (CD) Spektren (200-260 nm) der Proteine aufgenommen ( $c=0,5 \mu\text{M}$  Protein; 20 mM Tris/HCl pH 7,5; 80 mM KCl). Die Messungen erfolgten an einem *ChiraScan* CD Spektrometer (Schichtdicke  $d=0,2$  cm, Integrationszeit 10 s/Punkt, Anregungs- und Emissionsbandbreiten 2/2 nm, Applied Photophysics). Der Vergleich der Messwerte erfolgt als mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure ( $\theta_{MRE}$ )

$$\theta_{MRE} = \frac{100 \theta}{c d N} \quad (6)$$

Dabei ist N die Anzahl der Reste, d die Schichtdicke in cm, c die Konzentration in mM und  $\theta$  die gemessene Elliptizität in mGrad.

### Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) ermöglicht die komplette thermodynamische Charakterisierung von Molekülwechselwirkungen durch die Messung der mit ihr verbundenen Wärmeentwicklung. Die Modifizierung durch Reportergruppen ist nicht notwendig. Eine ITC-Apparatur besteht aus zwei identischen Zellen (Referenz und Probenzelle), die von einem Wärmebad umgeben sind. Durch eine Heizspirale werden beiden Zellen temperiert. Im Laufe eines Experiments wird die der Heizspirale so variiert, dass die Reaktionswärme kompensiert wird und beide Zellen bei gleicher Temperatur bleiben. Die Integration der Änderung der Heizleistung während der Reaktion liefert die Reaktionswärme. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante  $K_D$  wurde die Wärmeentwicklung bei der wiederholten Injektion konstanter Mengen des Wechselwirkungspartners gemessen und gegen das Mengenverhältnis aufgetragen. Dazu muss die Reaktionswärme pro Injektion hinreichend groß sein und die Konzentration der Wechselwirkungspartner in der Nähe der erwarteten Dissoziationskonstante  $K_D$  liegen. Dieser Zusammenhang wird durch den Wiseman Parameter c beschrieben [96].

$$c = \frac{n[M]}{K_D} \quad (7)$$

Nach Möglichkeit sollte die Konzentration der Bindungsstellen ( $n[M]$ ) in der Zelle so gewählt werden, dass  $c$  zwischen 1 und 500 liegt. Für die Konzentration der Stammlösung des Wechselwirkungspartners wird die siebenfache Konzentration vorgeschlagen. Für hohe Dissoziationskonstanten führt dies schnell zu unerreichbaren Substratkonzentrationen  $[M]$ . Existiert allerdings ein fester Bindungspartner mit niedriger Dissoziationskonstante ( $K_D^{\text{fest}}$ ), kann die Dissoziationskonstante des schwachen Bindungspartners ( $K_D^{\text{schwach}}$ ) durch kompetitive Titration bestimmt werden (Gleichung 8, [97]). Dazu wird die Bindung des festen Bindungspartners in Gegenwart des schwachen Bindungspartners bestimmt ( $K_{\text{app}}$ ). Die Konzentration des schwachen Bindungspartners ( $[M]^{\text{schwach}}$ ) wird in der Größenordnung der erwarteten Dissoziationskonstante ( $K_D^{\text{schwach}}$ ) gewählt.

$$K_D^{\text{schwach}} = \frac{[M]^{\text{schwach}}}{\frac{K_{\text{app}}}{K_D^{\text{fest}}}-1} \quad (8)$$

Alle Messungen wurden an einem VP-ITC der Firma MicroCal durchgeführt ( $V_{\text{Messzelle}}$  1,437 mL,  $V_{\text{Spritze}}$  193  $\mu\text{L}$ ). Die Reaktanden wurden mit 5 mL Größenausschlusschromatographie Säulen (NAP-5, *GE Healthcare*) in identischen Puffer überführt (20 mM Tris/HCl pH 7,5; 80 mM KCl; evtl. 15 mM  $\text{MgCl}_2$ ). Um den Verdünnungseffekt durch den Pufferaustausch minimal zu halten wurde in 100  $\mu\text{L}$  Fraktionen eluiert. Die Fraktionen mit den höchsten Konzentrationen wurden vereinigt, bis das benötigte Volumen erreicht wurde. Die Konzentration der Reaktanden wurde unmittelbar vor dem Start der Titration absorptionspektroskopisch bestimmt (Seite 32). Für die Titration von eIF4Ay mit eIF4Gy(572-853) betragen die Konzentrationen etwa 20 und 300  $\mu\text{M}$ . Für die Titration von Protein mit Nukleotiden wurde der Puffer mit zusätzlich 15 mM  $\text{MgCl}_2$  versetzt. Die Proteinkonzentration betrug etwa 20  $\mu\text{M}$ . Die ADP Stammlösung hatte eine Konzentration von 2.38 mM. Für die kompetitive Titration kamen 4,52 mM ADPNP zum Einsatz. Die Temperatur betrug 15°C und das Injektionsvolumen 10  $\mu\text{L}$ /Schritt. Die Rührgeschwindigkeit betrug 305  $\text{min}^{-1}$  und die Referenzleistung 17  $\mu\text{cal/s}$ . Für die Bestimmung der Nukleotidaffinität wurden die Rohdaten um den Hintergrund aus der Titration von ADP mit Puffer korrigiert. Die Auswertung erfolgt mit Origin für MicroCal ITC durch ein Bindungsmodell mit einer Bindungsstelle.

## Intrinsische Protein Fluoreszenz

Die Fluoreszenz von Proteinen wird hauptsächlich durch Tryptophan verursacht. Die Tryptophan Fluoreszenz ist sehr sensibel gegenüber Pufferbedingungen und kann deshalb als Sonde für die lokale Proteinumgebung bzw. die Bindung von eIF4Ay an eIF4Gy(572-853) verwendet werden. Die Anregung erfolgte bei 295 nm und die Detektion bei 350 nm (Anregungs- und Emissionsbandbreiten 1/5 nm). 2,2  $\mu$ M eIF4Gy(572-853) wurden in einem Volumen von 130  $\mu$ l (100 mM NaCl; 20 mM Tris/HCl pH 7,5) vorgelegt und die Konzentration an eIF4A schrittweise erhöht. Mischen erfolgte entweder manuell durch auf und ab Pipettieren oder automatisch durch die Rührvorrichtung am Fluorimeter (Stufe 2). Nach dem Mischen wurde die Lösung für 1 min inkubiert und anschließend die Fluoreszenzintensität während 20 s aufgezeichnet.

Die Zugabe von Kollisionsquenchern in den Puffer verstärkt den Signalunterschied zwischen lösungsmittlexponierten und im Protein verborgenen Tryptophanen, da Tryptophane im Protein nichtmehr mit dem Quencher kollidieren können. Zu diesem Zweck wurden einige Messungen in Gegenwart von 450 mM NaI durchgeführt. Die Auswertung erfolgt analog zur Auswertung der Bindung von mantADP.

## Nukleotidbindung von mantADP

Die Quantenausbeute des fluoreszierenden ADP Analogon 2'-Methylantraniloyl-ADP (mantADP [98]; ( $\lambda_{ex}$  360 nm;  $\lambda_{em}$  440 nm) erhöht sich in hydrophober Umgebung. Deshalb kann die Bindung von mantADP an Proteine direkt anhand der Fluoreszenzintensitätszunahme verfolgt werden. Durch die Verdrängung von mantADP aus der Nukleotidbindungsstelle und die damit verbundene Abnahme der Fluoreszenzintensität kann indirekt auch die Bindung nicht fluoreszierender Nukleotide verfolgt werden.

Alle Ensemble Messungen wurden an einem FluoroMax 3 (Horiba Jobin Yvon) durchgeführt. Die mantADP Konzentration in Puffer A und der Proteinstammlösung wurden auf 1  $\mu$ M eingestellt. Für die Titration mit eIF4Gy(572-853) wurde es mit G25 Spin Säulen in Puffer A überführt (Seite 31), und gemeinsam mit mantADP im Puffer vorgelegt. Danach wurde schrittweise die eIF4Ay Konzentration erhöht. Für jeden Messpunkt wurde nach Protein Zugabe kurz gemischt, 1 min inkubiert und anschließend die Fluoreszenz während einer Minute detektiert ( $\lambda_{ex}$  360 nm;  $\lambda_{em}$  440 nm; Anregungs- und Emissionsandbreite 2/2 nm).

Anhand der Signaländerung durch die Bindung von mantADP an eIF4Ay kann die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) ermittelt werden. Der Auswertung liegt ein einfaches Bindungsmodell mit einer Bindungsstelle und einer 1:1 Stöchiometrie zugrunde (Gleichung 9).



$$K_D = \frac{[A][B]}{[AB]} \quad (10)$$

[A], [B] und [AB] entsprechen den Gleichgewichtskonzentration der Wechselwirkungspartner. Durch Anwenden des Massenwirkungsgesetzes wird die Dissoziationskonstante  $K_D$  definiert (Gleichung 10). Einsetzen der Massenerhaltung für A (Gleichung 11) und analog für B in Gleichung 10 führt zur Formel für die Komplexkonzentration im Gleichgewicht [AB] (Gleichung 12).

$$[A]_0 = [A] + [AB] \quad (11)$$

$$[AB] = \frac{K_D + [A]_0 + [B]_0}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{K_D + [A]_0 + [B]_0}{2}\right)^2 - [A]_0[B]_0} \quad (12)$$

Da die Signaländerung proportional zum Anteil des Komplexes ist, kann das Messsignal (F) als die Summe aus dem Signal ohne Partner ( $F_0$ ) und der maximalen Signaländerung in Sättigung ( $\Delta F_{\max}$ ) moduliert durch den Anteil der signalgebenden Komponente im Komplex  $\left(\frac{[AB]}{[B]_0}\right)$  beschrieben werden (Gleichung 13)

$$F = F_0 + \Delta F_{\max} \frac{[AB]}{[B]_0} \quad (13)$$

Die Parameter von Gleichung 13 wurden mit Origin 7.5 bestmöglich an die Messwerte angepasst. Zur Auswertung der Verdrängungstitration wurde ein kompetitives Bindungsmodell verwendet [99]. Dabei wurde wie oben beschrieben Massenwirkung und Massenerhaltung (Gleichungen 10 und 11) für alle drei beteiligten Bindungspartner aufgestellt. Die Verknüpfung der Komplexkonzentrationen mit dem Messsignal erfolgt über Gleichung 14.

$$F = a_1[AB] + a_2[B] \quad (14)$$

Die Koeffizienten ( $a_1$  und  $a_2$ ) berücksichtigen die unterschiedliche Signalintensität von gebundenem und freiem mantADP. Die Parameter dieser Gleichungen wurden durch das Programm *Scientist for Windows* (Version 3, MicroMath) numerisch bestmöglich an die Messwerte angepasst.

## Messung schneller Kinetiken

Die Dissoziationskonstante  $K_D$  ist eine thermodynamische Größe und beschreibt einen Zustand im Fließgleichgewicht. Die Bestimmung ist daher auch kinetisch über die Assoziations- und Dissoziationsrate ( $k_{on}$  und  $k_{off}$ ) möglich.

$$K_D = \frac{[A][B]}{[AB]} = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad (15)$$

Die Kinetik der Bindung von mantADP und eIF4Ay wurden mit einer MilliFlow™ *Stopped Flow* (SLM Aminco) und freundlicher Unterstützung von Dr. F. Müller und E. Kuszniir (Roche, Basel) gemessen. Wie bei der Untersuchung im Gleichgewicht wurde die Fluoreszenzemissionsänderung bei 440 nm verfolgt ( $\lambda_{ex}$  360 nm, Anregungs- und Emissionsbandbreiten 4/4 nm). Für die Bestimmung der Assoziationsrate  $k_{on}$  wurden 60  $\mu$ M eIF4A und 2  $\mu$ M mantADP gemischt (Puffer A; 300 ms; 15 Messpunkte; 18,4 ms Integrationszeit). Die Dissoziationsrate  $k_{off}$  von mantADP wurde durch die Verdrängung mit einem großen Überschuss ADP (mind. 3 mM) aus einem vorgeformten Protein-mantADP-Komplex (80  $\mu$ M eIF4A und 4  $\mu$ M mantADP, ggf. 88  $\mu$ M eIF4G) ermittelt (Puffer A; 300 ms; 150 Messpunkte; 1,4 ms Integrationszeit). Für jedes Experiment wurden sechs bis zehn Messungen kumuliert und gemittelt. Die Auswertung erfolgte mit Origin 8. Alle angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die Konzentrationen in der Spritze. Die Mischung der Komponenten erfolgte im Verhältnis 1:1. Die Konzentration in der Messkammer betrug folglich die Hälfte.

Bildung und Dissoziation von Nukleotiden sind dynamische Prozesse, die ständig und zeitgleich statt finden. Die sprunghafte Erhöhung der ADP Konzentrationen ermöglichte die selektive Detektion der Dissoziation von mantADP, da aufgrund des großen ADP Überschuss ausschließlich ADP (re)assoziierte, die Assoziation von ADP aber keine Signaländerung verursachte. Im Gegensatz dazu würde die Kinetik nach Mischen mit Puffer (ohne ADP) sowohl durch  $k_{on}$  als auch durch  $k_{off}$  beeinflusst. Zur Auswertung wurden der Signalverlauf (F) durch eine Exponentialfunktion (Gleichung 16) mit der Ratenkonstante ( $k$ ) beschrieben.

$$F = F_0 + Ae^{-kt} \quad (16)$$

## Fluoreszenzanisotropie Titrationsen

Die Anregung eines Fluorophors erfolgt, indem der E-Feldvektor des Anregungslichts mit dem Übergangsdipol eines Fluorophors wechselwirkt. Aus dem Vektorcharakter dieser beiden Größen ergibt sich eine Orientierungsabhängigkeit der Wechselwirkung. Sind E-Feldvektor und Übergangsdipol parallel, erfolgt die Anregung mit maximaler Effizienz (selektive Anregung). Analog zur Anregung erfolgt die Emission parallel zum Übergangsdipol. Bewegt sich ein Fluorophor (und damit sein Übergangsdipol) zwischen der Anregung mit polarisiertem Licht und der Emission, ändert sich die Polarisationsrichtung zwischen anregendem und emittiertem Photon. Die Änderung der Polarisation ist deshalb ein Maß für die Beweglichkeit der Moleküle. Die Bewegung eines Fluorophors setzt sich aus der lokalen Beweglichkeit und der Bewegung des gesamten Komplexes, mit dem es in Kontakt steht, zusammen. Während die lokale Beweglichkeit eines Fluorophors unverändert bleibt, skaliert die Rotationsgeschwindigkeit der Moleküle mit ihrer Größe. Deshalb können anhand der Anisotropie Änderungen der Komplexgröße verfolgt werden.

Dazu wird die Fluoreszenzemission bei parallelen und vertikalen Polarisatoren in Anregung und Emissionsstrahlengang gemessen und die Anisotropie  $r$  bestimmt.

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (17)$$

## Förster Resonanz Energie Transfer (FRET)

Überlappt das Emissionsspektrum eines (Donor-)Fluoreszenzfarbstoffes mit dem Absorptionsspektrum eines anderen (Akzeptor-)Fluorophors, kann es zum strahlungsfreien Energietransfer der Anregungsenergie des Donor zum Akzeptor kommen (FRET). Der Energietransfer erfolgt über die Wechselwirkung der Übergangsdipole. Wegen der kurzen Reichweite der Dipolfelder ist die Übertragungseffizienz ( $E_{\text{FRET}}$ ) sehr stark vom Abstand der Farbstoffe abhängig (Gleichung 1). Der Abstand, bei dem die Hälfte der Anregungsenergie vom Donor auf den Akzeptor übertragen wird ( $E = 0,5$ ), wird als Försterradius  $R_0$  bezeichnet. Er charakterisiert das FRET-Verhalten eines Donor-/Akzeptorpaars.

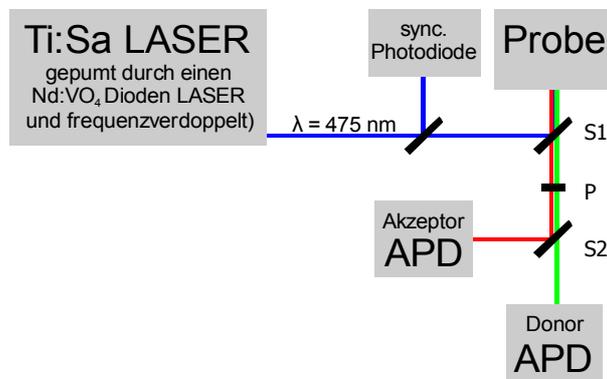
## Ensemble FRET Titration

Zur Bestimmung der Wechselwirkung zwischen eIF4Ay und eIF4Gy(572-853) wurden die FRET Paare eIF4Ay G370C A546/eIF4Gy(572-853) W638C A488 und eIF4Ay Q186C A546/eIF4Gy I841C A488 bei 15, 25 und 37°C in Puffer A untersucht. eIF4Gy(572-853) wurde vorgelegt und mit steigenden Konzentrationen eIF4Ay versetzt. Von jedem Titrationsschritt nach Inkubation von 1 min ein Emissionsspektrum ( $\lambda_{\text{ex}}$  450 nm;  $\lambda_{\text{em}}$  500-600 nm; Anregungs- und Emissionsbandbreiten 1/2 nm) aufgenommen. Die Reversibilität wurde durch schrittweise Erhöhung der NaCl Konzentration auf 2,2 M überprüft.

## Einzelmolekül (sm)FRET Messung

smFRET Messungen wurden in 200  $\mu\text{l}$  in einer *Lab-Tek* Küvette (Nalge Nunc International, USA) bei einer (Donor)Konzentration von 50 pM durchgeführt. Zum Einstellen hoher RNA oder Nukleotid Konzentrationen wurde das Messvolumen auf 20  $\mu\text{L}$  reduziert. Jede Messkammer wurde mit einer BSA Lösung (0,1 mg/mL in entsprechendem Puffer, 30 min) gesättigt. Um fluoreszierende Verunreinigungen aus den Einzelmoleküllösungen zu entfernen, wurden alle Lösungen mit Aktivkohle behandelt und steril filtriert.

Zur Detektion von einzelnen Molekülen wurde ein selbstgebautes konfokales Fluoreszenzmikroskop verwendet (Abbildung 9). Das frequenzverdoppelte Licht eines auf 950 nm gestimmten modengekoppelten Titan:Saphir Festkörperlaser (Tsunami, Spectra Physics, USA) wird über einen Strahlteiler von unten in ein Mikroskop (DM505, Olympus) eingespeist und durch ein Wasserimmersionsobjektiv (UPlanApo, Olympus) in das Probenvolumen fokussiert. Die numerische Apertur des Objektiv beträgt 1,2. Das Probenvolumen kann dabei mit einer CCD-Kamera verfolgt werden. Fluoreszenzlicht aus dem Probenvolumen wird über das gleiche Objektiv kollimiert und durch den Strahlteiler transmittiert (Abbildung 9). Durch die Fokussierung auf eine 100  $\mu\text{m}$  Lochblende wird die Detektion auf Photonen aus der Anregungsebene beschränkt (Abbildung 7). Licht außerhalb der Fokusebene wird effektiv eliminiert. Anschließend wird der Strahl durch einen weiteren dichroitischen Spiegel in Donor- und Akzeptorkanal (DK und AK) geteilt und jeweils separat durch eine *Avalanche Photo Diode* (APD) detektiert (Abbildung 9). Aus den Zählraten im Donor- und Akzeptorkanal kann so die Transfereffizienz ermittelt werden (Gleichung 25).



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung des smFRET Aufbau. Das frequenzverdoppelte Licht eines modengekoppelten Ti:Sa LASERS wird über einen dichroitischen Strahlteiler (S1) von unten in ein Mikroskop eingespeist und durch ein Wasserimmersionsobjektiv mit hoher numerischer Apertur (UPlanApo; NA 1,2; Olympus) in die Probe fokussiert. Das Fluoreszenzlicht wird durch dasselbe Objektiv kollimiert und durch den Strahlteiler (S1) transmittiert. Die Fokussierung auf eine 100  $\mu$ M Lochblende (P) entfernt Licht außerhalb der Detektionsebene. Ein weiterer dichroitischer Strahlteiler (S2) trennt Donor und Akzeptorsignal. Die Detektion erfolgt an separaten APDs. Um die Signale relativ zum Anregungspuls zu detektieren, wird ein Teil des Anregungslichts auf eine Photodiode ausgekoppelt. Linsen und Filter sind in diesem Schema nicht gezeigt.

## Korrekturparameter für smFRET Messungen

Im Idealfall wird im smFRET Aufbau (Abbildung 9) ausschließlich der Donor Farbstoff angeregt, ein Photon des Donorfarbstoffs nur im Donorkanal und Photonen des Akzeptorfarbstoffs nur im Akzeptorkanal detektiert. Tatsächlich kommt es aber auch zu direkter Anregung des Akzeptorfarbstoffs und Kreuzdetektion von Donor Photonen im Akzeptorkanal und umgekehrt. Diese Effekte werden anhand von Korrekturparametern für die Auswertung berücksichtigt. Da wie oben erwähnt die lokale Umgebung einen deutlichen Einfluss auf die Photophysik eines Farbstoffes haben kann wurden die Korrekturparameter für jede Cystein Doppelmutante separat bestimmt.

### Direkte Anregung des Akzeptorfarbstoffs ( $\delta$ )

Die direkte Anregung  $\delta$  beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der der Akzeptorfarbstoff direkt anstatt durch Energietransfer angeregt wird und entspricht dem Verhältnis der Absorptionskoeffizienten zwischen Donor und Akzeptorfarbstoff bei der Anregungswellenlänge.  $\delta$  wurde direkt aus den Absorptionsspektren der markierten Proteine berechnet. Für keine der in dieser Arbeit verwendeten FRET Konstrukte wurde eine signifikante Änderung des Absorptionsspektrums im Vergleich zu freiem Farbstoff festgestellt und  $\delta$  dementsprechend anhand des freien Farbstoffs bestimmt.

$$\delta = \frac{\epsilon_{\text{Akzeptor}}}{\epsilon_{\text{Donor}}} (= 0,16) \quad (18)$$

### Kreuzdetektion in Donor und Akzeptorkanal ( $\alpha$ und $\beta$ )

Sobald die Emissionsspektren von Donor und Akzeptor überlappen (Abbildung 6) wird eine vollständige Trennung von Donor und Akzeptorfluoreszenz durch einen dichromatischen Strahlteiler unmöglich. Ein Teil der Donorsignale wird deshalb im Akzeptorkanal (Donor Kreuzdetektion) und ein Teil der Akzeptorsignale fälschlicherweise im Donorkanal (Akzeptor Kreuzdetektion) detektiert. Diese Effekte werden durch die Korrekturparameter  $\alpha$  und  $\beta$  berücksichtigt.

Zur Bestimmung der **Donorkreuzdetektion**  $\alpha$  werden die Zählraten in Donor- und Akzeptorkanal ( $I_{DK}$  und  $I_{AK}$ ) für Puffer und 100 nM Donor markiertes Protein bestimmt. Die Zählraten mit Protein werden um die Pufferzählraten korrigiert und der Quotient gebildet (Gleichung 19).

$$\alpha = \frac{I_{AK}^{\text{Donor}} - I_{AK}^{\text{Puffer}}}{I_{DK}^{\text{Donor}} - I_{DK}^{\text{Puffer}}} \quad (19)$$

Die Bestimmung der **Akzeptorkreuzdetektion**  $\beta$  erfolgt analog mit Akzeptor markiertem Protein (Gleichung 20).

$$\beta = \frac{I_{DK}^{\text{Akzeptor}} - I_{DK}^{\text{Puffer}}}{I_{AK}^{\text{Akzeptor}} - I_{AK}^{\text{Puffer}}} \quad (20)$$

### Detektionseffizienz $\gamma$

Der **Korrekturparameter**  $\gamma$  berücksichtigt nicht detektierbare Verluste von Anregungsenergie beider Fluorophore. Dies beinhaltet sowohl die unterschiedlichen Quantenausbeuten als auch die geräteabhängige Detektionseffizienzen für Donor und Akzeptor. Ein direkter Zugang zu  $\gamma$  mit den bereits ermittelten Zählraten und der direkten Anregung ( $\delta$ ) ist durch Gleichung 21 möglich.

$$\gamma = \frac{I_{AK}^{\text{Akzeptor}} - I_{AK}^{\text{Puffer}}}{(I_{DK}^{\text{Donor}} - I_{DK}^{\text{Puffer}})\delta} \quad (21)$$

### Korrigierte FRET Effizienz

Unter Anwendung der direkten Anregung ergaben sich die effektiven Korrekturparameter.

$$\alpha' = \frac{\alpha + \gamma\delta}{1 + \beta\gamma\delta} \quad (22)$$

$$\beta' = \beta \quad (23)$$

$$\gamma' = \frac{\gamma + \gamma\delta}{1 + \beta\gamma\delta} \quad (24)$$

Unter Berücksichtigung der effektiven Donor- und Akzeptorkreuzdetektion ( $\alpha'$  und  $\beta'$ ) sowie der effektiven Detektionseffizienz ( $\gamma'$ ) kann die FRET Energietransfereffizienz aus den Donor und Akzeptorzählraten berechnet werden (Gleichung 25)

$$E_{\text{FRET}} = \left(1 + \gamma' \frac{I_D - \beta' I_A}{I_A - \alpha' I_D}\right)^{-1} \quad (25)$$

## Bestimmung des Försterradius ( $R_0$ )

Wie die Korrekturparameter können sich auch die **Försterradien ( $R_0$ )** für verschiedene FRET Mutanten variieren und müssen separat bestimmt werden.

$$R_0 = \sqrt[6]{\frac{9000 \ln(10)}{128\pi^5 N} \Phi^{\text{Donor}} \kappa^2 n^{-4} J} \quad (26)$$

Dazu wurden das Überlappintegral zwischen Donoremission und Akzeptorabsorption ( $J$ ) und die Quantenausbeute des Donors ( $\Phi_D$ ) experimentell bestimmt. Aufgrund des Linkers zwischen Protein und Farbstoff (Abbildung 6) gilt es als gesicherte Annahme, dass die Farbstoffe hinreichend flexibel sind um als ungehindert und isotrop beweglich beschrieben zu werden [100]. Darüberhinaus wurde ausreichende Beweglichkeit für alle in der Arbeitsgruppe Klostermeier experimentell überprüften Konstrukte nachgewiesen [31, 101], sodass  $\kappa^2$  durch 2/3 beschrieben wurde. Große Teile der Übergangsdipolfelder erstrecken sich in Puffer, weshalb der Brechungsindex ( $n$ ) als der von Wasser ( $n=1,33$ ) angenommen wurde.

## Überlappintegral ( $J$ )

Das Überlappintegral ( $J$ ) beschreibt die Schnittmenge aus der Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Donors (Gleichung 27).

$$J = \int_0^\infty F_\lambda^{\text{Donor}} \varepsilon_\lambda^{\text{Akzeptor}} \lambda^4 d\lambda \approx \sum_{470}^{700} F_\lambda^{\text{Donor}} \varepsilon_\lambda^{\text{Akzeptor}} \lambda^4 \quad (27)$$

Dazu wurden die Fläche unter dem Fluoreszenzemissionsspektrum des Donors ( $F_\lambda^{\text{Donor}}$ ) durch Summierung der Messwerte des Emissionsspektrum (10 nM;  $\lambda_{\text{ex}}$  460 nm;  $\lambda_{\text{em}}$  470-700 nm; Schrittweite 1 nm) berechnet und auf eins normiert. Aus dem Absorptionsspektrum des Akzeptors (10  $\mu\text{M}$ ) wurden die wellenlängenabhängigen Absorptionskoeffizienten ( $\varepsilon_\lambda^{\text{Akzeptor}}$ ) nach Gleichung 3 ermittelt.

## Quantenausbeute

Zur Bestimmung der Quantenausbeute des Donors wurden die Intensitäten relativ zu Fluoreszin bestimmt [102].

$$\Phi^{\text{Donor}} = \Phi^{\text{Fluoreszin}} \frac{\varepsilon_{460 \text{ nm}}^{\text{Donor}} \int F_\lambda^{\text{Donor}}}{\varepsilon_{455 \text{ nm}}^{\text{Fluoreszin}} \int F_\lambda^{\text{Fluoreszin}}} \quad (28)$$

Dazu wurden das Emissionsspektrum für Fluoreszin (10 nM in 0,1 M NaOH,  $\lambda_{\text{ex}}$  455 nm;  $\lambda_{\text{em}}$  460-700 nm) unmittelbar nach der Bestimmung des Emissionsspektrum des Donors für das Überlappintegral aufgenommen.

## Statistische Markierung von Proteinen

Zur ortsspezifischen Fluoreszenzmarkierung von Proteinen wurden die zugänglichen Cysteine eines Proteins mit thiolreaktiven Farbstoffen (Abbildung 6) nach Angaben des Herstellers umgesetzt. Um Reaktion mit dem  $\beta$ -ME zu verhindern wurde der Puffer vor der Reaktion mit MicroSpin Säulen (P6 BioRad) zu Markierungspuffer (200 mM NaCl; 50 mM Tris pH 7,5; 1 mM TCEP) ausgetauscht. Die Markierung für smFRET Experimente erfolgt mit 2x Donor und 5x Akzeptor Überschuss bei RT. Dazu wurden die in DMSO gelösten Farbstoffe im Deckel des Reaktionsgefäßes gemischt und gemeinsam zur Proteinlösung gegeben. Um die Markierung nativer Cysteine zu vermeiden, wurde die Reaktion unmittelbar nach dem Start der Reaktion wieder gestoppt, indem freier Farbstoff durch MicroSpin Säulen entfernt wurde. Die vollständige Entfernung des freien Farbstoffs wurde durch SDS-PAGE und Detektion unter UV-Licht überprüft. Bei Bedarf wurde die Entfernung freien Farbstoffs wiederholt. Wenn kein freier Farbstoff mehr nachweisbar ist, kann der Markierungsgrad aus dem Absorptionsspektrum bestimmt werden. Zur Lagerung und Markierung von markiertem Protein wurden *low retention* Reaktionsgefäße (Kisker Biotech) verwendet.

**Tabelle 7** Durchführung der statistischen Markierung von Proteinen

<b>Puffer:</b> 30 $\mu$ L einer 50 $\mu$ M Proteinlösung (200 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 mM TCEP)			
$\beta$ -ME Entfernung	1000 g	4 min	P6 BioRad MicroSpin Säule
Markierung	RT		+0,7 $\mu$ L 20 mM Donor/Akzeptor Mischung (1:3,5)
Reinigung	1000 g	4 min	P6 BioRad MicroSpin Säule

### Bestimmung der Markierungseffizienz

Die Bestimmung der Markierungseffizienz erfolgte aus dem Absorptionsspektrum zwischen 200 und 800 nm. Für ein doppelmarkiertes Protein aus A546 und A488 kann die Konzentration von A546 direkt aus dessen Absorptionsmaximum berechnet werden (Gleichung 29). Ein Teil der Absorption beim Absorptionsmaximum von A488 wird aber von A546 verursacht. Deshalb muss das Absorptionsmaximum von A488 um den Beitrag von A546 korrigiert werden (Gleichung 30). Dazu wurde das Verhältnis der Absorptionskoeffizienten bei den entsprechenden Wellenlängen als Korrekturfaktor verwendet [103]. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration musste die Absorption bei 280 nm um den Beitrag beider Farbstoffe korrigiert werden (Gleichung 31).

$$[A546] = \frac{A_{554}}{93000} \quad (29)$$

$$[A488] = \frac{A_{495} - 0,076 A_{554}}{72500} \quad (30)$$

$$[\text{Protein}] = \frac{A_{280} - 0,12 A_{554} - 0,11 A_{495}}{\epsilon_{\text{Protein}}} \quad (31)$$

Gleichungen 29-31 sind Anwendungen des Lambert Beerschen Gesetz (Gleichung 3) für Messungen mit 1 cm Schichtdicke. Die Farbstoffmarkierungseffizienz wird im Verhältnis zur Proteinkonzentration in Prozent angegeben. Für smFRET Messungen verwendete Proteine hatten eine Markierungseffizienz von etwa 60% A488 und etwa 120% A546 pro Protein. Daraus ergibt sich, dass etwas weniger als 40% der Proteine einen Donor und einen Akzeptor Farbstoff tragen. Der Rest der Proteine trägt entweder zwei Farbstoffe oder enthält unmarkierte Cysteine.

## Massenspektrometrie

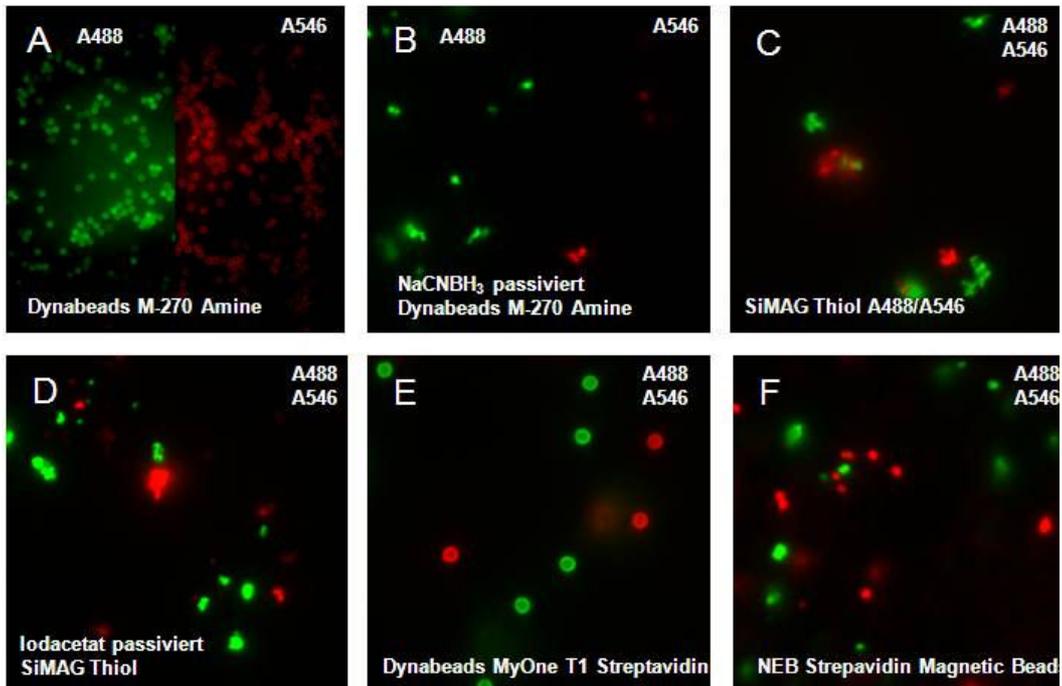
Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden in der massenspektrometrischen Abteilung des Biozentrum Basels durch Dr. P. Jenö und S. Moes durchgeführt.

## 7. SELEX

Die Aptamer Selektion wurde in Kooperation mit Prof. P. Stockley unter Anleitung von Dr. D. Bunka am Astbury Center (Universität Leeds, UK) durchgeführt und durch ein EMBO *Short Term Fellowship* gefördert.

### Immobilisierung der FRET Farbstoffe

Um die Handhabung der Farbstoffe zu ermöglichen wurden sie auf magnetischen Kügelchen immobilisiert. Dazu wurden aminreaktive Succinimidylester (*Molecular Probes*) verwendet um Lysine von Streptavidin gekoppelten Kügelchen (Dynabeads MyOne T1 Streptavidin, Invitrogen oder Streptavidin Magnetic beads, NEB) oder aminmodifizierte Kügelchen (Dynabeads M-270 Amine, Invitrogen) zu markieren. Nach der Markierung wurden freie Amine nach Angaben des Herstellers durch Bildung einer Schiff Base mit Aceton und anschließende reduktive Aminierung mit  $\text{NaCNBH}_3$  passiviert. Für die Immobilisierung auf Thiol modifizierten Kügelchen (S1MAG Thiol, chemicell, Berlin) wurden die selben Farbstoffe wie für die Markierung von Proteinen verwendet. Überschüssige Thiole wurden mit Iodacetat umgesetzt. (Abbildung 10)



**Abbildung 10:** Fehlfarbandarstellung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der markierten magnetischen Kügelchen, die in den Selektionen verwendet wurden. C-D zeigen überlagerte Bilder einer 1:1 Mischung aus A488 und A546 markierten Kügelchen. Die Anregung erfolgte mit blauem oder grünem Licht.

### Nukleinsäure Bibliotheken für SELEX

Voraussetzung für die erfolgreiche Selektion eines Aptamers ist, dass es bereits im nativen RNA Pool vorhanden ist. Deshalb wurden als Templat für die Synthese der RNA zwei verschiedene dsDNA Bibliotheken mit einer randomisierten Region von 30 bzw. 50 Nukleotiden verwendet. Die randomisierte Region war jeweils von definierten Primersequenzen für RNA Synthese und PCR Amplifikation flankiert (Primer1 und Primer2, Seite 115).

### Selektion

Während dieser Phase wurde der ssRNA Pool mit den magnetischen Kügelchen inkubiert. Anschließend wurden die Kügelchen und die an ihnen gebundene RNA durch einen Elektromagneten separiert. Insgesamt wurden 9 verschiedene Selektionsbedingungen getestet. Ein Überblick über die durchgeführten Selektionen und Bedingungen findet sich im Anhang (Tabelle 13). Von Runde zu Runde wurden die Selektionsbedingungen sukzessive verschärft, indem die Konzentration der Kügelchen für die negative Selektion erhöht und die Konzentration der Kügelchen für die positive Selektion reduziert wurden. Zusätzlich wurden die Assoziationszeiten innerhalb von 10 Runden von 20 auf 5 min reduziert, während die Dissoziationszeiten während des Waschens

umgekehrt variiert wurden (Tabelle 8) . Die Elution der RNA von den magnetischen Kügelchen erfolgte durch 5 min Inkubation bei 95°C. Anschließend wurde die RNA in ssDNA umgeschrieben (52°C; 3h; 2 µM Primer2; 0,8 mM dNTP Mix; 0,4 U Transcriptor RTase (Roche); 50 mM Tris/HCl; 30 mM KCl; 8 mM MgCl<sub>2</sub>). Nach Zugabe von Primer1 erfolgt die Amplifikation durch PCR (10 x(30 s 98°C; 30 s 52°C; 10 s 72°C) 1U Phusion Polymerase (Finnzymes); 0,8 mM dNTP Mix; 0,5 µM Primer1; 1,4 µM Primer2). Von dem entstehenden dsDNA Pool kann die Selektion jederzeit unterbrochen und fortgeführt werden.

**Tabelle 8** Inkubationszeiten und Kügelchenkonzentration während 10 SELEX Runden. Die Startkonzentration der markierten Kügelchen variierte in den 9 Selektionen (s. Anhang). Die Assoziationszeit beschreibt die Dauer der Inkubation des RNA Pools mit Kügelchen während der positiven Selektion. Die Dissoziationszeit beschreibt die Zeit, die die RNA gebundenen Kügelchen mit Puffer inkubiert wurden, bevor die gebundene RNA eluiert wurde.

Runde	rel. Kügelchenkonz. in der		Assoziationszeit [min]	Dissoziationszeit [min]
	negativen Selektion	positiven Selektion		
1	100%	100%	20	5
2	100%	100%	20	5
3	100%	100%	15	5
4	100%	100%	10	5
5	100%	100%	10	5
6	150%	50%	10	10
7	150%	50%	10	10
8	150%	50%	5	15
9	150%	50%	5	20
10	150%	50%	5	20

Für die nächste Runde wurde der dsDNA Pool durch IVT in RNA translatiert (37°C; 3h; 5mM 2'-F U/CTP; 5 mM G/ATP; 40 mM DTT; 1 U Phosphorylase aus Hefe (SigmaAldich); selbstgereinigte T7 Polymerase Y639F). Dabei kamen 2' Fluoro modifizierte Pyrimidine und ein Mutante der T7 RNA Polymerase zum Einsatz, die den effizienten Einbau der modifizierten Pyrimidine ermöglicht. Anschließend wurde die Template DNA abgebaut (37°C;20 min; 2U RQ DNase (Promega); 40 mM Tris-HCl pH 8.0; 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 1 mM CaCl<sub>2</sub>). Anschließend wurde die RNA durch Agencourt *RNAclean* nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die Selektion wurde mit Hilfe eines Biomek® 2000 Pipettierroboter (Beckman Coulter) durchgeführt.



# IV. Ergebnisse

## 1. Reinigung der Translations Initiationsfaktoren

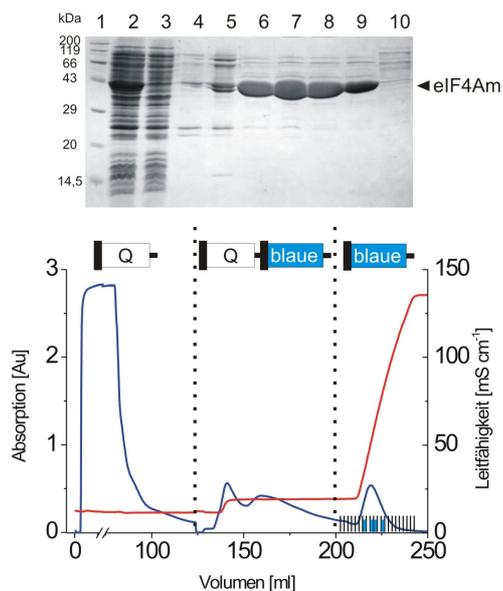
Voraussetzung für die *in vitro* Charakterisierung des eukaryotischen Translations Initiationsfaktor 4A (eIF4A) und dessen Beeinflussung durch andere Initiationsfaktoren ist die Verfügbarkeit der gereinigten Proteine. Dazu ist die Klonierung der entsprechenden Gene in Expressionsvektoren, die Überproduktion der Proteine in *E. coli* und anschließende Reinigung notwendig. Deshalb wurde mit der Klonierung der eukaryotischen Translations Initiationsfaktoren (eIF4A, eIF4B, eIF4H, eIF4G und eIF4E) begonnen. In dieser Arbeit konnte die Reinigung von eIF4A sowie von Fragmenten von eIF4G etabliert werden. Für eIF4B wurde ein vorläufiges Reinigungsprotokoll entwickelt. Die Gene von eIF4E und eIF4G, sowie Fragmente von eIF4G wurden in Expressionsvektoren kloniert. Dies war die Grundlage der Erforschung der Wechselwirkung zwischen eIF4A und eIF4G. Zur Untersuchung der andere Translations Initiationsfaktoren müssen Klonierung, Expression und/oder Reinigung weiter optimiert werden. Der folgende Abschnitt fasst die Ergebnisse aus Klonierung, Fermentation und Proteinreinigung zusammen.

## Eukaryotischer Translations Initiationsfaktor 4A aus *Mus musculus* (eIF4Am)

Die kodierende Sequenz des eIF4Am Gens wurde in pET28a kloniert. Aus der Erkennungssequenz der 3' Restriktionsstelle (NcoI) resultiert die Punktmutation S2A. Diese wurde, um die Möglichkeit zur Umklonierung des eIF4Am Gens zu erhalten, nicht korrigiert. Alle in dieser Arbeit beschriebenen eIF4Am Cystein Mutanten basieren auf diesem Konstrukt. eIF4Am wurde in pETM30 und pBAD24Xho umkloniert.

Die **Fermentation** in LB Medium mit 0,1 mM IPTG führte für alle Mutanten zu in coomassiegefärbter SDS PAGE erkennbarer Überproduktion. Die Proteinproduktion und vor allem die Proteinlöslichkeit nahmen aber zusammen mit dem Austausch nativer Cysteine schrittweise ab, sodass eine RNase freie Reinigung für die cysteinfreie Mutante eIF4Am IAAA nichtmehr möglich war. eIF4Am IAAA und darauf aufbauende Mutanten wurden deshalb als GST Fusionsprotein bei 12°C und 1 mM IPTG in *E. coli* ArcticExpress™ (DE3) Zellen produziert. Die Expression bei 0,1 mM IPTG erfolgt, im Vergleich zu den koexpressierten Chaperonen, mit deutlich reduzierter Effizienz. Autoinduktionsmedium (AIM) wurde für die Produktion von eIF4Am nicht verwendet, da die Testexpression in 10 mL nicht auf große Kulturvolumen übertragbar war.

Das in Material und Methoden beschriebene eIF4Am Reinigungsprotokoll wurde im Laufe von ca. 50 eIF4Am Reinigungen entwickelt. Die folgenden Abschnitte beschreiben die Optimierung der einzelnen Schritte.



**Abbildung 11** Reinigung von eIF4A aus *M. musculus*. Im coomassiegefärbten SDS PAGE Gel (oben) ist deutlich der Reinigungsfortschritt während der Reinigung durch Anionenaustausch- und Affinitätschromatographie (unten) zu erkennen. Der Verlauf der Absorption ist in blau, die Änderung der Leitfähigkeit in rot gezeigt. eIF4Am bindet bei 100 mM NaCl an eine Q Sepharose Säule und kann von dort durch 200 mM NaCl direkt auf eine blaue Sepharose Säule geladen werden. Von der blauen Sepharose Säule eluiert eIF4Am bei etwa 400 mM. SDS-PAGE Bahnbelegung: (1) Proteinstandard (2) Rohextrakt/Auftrag Q Sepharose Säule (3,4) Durchlauf Q Sepharose Säule (5) Durchlauf Q/blau Sepharose Säule (6-9) Fraktionen 7;9;10 und 12 (blau markiert) der Elution von der Blauen Sepharose (10) Regeneration der Q Sepharose bei 2,1 M NaCl. eIF4Am ist durch ein Dreieck gekennzeichnet.

Der Zellaufschluss wurde aus zwei Gründen bei nur 100 mM NaCl durchgeführt. Einerseits war unter diesen Bedingungen ein 23 kDa großes Protein schlecht löslich und konnte mit den Zelltrümmern pelletiert werden, während eIF4Am im Überstand verbleibt. Das 23 kDa Protein verhält sich im Verlauf der weiteren Reinigung ähnlich wie eIF4Am, und ist deshalb ansonsten nur schwer von eIF4Am zu trennen. Andererseits ermöglichte der Aufschluss bei niedriger Salzkonzentration den direkten Auftrag des Rohextrakts auf eine Anionenaustauschchromatographie (AEX) ohne vorherigen Dialyseschritt.

Als AEX Säulenmaterial wurde der starke Anionentauscher Q Sepharose verwendet. Neben eIF4Am binden auch Nukleinsäuren an das Säulenmaterial. eIF4Am eluiert bei Salzkonzentrationen unter 200 mM NaCl, während für die Elution der Nukleinsäuren höhere NaCl Konzentrationen erforderlich sind. Deshalb konnte eIF4Am durch einen Stufengradienten von 100 mM auf 200 mM direkt von der beladenen AEX Säule auf eine blaue Sepharose Affinitätschromatographie (AC) Säule appliziert werden (Abbildung 11).

eIF4Am bindet an die AC Säule. Nicht an die Säule bindet ein Protein mit etwas kleinerer Masse als eIF4Am (Abbildung 11). Nur bei niedrigen Proteinkonzentrationen und langer Laufzeit konnten die beiden Proteine mit SDS PAGE getrennt werden. Bei hohen Proteinkonzentrationen überlagern die Proteinbanden. In LS/MS Experimenten wurde die Bande höherer Masse als eIF4m identifiziert (Seite 70). In einer abschließenden Größenausschlusschromatographie (SEC) wurden letzte Verunreinigungen und Aggregate entfernt.

Der in der Literatur beschriebene Reinigungseffekt durch 20%-50% Ammoniumsulfatfällung steht in keinem Verhältnis zum Zeit- und Materialaufwand, nicht zuletzt weil die Trennung von Proteinen und Nukleinsäuren auch in der AEX möglich ist. Eine Heparin Säule, die oft zur Reinigung nukleinsäurebindender Proteine verwendet wird, hatte keinen nennenswerten Reinigungseffekt.

Die Reinigung der eIF4Am-GST Fusionsproteine erfolgte durch GSH Sepharose Affinitätschromatographie. Da die koexprimierten Chaperone des *ArcticExpress*<sup>™</sup> (DE3) Expressionsstammes gemeinsam mit dem eIF4Am-GST Fusionsprotein eluierten, waren weitere Reinigungsschritte nötig. Die Verwendung des eIF4Am Reinigungsprotokolls (s. oben) nach Abspaltung des GST-Tags durch TEV Protease erwiesen sich wegen des hohen Chaperonanteils als nicht brauchbar. Der GST-Tag und ein Teil der Chaperone wurden durch AEX an Q Sepharose entfernt. Der Rest der Chaperone konnte durch SEC entfernt werden, da die Chaperone Cpn60 und Cpn10 14 bzw. 7mere bilden und sich aufgrund ihres großen Molekulargewichts im Ausschlußvolumen der SEC-Säule befinden.

Der Reinheitsgrad von eIF4Am wurde durch SDS PAGE mit Coomassie Färbung bestimmt und liegt über 95%. Für wildtypisches eIF4Am konnten bis zu 8 mg Protein pro Liter Medium gewonnen werden. In SEC Puffer kann eIF4Am auf über 500  $\mu$ M konzentriert werden. Es ist aber empfindlich gegenüber wiederholtem Auftauen und Einfrieren und wurde deshalb in kleinen Aliquots oder in 50% Glycerin bei -20°C gelagert.

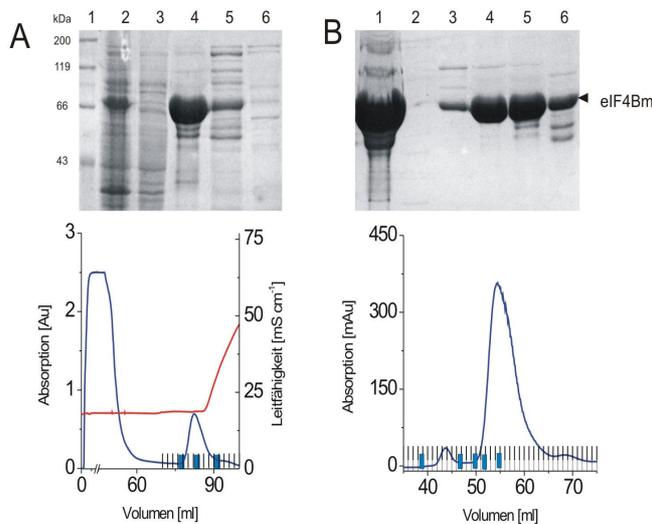
## Eukaryotischer Translations Initiationsfaktor 4B aus *Mus musculus* (eIF4Bm)

eIF4B stimuliert die ATPase und Helikaseaktivität von eIF4A. Über die direkte Wechselwirkung und den Mechanismus der Beeinflussung von eIF4A ist aber nur wenig bekannt.

Die kodierende Sequenz von eIF4Bm wurde bereits 2006 von R. Heissmann (Universität Bayreuth) in pET28a kloniert. Das bisherige Reinigungsprotokoll lieferte aber nur aggregiertes eIF4Bm.

Zur Induktion der eIF4Bm Konstrukte bei 37°C kamen sowohl LB Medium (4 L; 0,1 mM IPTG) als auch Autoinduktionsmedium (AIM; 0,8 L) zum Einsatz. Die Expression in AIM wurde zusätzlich bei Raumtemperatur (RT) getestet. Unter allen Bedingungen wurden große Mengen lösliches eIF4Bm produziert.

Das bisherige Reinigungsprotokoll sah eine 50%ige Ammoniumsulfatfällung gefolgt von einer Kationen- und Anionenaustauschchromatographie (SP und Q Sepharose) vor. Ein vergleichbarer Reinigungseffekt konnte in einem Schritt durch eine Heparin Säule erzielt werden. In der abschließenden SEC eluierte eIF4Bm aber im Ausschlussvolumen. Weder die Fermentation bei RT, die Reinigung mit 10% Glycerin im Puffer noch die Deletion der N-terminalen Domäne (eIF4Bm(176-611)) [65] hatten Einfluss auf dieses Laufverhalten. Lediglich bei Reinigung mit 2 M Harnstoff im Puffer eluierte eIF4Bm nicht im SEC Ausschlußvolumen, sondern bei etwa 55 mL (Abbildung 12). Das entspricht einem apparenten Molekulargewicht von etwa 350 kDa und ist deutlich größer als die erwarteten 136 kDa für dimeres eIF4Bm. Das Verhältnis von A280 zu A260 (1,8) gibt keine Anzeichen für Verunreinigung durch Nukleinsäuren. Entweder weicht die hydrodynamische Form von eIF4Bm stark von einer Kugel ab, oder 2 M Harnstoff sind nicht ausreichend, um eIF4B Aggregate vollständig auf zu lösen.



**Abbildung 12** Reinigung von eIF4B aus *M. musculus* bei einer Harnstoffkonzentration von 2M. Die coomassiegefärbten SDS PAGE Gele (oben) zeigen den Fortschritt der Reinigung, während der Affinitäts- und Größenausschluß-chromatographie (unten). Der Verlauf der Absorption ist in blau, die Änderung der Leitfähigkeit in rot gezeigt. **(A)** Reinigung von eIF4Bm durch eine Heparin Säule. SDS-PAGE Bahnbelegung: (1) Proteinstandard (2) Rohextrakt/Auftrag Heparin Säule (3) Durchlauf Heparin Säule (4-6) Fraktionen 6; 9 und 13 (blau markiert) der Elution durch einen Salzgradienten **(B)** Reinigung von eIF4Bm durch eine S200 SEC. SDS-PAGE Bahnbelegung: (1) Auftrag S200 (2-6) Fraktionen 9; 17; 20; 22 und 25 (blau markiert). eIF4Bm ist durch ein Dreieck gekennzeichnet.

Der durch Coomassiefärbung bestimmte Reinheitsgrad bei Reinigung mit 2 M Harnstoff liegt über 90%. Es konnten etwa 5 mg Protein pro Liter Medium gewonnen werden. In Gegenwart von 2 M Harnstoff lässt sich eIF4Bm auf ca. 500  $\mu$ M konzentrieren. Bei direkter Verdünnung von eIF4B in Puffer B fiel das Protein aber aus. Durch Dialyse gegen SEC Puffer konnte eine Proteinkonzentration von 380  $\mu$ M erreicht werden.

Zur Verbesserung der Stabilität von eIF4Bm wurde die Deletion der N-terminalen Domäne vorgeschlagen [65]. Bm(176-611) (Abbildung 3) lässt sich wie eIF4Bm reinigen, eine Verbesserung der Stabilität konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Die beschriebene Reinigung von eIF4Bm stellt ein vorläufiges Reinigungsprotokoll dar. Vor allem die Stabilität von eIF4Bm muss verbessert werden.

## Eukaryotischer Translations Initiationsfaktor 4H aus *Mus musculus* (eIF4Hm)

eIF4H ist nur 250 Aminosäuren groß, weist aber über die gesamte Länge Homologie zu eIF4B auf (Abbildung 3). Auch eIF4H stimuliert, wenn auch schwächer als eIF4B, die Helikase und ATPase Aktivität von eIF4A. Deshalb wurde eIF4Hm als Alternative zum aggregationsanfälligen eIF4Bm lanciert.

Das Gen für eIF4Hm enthält eine interne NcoI Schnittstelle (Abbildung 3), die vor der Klonierung in pET28a entfernt werden muss. Deshalb wurde versucht das eIF4Hm Gen ohne Restriktionsspaltung mit stumpfen Enden (*blunt end*) in *pBluescript* zu klonieren. In *pBluescript* wäre dann die Entfernung der NcoI Schnittstelle durch gerichtete Mutagenese möglich. Die PCR Amplifikation mit den eIF4Hm

Klonierprimern lieferte aber drei Fragmente ähnlicher Größe (Abbildung 13). Durch das Muster einer XhoI Restriktionsspaltung konnte die mittlere Bande als eIF4Hm identifiziert werden (Abbildung 13). Das etwas kleinere Fragment ist vermutlich die Isoform 2 von eIF4H, bei der durch alternatives Spleißen die XhoI Schnittstelle entfernt wurde. Eine weitere eIF4H Isoform ist nicht bekannt. Aufgrund der Homologie zu eIF4B könnte es sich bei dem größten PCR Produkt aber um ein Fragment aus eIF4Bm handeln. Wegen der ähnlichen Größe konnten die Banden nur schlecht voneinander getrennt werden, und das Gen für eIF4Hm noch nicht kloniert werden.

### Eukaryotischer Translations Initiationsfaktor 4G aus *Mus musculus* (eIF4Gm)

eIF4G bildet zusammen mit eIF4A und eIF4E einen zentralen Komplex der Translations Initiation (eIF4F). Außerdem ermöglicht eIF4G zusammen mit eIF4A die Initiation an IRES Elementen.

Der kodierende Bereich des eIF4Gm Gens ist 4,8 kb groß. Die für die Klonierung der Maus Proteine verwendete cDNA Bibliothek hatte aber nur eine mittlere Länge von unter 1 kb. Als Template für die Klonierung wurde deshalb ein volllängen cDNA Klon aus der Stammsammlung des deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH verwendet. Zunächst wurden aber die internen NcoI Schnittstellen (Abbildung 3) durch Einfügen stiller Mutation zerstört, bevor das eIF4Gm Gen in pET28a kloniert wurde. Ausgehend von eIF4Gm:pET28a wurden die beiden eIF4A Bindungsstellen (HEAT1 und HEAT2 bzw. eIF4Gm(686-1089) und eIF4Gm(1226-1601), Abbildung 3) amplifiziert und in pET28a oder pETM30 kloniert.

Die Produktion von eIF4Gm wurde in *E. coli* Rosetta1, Rosetta2 und StarRIL, jeweils in LB (0,1 mM IPTG) und AIM bei 37°C getestet. Die erwartete Proteinbande von 175 kDa konnte nicht beobachtet werden. Laut William Merrick, der an über 100 Publikationen zu eukaryotischen Translations Initiationsfaktoren beteiligt war, ist die *in vitro* Produktion von volllängen eIF4G noch niemandem gelungen. Dementsprechend finden sich in der Literatur auch keine Hinweise auf die rekombinante Produktion von eIF4G. Aus diesem Grund wurde versucht, die eIF4A Bindungsstellen aus eIF4Gm separat zu produzieren. eIF4Gm(HEAT2) (Abbildung 3) konnte als GST Fusionsprotein in Rosetta 2 produziert werden (10 mL AIM; 24 h; 37°C). Die für die Initiation essentielle eIF4A Bindungsstelle eIF4Gm(HEAT1) (Abbildung 3) lag nicht als GST Fusionsprotein vor und konnte weder in AIM noch in LB Medium erfolgreich produziert werden.

Die Untersuchung der Bindungsstellen ist vor allem im direkten Vergleich zueinander interessant. Die Reinigung von eIF4Gm(HEAT2) wurde deshalb hinten angestellt.

## Eukaryotischer Translations Initiationsfaktor 4E aus *Mus musculus* (eIF4Em)

eIF4E ist für die Erkennung der CAP Struktur verantwortlich [104] und ist vermutlich am ratenbestimmenden Schritt der CAP abhängigen Proteintranslation beteiligt [105]. Es wechselwirkt direkt oder als Teil von eIF4F mit eIF4A [106]. eIF4E übernimmt eine entscheidende Rolle in der Regulation der Translation und wurde als proto Onkogen identifiziert [107]. eIF4E wiederum wird durch Phosphorylierung und eIF4E bindende Proteine (eIF4E-BP) reguliert. Dabei kann die Deletion von eIF4E-BPs Resistenz gegen Virusinfektionen vermitteln [108]. Welchen Einfluss eIF4E auf eIF4A ausübt ist nicht bekannt.

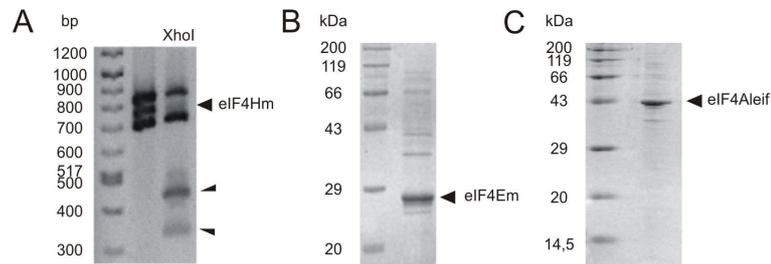
Die kodierende Sequenz von eIF4Em wurde in pET28a kloniert. Das Protein konnte bei 37°C in LB Medium mit 0,2 mM IPTG erfolgreich überproduziert werden (Abbildung 13).

Da die Untersuchung von eIF4E auf den Ergebnissen von eIF4A und eIF4G aufbaut, wurde die Entwicklung eines Reinigungsprotokolls für eIF4Em zunächst nicht weiterverfolgt.

## Eukaryotischer Translations Initiationsfaktor 4A aus *Leishmania infantum* (eIF4Aleif)

*L. infantum* ist ein humanpathogener eukaryotischer Parasit. Neben dem allgemeinen Interesse am Mechanismus von eIF4A stellt sich daher für eIF4A aus *L. infantum* (eIF4Aleif) die Frage, ob dessen gezielte Inhibition möglich ist. Außerdem enthält eIF4Aleif lediglich ein natives Cystein, was von großem Vorteil wäre, falls der Austausch der vier nativen Cysteine von eIF4Am die Proteinaktivität negativ beeinflusst.

Das Template für die Klonierung von eIF4Aleif war eine Mischung aus humaner und *Leishmania* DNA und stammt aus dem Rückenmark verschiedener *L. infantum* Patienten des schweizerischen Tropeninstituts. Die Klonierung des eIF4Aleif Gens in den Expressionsvektor pET28a erfolgte mit Hilfe der NcoI und XhoI Restriktionsstellen. Das Protein wurde erfolgreich in 0,8 L AIM (37°C; 24h) produziert. Da für eIF4Am und eIF4Ay die zugänglichen nativen Cysteine ohne Einfluss auf die Aktivität entfernt werden konnten, wurde die Entwicklung eines Reinigungsprotokolls für eIF4Aleif zunächst hinten angestellt.



**Abbildung 13 (A)** Produktion von eIF4A aus *L. infantum*. eIF4Alef wurde bei 37°C Ü/N in 0,8L AIM fermentiert. Deutlich ist die Überproduktion eines Proteins der erwarteten Größe zu erkennen (Pfeil). **(B)** Produktion von eIF4E aus *M. musculus*. eIF4Em wurde bei 37°C Ü/N in 0,8L AIM fermentiert. Deutlich ist die Überproduktion eines Proteins der erwarteten Größe zu erkennen (Pfeil). **(C)** Die PCR Amplifikation des eIF4Hm Gens aus einer cDNA Bibliothek liefert drei Fragmente. Durch die Inkubation mit XhoI wurde die mittlere Bande als das eIF4HI Gen identifiziert (Pfeil).

## Eukaryotischer Translations Initiationsfaktor 4A und 4G aus *Saccharomyces cerevisiae* (eIF4Ay und eIF4Gy(572-853))

Die Translations Initiation in *M. musculus* und *S. cerevisiae* unterscheidet sich in einigen Punkten. Beispielsweise fehlt in eIF4Gy die regulatorische C terminale Domäne (Abbildung 3). Um die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Rolle von eIF4A in der Translations Initiation von einfachen (Hefe) und weit entwickelten Eukaryoten (Maus) zu untersuchen, wurden auch eIF4Ay und die eIF4A Bindungsstelle aus eIF4Gy ((eIF4Gy(572-853), Abbildung 3) untersucht. Die Plasmide eIF4Ay:pET28a und eIF4Gy(572-853):pET28a wurden freundlicherweise von Prof. Baumann (Universität Bern) zur Verfügung gestellt [83]. Die Sequenzierung der Konstrukte ergab, dass eIF4Gy(572-853) die konservative Punktmutation K590R enthält.

Die Proteinproduktion erfolgte in 0,8 L AIM während 24 h. Für die Löslichkeit von eIF4Gy(572-853) ist die Fermentation bei RT notwendig. Sowohl eIF4Ay als auch eIF4Gy(572-853) enthalten einen N-terminalen His-Tag. Die Reinigung erfolgt deshalb über immobilisierte Nickelionen an IMAC Säulen. Nach der Abspaltung des His-Tags durch Thrombin während ÜN Dialyse wird durch eine zweite IMAC Säule ungespaltenes Protein sowie unspezifische Binder abgetrennt. Durch SEC werden letzte Verunreinigungen und Proteinaggregate entfernt.

Der durch SDS PAGE und Coomassiefärbung bestimmte Reinheitsgrad liegt über 95%. Pro Liter Medium konnten 50 mg Protein gereinigt werden. In SEC-Puffer wurden Konzentrationen über 1000 µM erreicht. Die Stabilität von eIF4Gy(572-853) nimmt aber mit der Salzkonzentration drastisch ab. Deshalb waren Messungen mit eIF4Gy(572-853) in Puffer B nicht möglich.

Aus der zu Beginn breit angelegten Auswahl von Initiationsfaktoren konnten letztendlich eIF4Ay und eIF4Am, sowie die eIF4A bindende Domäne aus eIF4Gy (eIF4Gy(572-853)) und mit Einschränkungen eIF4B für die Charakterisierung der Wechselwirkung des Helikasekerns mit interagierenden Proteinen verwendet werden.

## 2. Methodenentwicklung

Obwohl DEAD Box Proteine nicht über ihre Aktivität, sondern durch ihre konservierten Sequenzmotive (Abbildung 1) definiert werden, wird häufig auf die RNA stimulierte ATPase Aktivität und die Fähigkeit zur Entwindung kurzer RNA Doppelstränge verwiesen. Dieser Abschnitt beschreibt die Suche nach geeigneten Methoden zur Charakterisierung dieser Aktivitäten und deren Etablierung. Außerdem werden die Experimente zur Entwicklung einer Methode zur affinitätschromatographischen Reinigung von donor-/akzeptormarkiertem Protein beschrieben.

### ATP Hydrolyse Aktivität

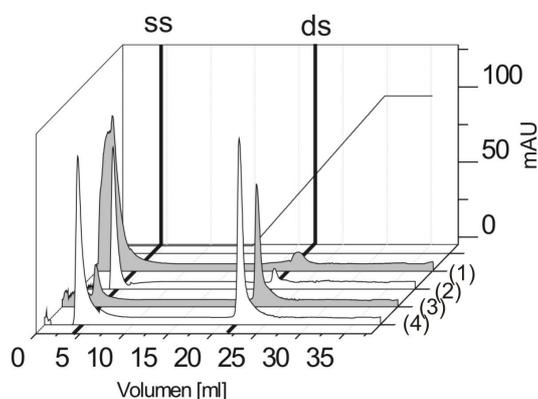
Die RNA stimulierte ATPase Aktivität wurde verwendet, um die Aktivität verschiedener Mutanten zu vergleichen. Als RNA Substrat wurde polyU RNA verwendet, da kein spezifisches RNA Substrat für eIF4A bekannt ist. Wegen der geringen RNA Affinität waren hohe polyU Konzentrationen nötig, um eIF4A zu sättigen. Durch die hohen RNA Konzentrationen bestanden besondere Anforderungen an die Reinheit der RNA. Die Qualität von polyU RNA von SigmaAldrich variierte von *Batch* zu *Batch* und führte teilweise zu erheblichen Signaländerungen im ATPase Test. Weder durch Ethanol fällung noch durch Phenol/Chloroform Extraktion gelang die Entfernung dieser Kontamination. Im Gegensatz zeigte polyU RNA von *GE Healthcare* keine ATPase Hintergrundaktivität. Trotzdem wurden nur ATPase Messungen mit polyU RNA aus demselben *Batch* verglichen, um Artefakte zu vermeiden.

## Helikaseaktivität

Zur Charakterisierung der Entwindungsaktivität wurden drei *in vitro* Techniken getestet und die Idee sowie experimentelle Grundlagen für einen *in vivo* Helikasetest erarbeitet.

### Entwindungstest mit Hydroxapatit-Chromatographie

Ein Entwindungstest muss den Doppelstrang (ds) Anteil relativ zum Einzelstrang (ss) Anteil quantifizieren können. Die Trennung von ds- und ss-Nukleinsäuren ist durch Hydroxapatit-Chromatographie möglich, da das Ribosephosphat Rückgrat in ds-Nukleinsäuren strukturiert ist und deshalb besser an das Hydroxapatit Gitter binden kann, als im Einzelstrang. Experimentell konnten 20  $\mu\text{M}$  ss von 10  $\mu\text{M}$  ds eines Mutageneseprimerpaars getrennt werden (Abbildung 14). Für die Quantifizierung von ss und ds Anteil im Entwindungstest reicht die Sensitivität aber nicht aus. Außerdem müssten für die Quantifizierung der Nukleinsäuren die unterschiedlichen Absorptionskoeffizienten der Stränge, sowie der hyperchrome Effekt beim Übergang von Doppel- zu Einzelstrang berücksichtigt werden. Dafür wäre eine experimentelle Kalibriergerade im Bereich des Detektionslimits notwendig. Hydroxapatit-Chromatographie ist deshalb keine geeignete Methode zur Untersuchung der Helikaseaktivität.



**Abbildung 14:** Trennung von Nukleinsäuren durch Hydroxapatit-Chromatographie. Der Absorptionsverlauf bei 260 nm zeigt die Elution von ss und ds DNA (1) Puffer; (2) 10  $\mu\text{M}$  ss; (3) 20  $\mu\text{M}$  ds; (4) Mischung aus 10  $\mu\text{M}$  ss und 20  $\mu\text{M}$  ds. (2-4) sind jeweils um das Puffersignal (1) korrigiert. Die Trennung von ss und ds ist prinzipiell möglich. ss eluiert im Durchlauf, während ds an die CHT Säule bindet. Für den Einsatz in Entwindungstests ist die Sensitivität aber nicht ausreichend.

### Entwindungstest mit fluoreszenzmarkierter RNA

Eine alternative Methode zur Trennung von ss und ds RNA ist die Trennung nach Größe und Ladung in nativer PAGE. Haben die RNA Stränge unterschiedliche Längen und ist nur ein Strang fluoreszenzmarkiert, können ss und ds einfach identifiziert werden.

Die Detektionsgrenze für markierte DNA in einem Polyacrylamidgel lag zwischen 10 und 100 fmol. Für eine zuverlässige Quantifizierung einer ds und einer ss Bande ist ein Vielfaches dieser Menge

nötig. Zur Bildung des Doppelstrangs wurden deshalb 40 pmol (4  $\mu$ M) fluoreszenzmarkierte 10mer RNA und ein Überschuß an unmarkierter 50mer RNA eingesetzt. Bei diesen Konzentrationen bildete sich der Doppelstrang spontan aus den Einzelsträngen. Um die Rückbildung des 10/50mer nach Entwindung zu verhindern, wurde das 10mer durch Bindung an ein komplementäres 10mer (*trap*) aus dem Gleichgewicht entzogen. Ein *trap* Strang aus DNA konnte die Rückbildung des 10/50mer nicht verhindern. Hingegen destabilisierte ein RNA *trap* Strang das 10/50mer bereits ohne Proteineinwirkung. Abgesehen davon würde ein im Überschuß eingesetzter RNA *trap* Strang die absolute RNA Konzentration signifikant erhöhen. Da eIF4A keine Sequenzspezifität aufweist ist zu erwarten, dass *trap* RNA mit dem Entwindungssubstrat um die Bindung an eIF4A konkurriert und deshalb als kompetitiver Inhibitor auf die Aktivität von eIF4A wirkt. Aus diesen Gründen ist auch der Einsatz von fluoreszenzmarkierter RNA zur Detektion der Entwindungsaktivität nicht geeignet.

#### **Entwindungstest mit radioaktiv markierter RNA**

Die Markierung von RNA durch radioaktives Phosphat ermöglicht die Detektion von kleinsten Mengen RNA. Das erlaubt die RNA Konzentration im Helikasetest deutlich zu reduzieren. Für Entwindungstests mit radioaktiv markierter RNA wurden lediglich 40 fmol (2 nM) 10mer RNA und 44 fmol (2,2 nM) 50mer RNA eingesetzt. Bei diesen Konzentrationen ist die Bildung des Doppelstrangs aus den Einzelsträngen kinetisch gehemmt. Während 15 min wurde praktisch keine Bildung des 10/50mers aus den Einzelsträngen beobachtet. Die effiziente Bildung des 10/50mers erfolgte bei der 60 fachen Konzentrationen. Erst mit dem Start des Entwindungstest wurde die RNA verdünnt und damit die Rückbildung des Doppelstrangs verlangsamt.

Der Einsatz radioaktiv markierter RNA ermöglicht die Detektion in einem Konzentrationsbereich, in dem die Einzelstrangbildung ohne den Einsatz von *trap* Nukleinsäuren detektiert werden kann. Deshalb erfolgte die Charakterisierung der Helikaseaktivität von eIF4A mithilfe radioaktiv markierter RNA durch Trennung von ds und ss in nativer PAGE.

#### ***in vivo* Helikasetest mit RNA Thermometern**

Die Beurteilung der Aktivität von Proteinmutanten durch die beschriebenen *in vitro* Helikasetests erfordert die zeit- und arbeitsaufwändige Produktion und Reinigung jeder einzelnen Mutante. Deutlich effektiver wäre ein *in vivo* Helikasetest, mit dem eIF4A Mutanten ohne Reinigung auf ihre Aktivität getestet werden könnten.

Die Grundlage des *in vivo* Helikasetests bildet ein RNA Thermometer, das die Expression eines Reportergens reguliert. Erhöhung der Umgebungstemperatur ändert die Faltung des RNA Thermometers und ermöglicht die Expression des Reportergens (Abbildung 5). Da für eIF4A gezeigt wurde, dass es Doppelstränge entwindet, indem es ihre absolute Stabilität reduziert [72], ist zu erwarten, dass eIF4A die Temperatur für den Übergang der Faltung des RNA Thermometers reduziert. Somit könnte die Helikaseaktivität anhand der Expression des Reportergens beschrieben werden.

Die Möglichkeit, diese Idee zu testen ergab sich durch die Zusammenarbeit mit Prof. F. Narberhaus. In seiner Gruppe sollte der Einfluss von eIF4A auf die Expression von  $\beta$ -Galaktosidase unter Repression eines RNA Thermometers getestet werden. Die Transkription des  $\beta$ -Galaktosidase Gens wurde durch die Spaltung von ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -galactopyranosid (ONPG) spektroskopisch detektiert. Da die verfügbaren Expressionsstämme, in denen die Induktion von eIF4A durch IPTG möglich ist bereits eine Kopie des  $\beta$ -Galaktosidase Gens tragen (Seite 28), wurde eIF4Am in einen Arabinose induzierbaren Vektor umklontiert. Die Produktion von eIF4Am pBAD24Xho war erfolgreich, die Bestimmung der Helikaseaktivität jedoch nicht, da bereits pBAD24Xho ein starkes Signal im ONPG Test verursachte. Zur Etablierung des *in vivo* Helikase Aktivitätstests muss deshalb ein Bakterienstamm identifiziert werden, der die Produktion von eIF4Am ermöglicht, aber gleichzeitig kein Abbau von ONPG durch Enzyme des Produktionsstamms verursacht.

### Trennung von donor- und akzeptormarkierten Proteinen

Für FRET ist ein Donor- und ein Akzeptorfarbstoff notwendig. Die Markierung von Proteinen durch eine Mischung aus Donor- und Akzeptorfarbstoff (Seite 52) führt aber immer zu einer statistischen Verteilung der Farbstoffe. Zur Vermeidung oder Trennung von Proteinen, die mit zwei gleichen, nur einem oder keinem Farbstoff markiert sind, wurden bereits verschiedene Markierungstechniken, die Reinigung durch Ionenaustauschchromatographie [103] oder die Verknüpfung von donor- und akzeptormarkierten Fragmenten durch *expressed protein ligation* [109] getestet. Keine dieser Methoden führte zum gewünschten Erfolg.

Aptamere für Donor- und Akzeptorfarbstoff würden die affinitätschromatographische Reinigung von donor-/akzeptormarkiertem Protein ermöglichen. Deshalb wurde in einem durch ein EMBO Kurzzeitstipendium geförderten Projekt nach Aptameren für A488 und A546 geforscht.

Die Farbstoffe wurden dazu auf 6 verschiedene Arten immobilisiert, zwei RNA Bibliotheken, verschiedene Temperaturen und unterschiedene Selektionsbedingungen getestet. Ein Überblick über die Bedingungen in den durchgeführten Selektionen ist im Anhang (Tabelle 13) aufgeführt. Dennoch konnten in den drei für dieses Projekt zur Verfügung stehenden Monaten keine Aptamere für Alexa488 oder A546 isoliert werden.

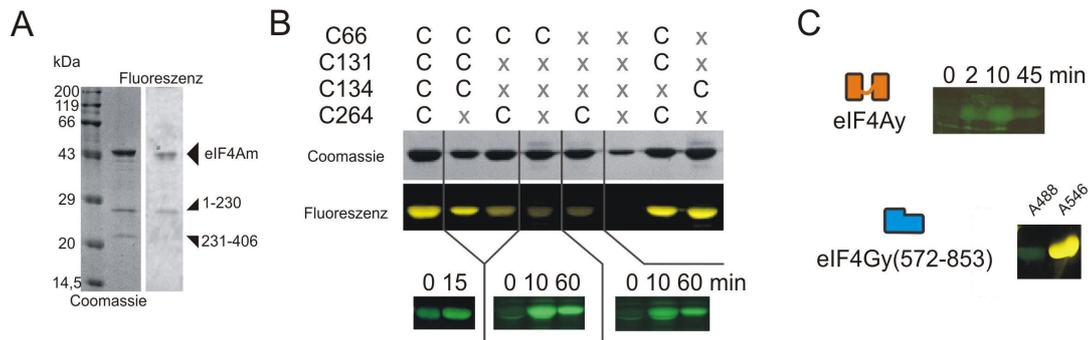
### **3. Markierung von eIF4A für smFRET Experimente**

Eine der Herausforderungen für die Bestimmung von Proteinkonformationen durch smFRET Experimente liegt in der Immobilisierung der Farbstoffe auf dem Protein. Im Idealfall werden je ein Donor- und ein Akzeptorfarbstoff an definierte Positionen von eIF4A gekoppelt, ohne dessen Struktur und Aktivität zu beeinflussen. Der folgende Abschnitt fasst die Arbeiten zur Doppelmarkierung von eIF4A für smFRET Experimente zusammen.

Die Kopplung der Fluoreszenzfarbstoffe an eIF4A erfolgt über den nukleophilen Angriff von Cysteinen an maleimidgekoppelte Farbstoffe. eIF4Am, eIF4Ay und eIF4Gy(572-853) enthalten jeweils 4,3 oder 4 native Cysteine. Native Cysteine die, für das Markierungsreagenz zugänglich sind, müssen deshalb identifiziert und entfernt werden.

eIF4Ay und eIF4Gy(572-853) wurden selbst nach mehrminütiger Inkubation mit reaktivem A488 nur schwach markiert (Abbildung 15). Keines der nativen Cysteine ist dementsprechend für A488 zugänglich. Wahrscheinlich wegen der etwas längeren Verknüpfung zwischen der reaktiven Gruppe und dem Farbstoff (Abbildung 6) wurde aber mindestens ein natives Cystein in eIF4Gy(572-853) durch A546 markiert (Abbildung 15). Für eIF4Ay und eIF4Gy(572-853) konnten Cysteine für die Immobilisierung von Farbstoffen deshalb direkt in die wildtypische Sequenz eingeführt werden. Die spezifische Markierung von eIF4Gy(572-853) war jedoch wegen der Zugänglichkeit der nativen Cysteinen für A546 auf A488 beschränkt.

Im Gegensatz dazu wurde eIF4Am bereits während weniger Sekunden markiert (Abbildung 15). Mindestens ein natives Cystein in eIF4Am ist dementsprechend markierbar. Bevor Cysteine für die Immobilisierung von FRET Farbstoffen eingeführt werden konnten, mussten die zugänglichen nativen Cysteine entfernt werden. Dazu wurden einerseits die markierbaren nativen Cysteine in eIF4Am identifiziert. Andererseits wurde der Effekt des Austausch nativer Cysteine auf die Aktivität von eIF4Am untersucht.



**Abbildung 15 (A)** Spaltung von markiertem eIF4Am durch saure Hydrolyse der 230D-231P Peptidbindung. Gezeigt sind die Coomassiefärbung und die Fluoreszenzaufnahme einer SDS PAGE. Die saure Hydrolyse ist nicht vollständig, wie an volllängen eIF4m zu sehen ist (schwarzes Dreieck). Die Spaltprodukte entsprechen den erwarteten Größen von eIF4Am(1-230) (25,5 kDa, NTD) und eIF4Am(231-406) (20,6 kDa, CTD). eIF4Am(231-406) mit Cystein 264 ist in der Fluoreszenzaufnahme nicht zu sehen. Demensprechend ist C264 schlecht für die Markierungsreaktion zugänglich. **(B)** SDS PAGE Analyse der Markierung ausgewählter eIF4Am Cysteinmutanten nach 1 h Markierung durch Tetramethylrhodamin (TMR) und die Kinetik der Markierung durch A488. Der Austausch eines nativen Cysteins ist durch ein graues x gekennzeichnet. eIF4Am, das nur die Cysteine C66 und C264 enthält zeigt nur schwache Markierung. Im Gegensatz dazu ist zwischen der Markierung von C134 und wildtyp eIF4Am kein Unterschied erkennbar. Für die Kinetik der Markierung wurde die Reaktion jeweils nach dem Mischen oder nach der angegebenen Zeit durch  $\beta$ -ME gestoppt. Der Vergleich der Kinetik zeigt, dass die Markierung von C66 und C264 deutlich langsamer erfolgt, als die Markierung von C131 oder C134. **(C)** Markierung von eIF4Ay und eIF4Gy(572-853) durch A488 oder A546. Die nativen Cysteine in eIF4Ay und eIF4Gy(572-853) sind nicht für A488 zugänglich. Im Gegensatz dazu ist mindestens ein natives Cystein in eIF4Gy(572-853) durch A546 zugänglich.

## Identifikation markierbarer nativer Cysteine

Die Zugänglichkeiten nativer Cysteine kann auf zwei Arten bestimmt werden. Entweder wird für jedes native Cystein eine Mutante untersucht, die nur noch dieses Cystein enthält, oder wildtypisches Protein wird nach der Markierung fragmentiert und die cysteinhaltigen Fragmente werden getrennt und separat analysiert.

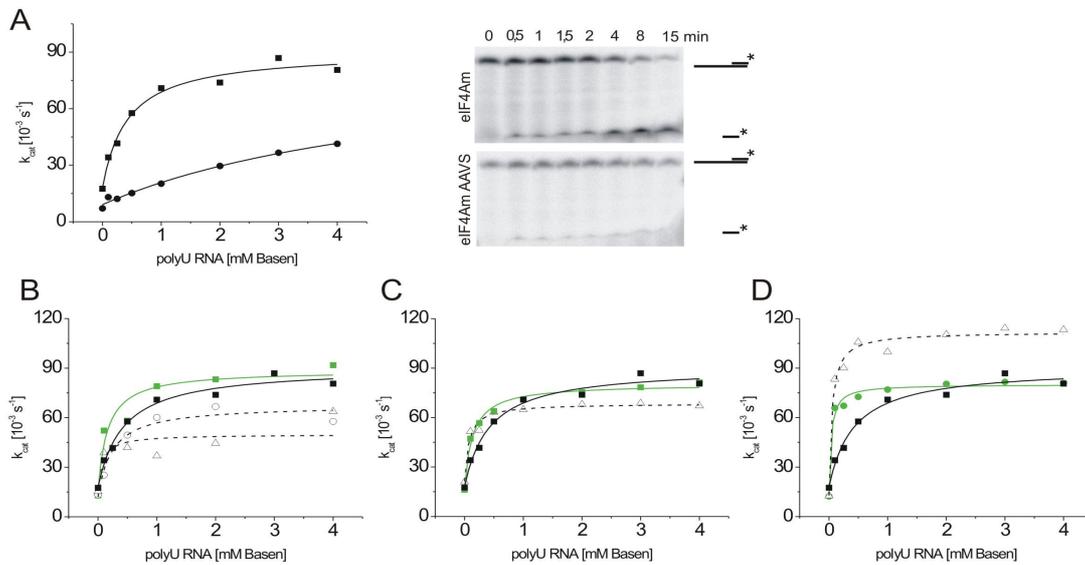
Durch die selektive Spaltung von eIF4Am mit BrCN und anschließender Analyse der Fragmente in LC/MS konnte das Protein zwar als eIF4Am identifiziert werden, die Zuordnung der cystein- bzw. farbstoffhaltigen Fragmente war allerdings nicht möglich. Mit 17 Methioninen in 406 Aminosäuren ist das Spaltmuster von eIF4Am zu komplex, um die Fragmente mit SDS PAGE zu analysieren. Die Spaltung der säurelabilen Peptidbindung zwischen Aspartat 230 und Prolin 231 liefert dagegen lediglich zwei Fragmente, die mittels SDS PAGE getrennt und analysiert werden können (Abbildung 15). Während das N-terminale Fragment mit den Cysteinen 66, 131 und 134 markiert wurde, konnte keine Markierung des C-terminalen Fragments mit C264 detektiert werden. Informationen über die Zugänglichkeit der anderen Cysteine wurden durch Produktion und Reinigung verschiedener Cysteinmutanten gewonnen. Abbildung 15 zeigt die Markierung verschiedener Cysteinmutanten nach 60 minütiger Inkubation mit dem reaktiven Farbstoff. In Übereinstimmung mit dem Ergebnis

aus den Spaltungsexperimenten wurde eine Mutante, die nur das native Cysteine 264 enthielt kaum markiert. Ähnliches Verhalten wurde für C66 beobachtet. Im Gegensatz dazu war kein Unterschied im Markierungsgrad zwischen wildtypischem eIF4A und eIF4A, das nur C134 enthält, zu erkennen. Aus dem Vergleich der Markierungseffizienz von eIF4A CAVC und eIF4A CCAC kann gefolgert werden, dass auch C131 für den Farbstoff zugänglich sein muß. Daraufhin wurde die Kinetik der Markierung von C66 und C264 untersucht. Im Gegensatz zu wildtyp eIF4A wurden für C66 und C264 unmittelbar nach dem Mischen mit dem reaktiven Farbstoff keine Markierung detektiert (Abbildung 15).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Cysteine 131 und 134 für die Markierung zugänglich sind, während die Cysteine 66 und 264 nur eingeschränkt zugänglich sind. C66 und C264 werden im Vergleich zu C131 und C134 langsam markiert, sodass durch kurze Reaktionszeiten die Markierung von C66 und C264 verhindert werden kann.

### Einfluss nativer Cysteine auf die eIF4A Aktivität

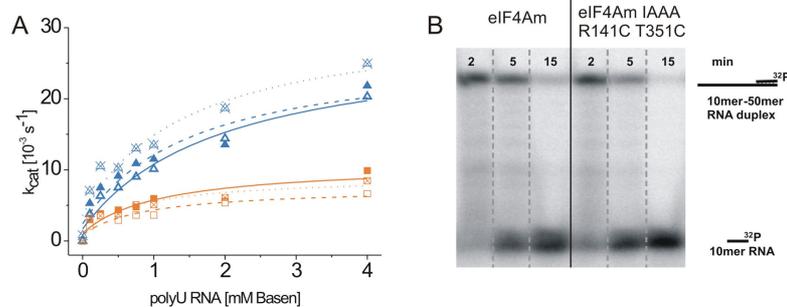
Parallel zur Beschreibung der Zugänglichkeit der nativen Cysteine erfolgte die Konstruktion einer cysteinfreien eIF4Am Mutante mit wildtyp ähnlicher Aktivität. Obwohl sich keines der nativen Cysteine in einem konservierten Motiv befindet, zerstörte ihr Austausch durch die an der entsprechenden Position vorhandenen Aminosäuren in HERA und YxiN (eIF4Am AAVS) die ATPase und Helikase Aktivität nahezu vollständig (Abbildung 16). Auf der Suche nach besser geeigneten Aminosäuren zum Austausch der nativen Cysteine stellte sich schnell heraus, dass sich das Verhalten von mehrfach Cysteinmutanten im ATPase Test nicht additiv aus den Effekten der einzel Cysteinmutanten zusammensetzte (Abbildung 16). Dies machte die Vorhersage der Aktivität von mehrfach Cysteinmutanten unmöglich. Der Austausch jedes Cysteins musste experimentell im Kontext der anderen Cysteinaustauschmutationen untersucht werden.



**Abbildung 16 (A)** Vergleich der ATPase und Helikaseaktivität von wildtyp eIF4Am (oben, Quadrate) und der cysteinfreien eIF4Am AAVS Mutante (Kreise, unten). Die ATPase und Helikase Aktivität von eIF4Am wird durch den Austausch der nativen Cysteine gegen die entsprechenden Aminosäuren in YxiN und HERA nahezu vollständig zerstört. **(B)** Vergleich der ATPase von eIF4A CAAC (grüne Quadrate), CASC (offene Dreiecke) und CAVC (offene Kreise) mit eIF4A (Quadrate) verglichen. Der Austausch von C134A (grün) zeigt wildtypähnliches Verhalten **(C)** Zum Austausch des nativen Cystein 264 wurden die ATPase Aktivität von eIF4A CAAA (grüne Quadrate) und CAAS (offene Dreiecke) mit eIF4A (Quadrate) verglichen. Die ATPase von eIF4Am CAAA (grün) entspricht am ehesten dem wildtyp **(D)** Zum Austausch des nativen Cystein 66 wurden die ATPase Aktivität von eIF4A IAAA (grüne Kreise) und SAAA (offene Kreise) mit eIF4A (Quadrate) verglichen. Die cysteinfreie Mutante eIF4A IAAA (grün) zeigt pseudowildtypisches Verhalten.

Unter Berücksichtigung aller kanonischen Aminosäuren würden sich über 130 000 mögliche Kombinationen für den Austausch der nativen Cysteine ergeben. Deshalb wurde die Anzahl der Aminosäuren auf Serin - da isoelektrisch zu Cystein, Alanin - als kleine ungeladene Aminosäure und eine weitere Aminosäure aus *in silico* Betrachtung beschränkt. Der Austausch der nativen Cysteine erfolgte in einem iterativen Prozess: Nachdem der Austausch C131A keinen Effekt auf die Aktivität zeigte, wurde Position C134 durch Alanin (eIF4A CAAC), Serin (eIF4A CASC) und Valin (eIF4A CAVC) ersetzt. Die entsprechenden Mutanten wurden gereinigt und anschließend ihre polyU stimulierte ATPase Aktivität bestimmt. Die Aktivität von eIF4A CAAC war der des Wildtyps am ähnlichsten. Deshalb wurde dasselbe Vorgehen, ausgehend von eIF4A CAAC für Position C264 und anschließend C66 wiederholt (Abbildung 16). Dabei wurde konsequent auf vergleichbares Verhalten zum Wildtyp selektioniert, sodass auch Mutanten mit erhöhter ATPase oder Helikase Aktivität aussortiert wurden. Wie bereits im letzten Kapitel beschrieben nahm die Ausbeuten der Reinigung mit der Anzahl ausgetauschter Cysteine kontinuierlich ab. Die vierfach Cysteinmutanten wurden deshalb als GSH Fusionsprotein bei 12°C mit Hilfe der Chaperone Cpn10 und Cpn60 produziert und das Reinigungsprotokoll entsprechend angepasst (Seite 58). In diesem Verfahren wurde eIF4Am C66I

C131A C134A C264A (IAAA) als cysteinefreies eIF4Am mit wildtypähnlicher Aktivität identifiziert (Abbildung 16). eIF4Am IAAA diente als Ausgangspunkt für das Einführen von Cysteinen zur Immobilisierung der FRET Farbstoffe (Abbildung 17).

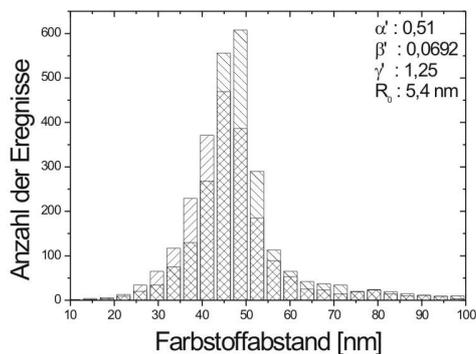


**Abbildung 17** Aktivität von eIF4A Doppelcysteinmutanten **(A)** Vergleich der polyU RNA stimulierten ATPase von eIF4Ay (ausgefüllte orange Quadrate, durchgezogene Linie) mit markiertem und unmarkiertem eIF4Ay Q186C G370C (offene und angekreuzte orange Quadrate, gestrichelte und gepunktete Linie) sowie dessen Stimulierung durch eIF4Gy(572-853) (blaue Dreiecke). Die Cysteine und die Markierung in eIF4Ay Q186C und G370C haben keinen Einfluss auf die ATPase Aktivität. **(B)** Vergleich der Helikaseaktivität von wildtypischem eIF4Am und der Cysteinmutante eIF4Am IAAA R141C T351C. Beide Proteine zeigen dieselbe Helikaseaktivität.

## Cysteinen zur Immobilisierung von Fluoreszenzfarbstoffen

Um die Fluoreszenzfarbstoffe an definierten Positionen an eIF4A zu immobilisieren, wurden gezielt Cysteine in eIF4A eingeführt. Die Auswahl der Positionen für eIF4Am erfolgte anhand eines eIF4Am Homologiemodells (Swiss-Model, Templat: PDB ID 1fuu). Auf dieser Grundlage wurden R141, T138 in der NTD und T351, S320 und E257 in der CTD als oberflächenexponierte Rest identifiziert, deren Positionen möglicherweise die Beobachtung der Domänenbewegung in eIF4Am ermöglichen.

Aufgrund der stark verringerten Löslichkeit der cysteinfreien eIF4Am IAAA Mutanten wurde untersucht, ob die beiden eingeschränkt zugänglichen nativen Cysteine die smFRET Ergebnisse beeinflussen. Dazu wurden die Abstandshistogramme von eIF4Am IAAA T141C R351C und dem deutlich besser löslichen eIF4Am CAAC T141C R351C verglichen (Abbildung 18). Um die Markierung von C66 und C264 zu vermeiden, wurde deren Markierungskinetik (Abbildung 15) ausgenutzt und die Reaktion unmittelbar nach dem Start wieder gestoppt. Die entsprechenden Abstandshistogramme überlagern in einem Peak und wurden im Rahmen der Messgenauigkeit als identisch beurteilt (Abbildung 18). Da die nativen Cysteine C66 und C264 die Aussage von smFRET Experimenten nicht beeinflussen wurden alle weiteren smFRET Mutanten auf Basis von eIF4Am CAAC hergestellt.



**Abbildung 18** Überlagerung der Abstandshistogramme von doppelmarkiertem eIF4Am CAAC T141C R351C (\\) und eIF4A IAAA T141C R351C (/). Beide Mutanten zeigen vergleichbare Abstandshistogramme. Die nativen Cysteine C66 und C264 beeinflussen die Aussage von smFRET Messungen mit doppelmarkiertem eIF4Am nicht.

Für eIF4Ay konnten die Cysteine zur Immobilisierung der FRET Farbstoffe direkt in die Wildtypsequenz eingefügt werden. Hinweise zur Wahl der Positionen kamen aus der Kristallstruktur von eIF4Ay/eIF4Gy(572-853). Um jede Bewegung der Proteindomäne beobachten zu können, wurden die Positionen zur Einführen von nativen Cysteinen gleichmäßig über die Domänenoberfläche verteilt (Abbildung 4). Zur Einführung von Cysteinen zur Immobilisierung von Farbstoffen in eIF4Ay wurden deshalb die Positionen E28, S87, A112 und Q186 in der NTD, sowie T269, E305 und G370 in der CTD ausgewählt.

#### 4. Charakterisierung von eIF4A

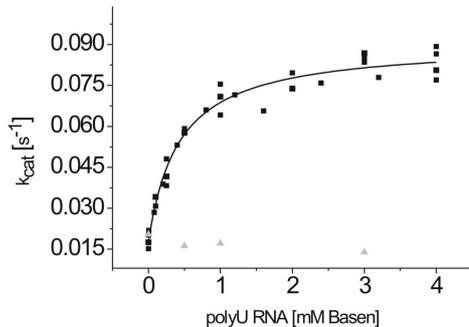
Um den Einfluss von interagierenden Proteinen auf die minimale DEAD Box Helikase eIF4A untersuchen zu können, wurde zunächst die Helikase und ATPase Aktivität sowie die Substratbindung und die Konformation von eIF4A ohne Wechselwirkungspartner charakterisiert.

##### Helikase und ATPase Aktivität von eIF4A

###### eIF4A ist eine RNA stimuliert ATPase

Die Stimulierung von eIF4A erfolgte unspezifisch durch polyU RNA (Abbildung 19, Abbildung 23), da bisher kein spezifisches RNA Substrat für eIF4A bekannt ist. Als Puffer wurden die in der Literatur beschriebenen Puffer A und B (Seite 29, [41]) verwendet. Sowohl eIF4Am als auch eIF4Ay zeigten in Puffer B höhere Aktivität als in Puffer A. Deshalb erfolgte die Charakterisierung der ATPase Aktivität von eIF4Am in Puffer B. Da eIF4Gy(572-853) in Puffer B aber aggregierte, erfolgte die Charakterisierung von eIF4Ay in Puffer A. Deshalb ist ein direkter Vergleich zwischen eIF4Am und

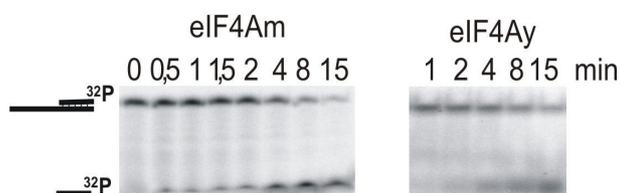
eIF4Ay an dieser Stelle nicht möglich. Selbst in Puffer B erreicht eIF4Am aber nur einen  $k_{cat}$  von  $0,08 \text{ s}^{-1}$  (Abbildung 19). Damit spaltet eIF4Am ATP etwa 25 mal langsamer als YxiN oder HERA [31, 110].



**Abbildung 19** RNA stimulierte ATPase Aktivität von eIF4Am. Die Stimulierung von eIF4Am erfolgte durch polyU RNA in Puffer B (schwarze Vierecke). Der  $k_{cat}$  beträgt  $0,08 \text{ s}^{-1}$  der  $K_M$  ist  $0,5 \text{ mM}$ . polyU RNA ohne eIF4Am (graue Dreiecke) hat selbst bei einer Konzentration von  $3 \text{ mM}$  Basen keinen Einfluss auf die Messung.

### eIF4A entwindet kurze RNA Doppelstränge

Das Markenzeichen der DEAD Box Proteine ist die Entwindung von kurzen RNA Doppelsträngen. Deshalb wurde eIF4A, ergänzend zur Untersuchung der ATPase Eigenschaften, auch anhand seiner Helikaseaktivität charakterisiert (Abbildung 20). Innerhalb von 15 min entwinden eIF4Am und eIF4Ay einen 10/50mer RNA Duplex. Unter gleichen Reaktionsbedingungen waren dazu jedoch eine etwa 10 fach höhere eIF4Ay Konzentrationen nötig. Im direkten Vergleich zwischen eIF4Ay und eIF4m ist dementsprechend eIF4Am die effizientere Helikase. Vergleicht man allerdings eIF4A mit den DEAD Box Proteinen YxiN und HERA, die etwa die 1000 fache Substratmenge in unter 3 min entwinden [31, 110], kann weder eIF4Ay noch eIF4Am als effiziente Helikase bezeichnet werden. Die schwache Helikase und ATPase Aktivität von eIF4A ohne Wechselwirkungspartner diene als Referenz zur Beurteilung von Aktivitätsänderungen durch Mutationen (Abbildung 16, Abbildung 31) oder interagierende Proteine (Abbildung 32).



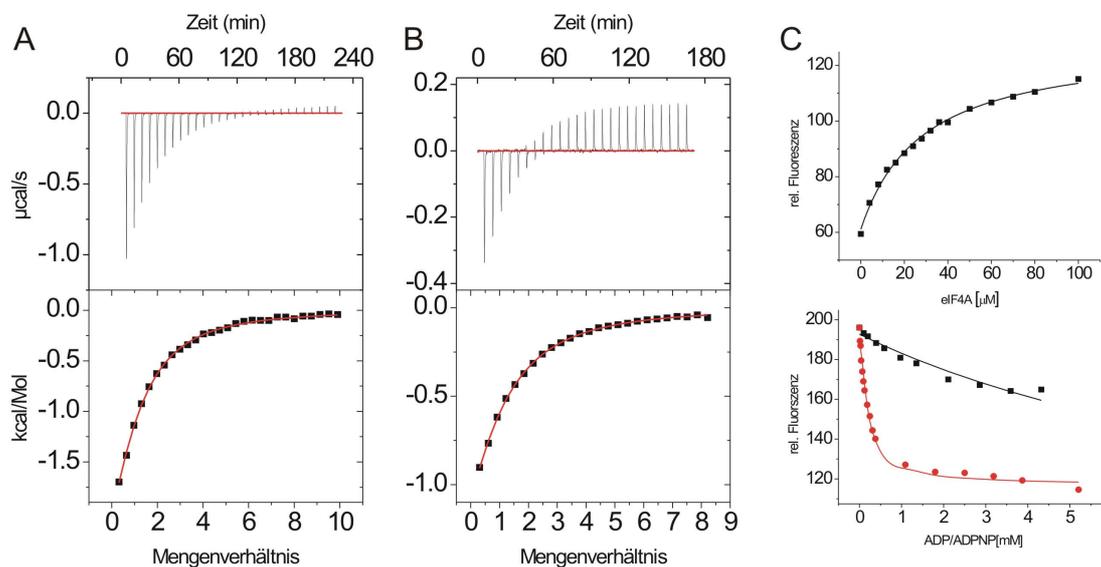
**Abbildung 20** Helikaseaktivität von eIF4Am und eIF4Ay. Während eine Konzentration von  $0,4 \mu\text{M}$  eIF4Am ausreicht um  $2 \text{ nM}$  eines 10/50mer RNA Duplex innerhalb von 15 min zu entwinden waren für einen ähnlichen Effekt  $5 \mu\text{M}$  eIF4Ay notwendig.

## Substrat Bindung an eIF4Ay

Der katalytische Zyklus von eIF4A kann in drei Phasen gegliedert werden: Nukleotid und RNA Bindung, Substrat Umsatz und Freisetzung der Produkte. Die im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Aktivitätstests detektieren die Freisetzung von ADP oder ssRNA mit der Geschwindigkeit des ratenlimitierenden Schritts der Gesamtreaktion. Durch die Aktivitätstests kann die grundsätzliche Beeinflussung des Mechanismus identifiziert werden. Um jedoch zu entscheiden, wie der katalytische Zyklus beeinflusst wird, sind mehr Informationen notwendig. Deshalb wurde die Thermodynamik und Kinetik der Nukleotid- und RNA-Bindung von eIF4Ay untersucht.

### Affinität von ADP und ATP

Die Affinität von eIF4Ay zu ADP und ATP wurde durch kompetitive Titration mit dem fluoreszierenden ADP Analogon (mantADP) und durch isotherme Titrationskalorimetrie bestimmt. Für die ADP Affinität wurde mit beiden Techniken übereinstimmend ein  $K_D$ -Wert um 50  $\mu\text{M}$  ermittelt (Abbildung 21). Hingegen war die direkte Bestimmung der ATP Affinität wegen der ATP Hydrolyse durch eIF4Ay nicht möglich. Unterdrückung der ATP Hydrolyse durch Mutagenese der



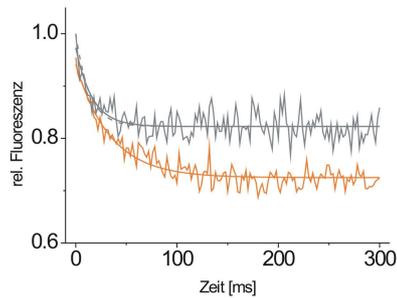
**Abbildung 21** Doppelbestimmung der Nukleotidaffinität von eIF4Ay durch ITC und mantADP Titrations. **(A)** ITC Titration von 57  $\mu\text{M}$  eIF4Ay mit 2,58 mM ADP bei 15°C. Die Daten wurden durch einen  $K_D$ -Wert von 75  $\mu\text{M}$  und einer Stöchiometrie ( $n$ ) von 0,9 beschrieben (rote Linie) **(B)** kompetitive ITC Titration von 56  $\mu\text{M}$  eIF4Ay und 4,8 mM ADPNP mit 2,38 mM ADP bei 15°C. Der apparente  $K_D$ -Wert beträgt 87  $\mu\text{M}$ . Daraus ergibt sich ein  $K_D$ -Wert für ADPNP von etwa 30 mM. **(C)** Bestimmung der ADP und ADPNP Affinität durch kompetitive Verdrängung von mantADP aus der eIF4Ay Nukleotidbindungsstelle. mantADP bindet an eIF4Ay mit einem  $K_D$ -Wert von 30  $\mu\text{M}$  (oben). Aus der Verdrängung durch ADP (rote Kreise) bzw. ADPNP (schwarze Quadrate) ergibt sich eine  $K_D$ -Wert von 28  $\mu\text{M}$  bzw. 6 mM (unten).

Nukleotidbindungstasche (eIF4Ay K72Q, [111]) reduzierte bereits die Affinität von mantADP so stark, dass keine ausreichende Signaländerung zur Bestimmung Nukleotidaffinität erreicht werden konnte. Als Näherung für ATP kam deshalb das nicht hydrolysierbare ATP Analogon ADPNP zum Einsatz. ADPNP bindet nur schwach an eIF4A. Der  $K_D$ -Wert beträgt etwa 6 mM. Die präzise Bestimmung ist bei dieser geringen Affinität jedoch problematisch. Zur vollständigen Verdrängung von mantADP aus dem mantADP/eIF4Ay Komplex müssten ADPNP Konzentrationen von weit über 5 mM eingesetzt werden. Dies übersteigt die Magnesiumkonzentration im Puffer (2,5 mM). Um trotzdem genug Magnesiumionen für die Komplexbildung von ADPNP zur Verfügung zu stellen, wurde die Nukleotidstammkonzentration stöchiometrisch mit  $MgCl_2$  versetzt oder die Magnesiumchlorid Konzentration im Puffer erhöht. Wie die Doppelbestimmung der ADP Affinität wurde die Bestimmung der ADPNP Affinität durch ITC Titrations unabhängig überprüft. Da für den zu erwartenden  $K_D$ -Wert die ADPNP und eIF4Ay Konzentrationen zur direkten Bestimmung in ITC Experimenten nicht experimentell zugänglich waren, wurde die ADPNP Affinität aus apparenten Bindungskonstante der kompetitiven Titration eines eIF4Ay/ADPNP Komplex mit ADP berechnet (Seite 42). Der durch ITC ermittelte  $K_D$ -Wert für ADPNP (etwa 30 mM, Abbildung 21) bestätigt die Größenordnung aus der Fluoreszenztitration (etwa 6 mM). Aufgrund dieser Messungen wird klar, dass der  $K_D$ -Wert von eIF4Ay und ADP etwa 50  $\mu M$  beträgt. Dagegen liegt die Affinität von ADPNP zu eIF4Ay etwa zwei Größenordnungen niedriger.

### **Kinetik der mantADP Freisetzung**

Der  $K_D$ -Wert beschreibt die Gleichgewichtslage eines Systems. Aber auch die Geschwindigkeit, mit der sich das Gleichgewicht eingestellt, beeinflusst den Reaktionsverlauf. Es gibt Hinweise darauf, dass die Freisetzung von ADP und Phosphat die Reaktionsgeschwindigkeit begrenzen [112]. Um die kinetischen Aspekte der Nukleotidbindung an eIF4Ay zu beschreiben, wurde die Dissoziationsrate ( $k_{off}$ ) von mantADP aus dem Komplex mit eIF4Ay in *stopped flow* Messungen bestimmt.

Aufgrund der moderaten mantADP Affinität (Abbildung 21) betrug die Sättigung von mantADP mit eIF4Ay zu Beginn der Messung lediglich 70%. Deshalb führte bereits die Verdünnung mit Puffer in der *stopped flow* Kammer zur Dissoziation des Komplexes (Abbildung 22). Die Kinetik der Intensitätsabnahme wird durch die Kombination der Raten von mantADP Dissoziation ( $k_{off}$ ) und zeitgleichen (Re)Assoziation ( $k_{on}$ ) von mantADP bestimmt. Die selektive Detektion von  $k_{off}$  war durch die Verdünnung mit einem hohen Überschuss ADP möglich. Die Rate der Freisetzung von mantADP ( $k_{off}$ ) beträgt etwa 30  $s^{-1}$  (Abbildung 22).



**Abbildung 22** Kinetik der mantADP Dissoziation von eIF4Ay. Bereits die Verdünnung des eIF4Ay/mantADP Komplex in *stopped flow* Messungen führt zu einer Abnahme der Komplexkonzentration (grau) mit einer Ratenkonstante die sich anteilig aus  $k_{on}$  und  $k_{off}$  zusammensetzt. Die Verdrängung durch einen hohen Überschuss an ADP (orange) erlaubt die direkte Detektion des  $k_{off}$  von mantADP. Er beträgt etwa  $30 \text{ s}^{-1}$ .

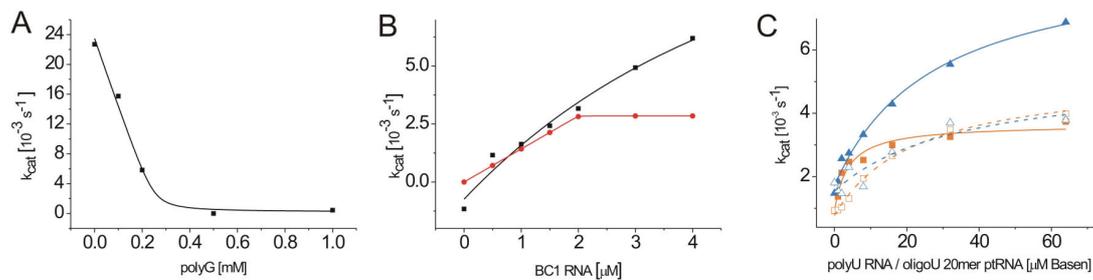
### Affinität von RNA Substraten

eIF4A zeigt nur schwache Affinität zu RNA. Die direkte Bindung eines markierten RNA 10mers konnte in Anisotropietitrationen nicht beobachtet werden. Auch das radioaktiv markierte 10mer aus dem Entwindungstest zeigt in Gegenwart von eIF4Ay und ADPNP kein verändertes Laufverhalten in nativer PAGE. Die einzige Möglichkeit zur Abschätzung der relativen RNA Affinität bestand deshalb im Vergleich der Michaelis Menten Konstanten  $K_M$  aus RNA stimulierten ATPase Tests.

Neben der unspezifischen und schwachen Bindung von polyU RNA enthält die Literatur Hinweise auf RNAs, die mit erhöhter Affinität an eIF4A binden. Es handelt sich um polyG RNA [38], phosphorothioat RNA (ptRNA) [113], ein RNA Aptamer [73] und BC1 RNA [74, 75]. Die Wechselwirkung von polyG, pt und BC1 RNA mit eIF4A wurde indirekt über den Einfluss auf die ATPase Aktivität gezeigt (Abbildung 23).

Die für **polyG RNA** beschriebene Inhibition von polyU stimulierter ATPase konnte experimentell verifiziert werden. Bereits  $200 \mu\text{M}$  polyG inhibieren den stimulierenden Einfluss von  $4 \text{ mM}$  polyU beinahe vollständig (Abbildung 23). Für **BC1 RNA** wurde Stimulation der ATPase beschrieben, während Entwindung *in vitro* [75] und eIF4A abhängige Translation *in vivo* [74] inhibiert wurden. Die Affinität aus BC1 RNA stimulierte ATPase war jedoch geringer als der publizierte Wert von  $0,2 \text{ nM}$  (Abbildung 23). Für den Ersatz eines nichtverbrückenden Sauerstoffs im Ribose Phosphat Rückgrat von RNA durch Schwefel (**ptRNA**) wurde eine 50 fach erhöhte Affinität für eIF4A berichtet [113]. Im direkten Vergleich eines U20 ptRNA Oligos mit polyU RNA wies polyU RNA zwar die höhere apparente Affinität auf (Abbildung 23), der direkte Vergleich ist aber aufgrund der unterschiedlichen Substratlänge nur bedingt aussagekräftig. Bei gleicher Substratlänge ist eine deutlich erhöhte ptRNA Affinität zu erwarten.

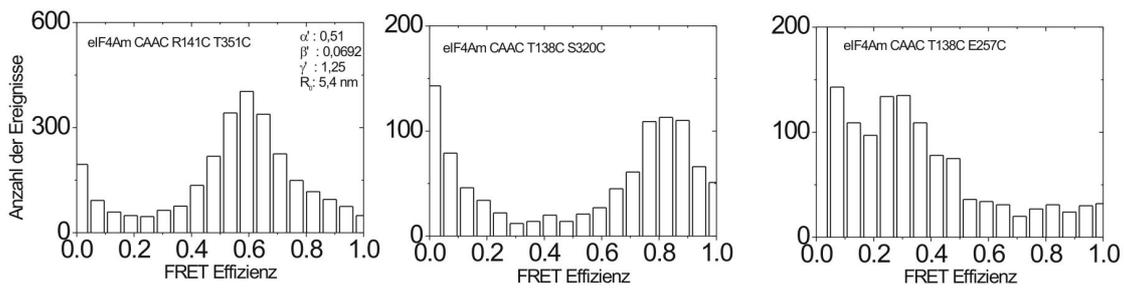
Für alle drei getesteten RNAs wurde ein Effekt auf die ATPase Aktivität, und damit indirekt die Wechselwirkung mit eIF4A, gezeigt. Obwohl teilweise nicht die erwartete Affinität beobachtet werden konnte, wurde der Einfluss dieser RNAs auf die Konformation von eIF4A überprüft (Seite 80).



**Abbildung 23** Abschätzung der RNA Affinität anhand des Einfluss auf RNA stimulierte ATP Hydrolyse Tests. **(A)** Inhibition der durch 4 mM polyU RNA stimulierten eIF4Am Aktivität durch polyG RNA. Die exemplarische Beschreibung durch ein einfaches Bindungsmodell liefert einen  $K_D$  von etwa 4  $\mu M$ . **(B)** Vergleich der experimentell ermittelten Stimulierung der ATPase Aktivität von eIF4Am durch BC1 RNA (schwarz) im Vergleich mit der Komplexbildung von 2  $\mu M$  eIF4Am mit BC1 RNA und dem beschriebenen  $K_D$  von 0,2 nM. Der Verlauf der experimentellen Daten zeigt funktionelle Interaktion zwischen eIF4Am und BC1 RNA, bestätigt den  $K_D$  von 0,2 nM aber nicht. **(C)** Vergleich der Stimulierung der ATPase von eIF4Ay durch polyU RNA und oligoU 20mer ptRNA. Bei Stimulierung der ATPase von eIF4Ay durch ptRNA ist keine zusätzliche Stimulierung durch eIF4Gy(572-853) zu erkennen. Möglicherweise ist das oligoU 20mer zu kurz um eIF4Ay/Gy(572-853) effizient zu stimulieren. Auch der im Vergleich zu polyU RNA erhöhte  $K_M$ -Wert ist voraussichtlich Folge der Länge der ptRNA.

## Die Konformation von eIF4A in Lösung

Wie Abbildung 2 veranschaulicht zeigen die Kristallstrukturen von DEAD Box Proteinen die beiden Kerndomänen in einer Vielzahl von unterschiedlichen Orientierungen. Nur für das DEAD Box Protein YxiN stehen bisher Strukturinformationen über die Konformation der Domänen in Lösung zur Verfügung [114, 31]. Für YxiN ist ein Vergleich mit einer Kristallstruktur nicht möglich, da die entsprechende Kristallstruktur nicht bestimmt wurde. Es ist deshalb nicht abschliessend geklärt, ob die Kristallstrukturen des Helikasekerns einer definierten Konformation in Lösung entsprechen, oder ob die vielen verschiedenen Konformationen Momentaufnahmen der durch den Proteinlinker vermittelten freien Beweglichkeit der Domänen in Lösung entsprechen. Durch Einzelmolekül Förster Resonanz Energie Transfer (smFRET) Experimente wurden deshalb die intermolekularen Domänenabstände für eIF4Ay und eIF4Am in Lösung bestimmt um die Konformation von eIF4A in Lösung zu beschreiben.



**Abbildung 24** smFRET Histogramme von doppelmarkiertem eIF4Am R141C T351C, eIF4Am T138C S320C und eIF4Am T138C E257C. Für alle Mutanten wurden die Korrekturparameter für eIF4A CAAC R141C T351C verwendet. Die gemessenen FRET Effizienzen entsprechen etwa einen Farbstoffabstand von 5; 4,2 und 6,3 nm.

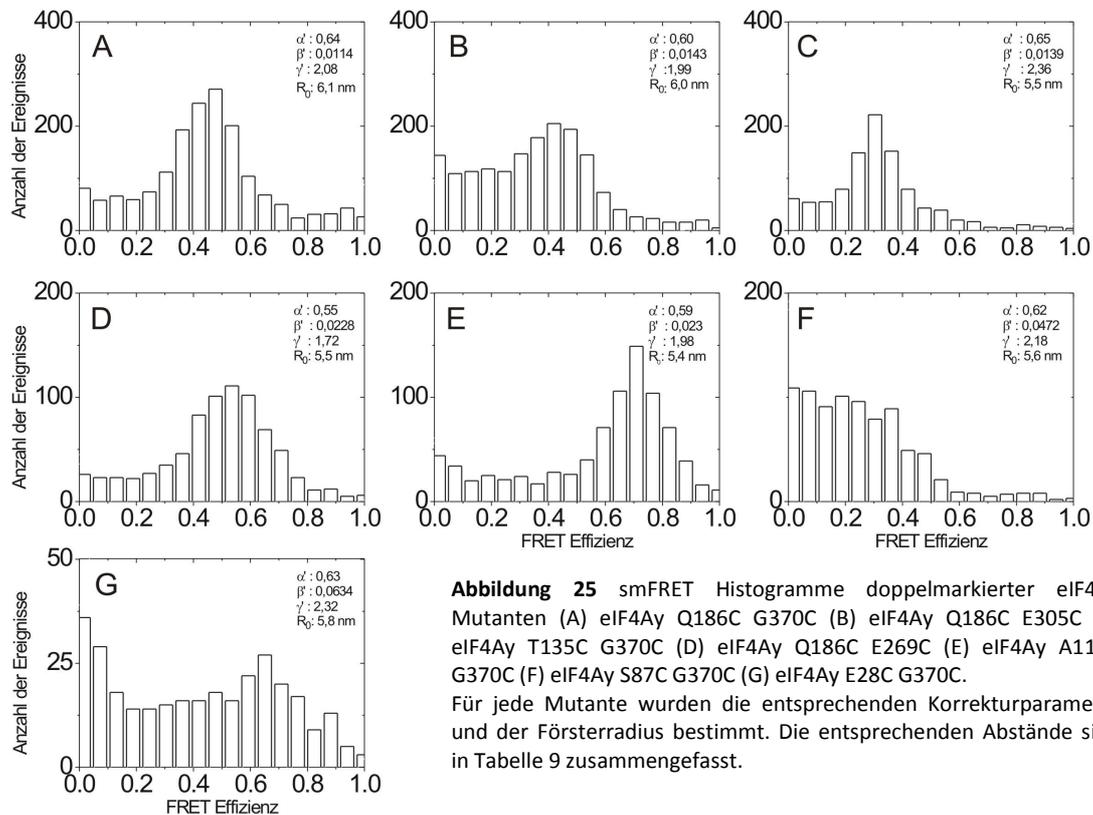
### Die Konformation von eIF4Am

Die Konformation von eIF4Am in Lösung wurde durch drei verschiedene smFRET Konstrukte charakterisiert (eIF4Am CAAC R141C T351C; T138C S320C und T138C E257C, Abbildung 24). Der angegebene Abstand wurde anhand der experimentell bestimmten Korrekturparameter für eIF4Am CAAC R141C T351C aus dem Maximum der FRET Effizienz abgeschätzt. Ziel der eIF4Am FRET Mutanten war es, Konformationsänderungen in eIF4A während des katalytischen Zyklus zu beobachten. Die in Abbildung 24 gezeigten smFRET Mutanten decken mit einer niedrigen (0,3), mittleren (0,6) oder hohen (0,8) FRET Effizienz das gesamte Spektrum der Energietransfereffizienzen ab. Dadurch kann durch die Wahl der Mutante die Sensitivität des Energietransfers der erwarteten Bewegung angepasst werden (Abbildung 7).

### Die Konformation von eIF4Ay

Abbildung 25 zeigt die Histogramme der FRET-Effizienz von sieben Donor/Akzeptor markierten eIF4Ay Mutanten. Für jedes Konstrukt wurden die Korrekturparameter  $\alpha'$ ,  $\beta'$  und  $\gamma'$  sowie der Försterabstand  $R_0$  separat bestimmt, um den Einfluss der Proteinumgebung auf die Farbstoffe zu berücksichtigen. Alle Histogramme zeigen ein definiertes Maximum der FRET Effizienz. Das bedeutet, dass eIF4Ay bereits ohne Wechselwirkungspartner eine definierte Konformation einnimmt. Die absoluten Farbstoffabstände wurden durch den *Fit* der entsprechenden Abstandshistogramme mit einer Gaußkurve ermittelt (Tabelle 9). Diese Abstände entsprechen der Entfernung zwischen Donor- und Akzeptorfarbstoff. Je nach Orientierung der Seitenketten und dementsprechend der immobilisierten Farbstoffe kann der Abstand der entsprechenden  $C_\alpha$  Position größer oder kleiner sein. Dieses Verhalten erschwert die direkte Rekonstruktion der Domänenanordnung von eIF4Ay. Mithilfe der Farbstoffabstände von eIF4Ay im Komplex mit eIF4Gy(572-853) (Abbildung 35) können aber die relativen Abstandsänderungen zwischen eIF4Ay

und eIF4Ay/Gy(572-853) ermittelt werden. Diese sind zumindest teilweise um den Einfluss der Linker und Seitenketten Orientierung korrigiert. Die Rekonstruktion von eIF4Ay in Lösung erfolgte deshalb relativ zur Kristallstruktur von eIF4Ay/Gy(572-853) (Abbildung 37).



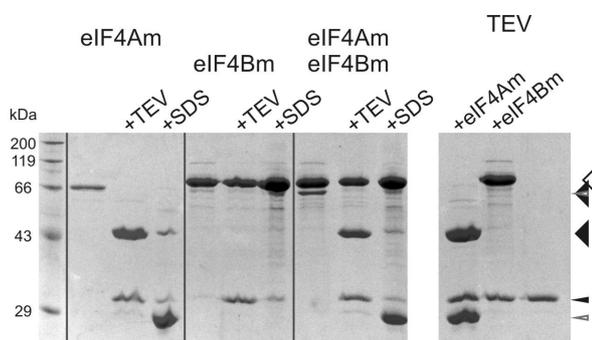
### Die Konformation von eIF4A mit Substrat in Lösung

Während der Hydrolyse von ATP bleiben DEAD Box Helikasen in der geschlossenen Konformation [34]. Die Bildung des geschlossenen eIF4A/Nukleotid/RNA Komplex stellt daher einen wichtigen Schritt im katalytischen Zyklus der DEAD Box Proteine dar. RNAs, für die in ATPase und Entwindungstest Interaktion mit eIF4A nachgewiesen wurde (10mer, 10mer/50mer, polyU, polyG, BC1 RNA und oligoU 20mer ptRNA), wurden deshalb in smFRET Experimenten auf ihren Einfluss auf die Konformation von eIF4A untersucht. Neben ATP und ADPNP wurde zu diesem Zweck das ATP Übergangsanalogon ADP-BeF<sub>x</sub> verwendet. Es ermöglicht die Entwindung von dsRNA [33] und stabilisiert den Helikasekern gleichzeitig in der geschlossenen Konformation [34]. Ein geschlossener Komplex konnte aber nicht populiert werden. Allerdings sind die Substratkonzentrationen in smFRET Experimenten limitiert, da die Substrate das Signal zu Rausch Verhältnis verschlechtern. Möglicherweise war die Substratkonzentration nicht ausreichend, um die geschlossene Konformation zu populieren.

Im vorangegangenen Abschnitt wurde das Verhalten von wildtyp eIF4A charakterisiert. Die nachfolgenden Abschnitte beschreiben den Einfluss von eIF4Bm und eIF4Gy(572-853) auf eIF4A.

## 5. Einfluss von eIF4Bm auf eIF4Am

eIF4B stimuliert die ATPase- und Helikaseaktivität von eIF4A [68]. Zur direkten Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen gibt es aber widersprüchliche Angaben [65, 40]. Deshalb wurde zuerst die Wechselwirkung zwischen eIF4Am und eIF4Bm untersucht. In analytischer SEC konnte keine Interaktion zwischen beiden Proteinen beobachtet werden. Durch die Immobilisierung von eIF4Am-GST an GSH Säulenmaterial konnte die Wechselwirkung in Gegenwart von RNA und Nukleotiden getestet werden (Abbildung 26). Unter keiner der getesteten Bedingungen konnte spezifische Wechselwirkung zwischen eIF4Am und eIF4Bm detektiert werden, da eIF4Bm aufgrund seiner Aggregationsanfälligkeit unspezifisch in jeder Fraktion nachzuweisen war. Auch erhöhte Salzkonzentrationen und intensives Waschen konnten die unspezifische Bindung von eIF4Bm an das Säulenmaterial nicht verhindern. Bevor weitere Experimente zur Wechselwirkung zwischen eIF4Am und eIF4Bm sinnvoll sind, muss die Stabilität von eIF4Bm verbessert werden.



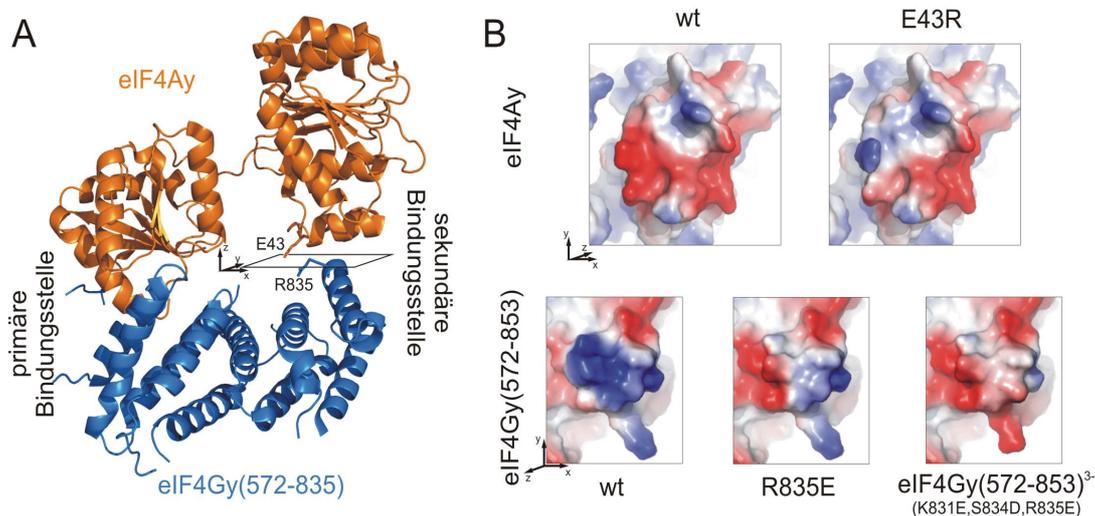
**Abbildung 26** Wechselwirkung von eIF4Am und eIF4Bm in GSH-PullDown Experimenten. eIF4Am-GST wurde an GSH-Sepharose gebunden. eIF4Am wurde selektiv durch Abspaltung des GST Tags eluiert. Anschließend erfolgte unspezifische Elution durch kochen in 1x SDS Puffer. Da eIF4Bm unspezifisch an das GSH-Säulenmaterial bindet, und selbst nach intensiven waschen durch TEV Protease eluiert wurde konnte, kann keine Aussage über spezifische Wechselwirkung zwischen eIF4A und eIF4B getroffen werden. eIF4Bm (offenes Dreieck), eIF4Am (geschlossenes Dreieck), TEV Protease (geschlossener Pfeil), GST-Tag (offener Pfeil)

## 6. Einfluss von eIF4Gy(572-853) auf eIF4Ay

Die Wechselwirkung zwischen eIF4A und der mittleren Domäne von eIF4G ist essentiell für die CAP abhängige Translations Initiation [44]. Die ATPase- und Helikaseaktivität von eIF4A wird durch eIF4G deutlich stimuliert [68]. Wie eIF4G Einfluss auf die Aktivität von eIF4A nimmt, ist allerdings nur schlecht verstanden. Deshalb wurde die Interaktion und Beeinflussung von eIF4Ay durch die HEAT1 Domäne aus eIF4Gy (eIF4Gy(572-853)) untersucht.

Im Gegensatz zur eIF4A/B Wechselwirkung wurde die Interaktion zwischen eIF4A und der mittleren Domäne von eIF4G unter anderem durch NMR und Ultrazentrifugation belegt [42, 115]. Sogar die Kristallstruktur von eIF4Ay im Komplex mit eIF4Gy(572-853) wurde bestimmt [83]. Dabei wurden zwei Kontaktflächen zwischen eIF4Ay und eIF4Gy(572-853) identifiziert (Abbildung 27). Um besonders die Bedeutung der Kontaktfläche zwischen der NTD von eIF4Ay und der CTD von eIF4Gy(572-853) zu untersuchen, wurden Lysin 831, Serin 834 und Arginin 835 aus eIF4Gy(572-853) zu Glutamat, Aspartat und Glutamat ausgetauscht (eIF4Gy(572-853) K831E S834D R835E oder eIF4Gy(572-853)<sup>3-</sup> (Abbildung 27). Die dadurch eingeführten negativen Ladungen neutralisieren bzw. invertieren die Oberflächenladung von eIF4Gy(572-853) in dieser Region. Zusätzlich wird die Salzbrücke zwischen Arginin 835 und Glutamat 43 aus dem Q Motiv von eIF4Ay zerstört. Die Bedeutung dieser Salzbrücke wurde durch die Mutanten eIF4Gy(572-853) R835E und eIF4Ay E43R separat untersucht. Die wildtypische Faltung der eIF4Gy(572-853) Mutanten wurde durch CD Spektroskopie nachgewiesen.

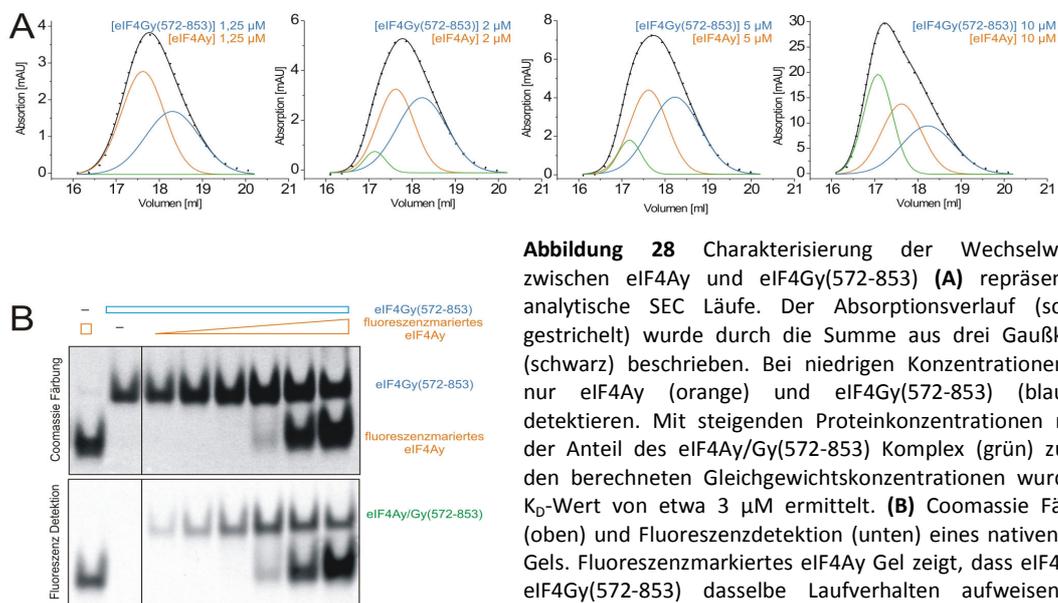
Dieser Abschnitt beschreibt die Charakterisierung der Wechselwirkung von eIF4Ay und eIF4Gy(572-853) im Allgemeinen und im Speziellen die der beiden Interaktionsflächen. Weiter wurde der Einfluss von eIF4Gy(572-853) auf die Nukleotidaffinität sowie die Helikase und ATPase Aktivität von eIF4Ay untersucht. Abschließend wurde die Konformation von eIF4Ay in Gegenwart von eIF4Gy(572-853) in smFRET Experimenten untersucht.



**Abbildung 27 (A)** Primäre und sekundäre Bindungsstelle im eIF4Ay/Gy(572-853) Komplex. Die Benennung erfolgte aufgrund der Destabilisierung der Kontaktflächen durch Erhöhung der Salzkonzentration (**Abbildung 30**) **(B)** Oberflächenladung in eIF4Ay und eIF4Gy(572-853) (pdb ID 2vso) bzw. der entsprechenden SwissModel Homologiemodelle der Mutanten. Die Berechnung der Oberflächenladung erfolgte durch pymol. Die Verteilung der Oberflächenladung deutet auf die Wechselwirkung von geladenen Resten in der sekundären Bindungsstelle hin. Die Mutationen beeinflussen die Ladungsverteilung deutlich. Es ist deshalb davon auszugehen, dass sie die Wechselwirkung in der sekundären Bindungsstelle deutlich schwächen oder komplett verhindern.

## Wechselwirkung zwischen eIF4Ay und eIF4Gy(572-853)

Die Wechselwirkung von eIF4Ay mit eIF4Gy(572-853) kann anhand **nativer PAGE** nachgewiesen, aber nicht quantifiziert werden. eIF4Ay und eIF4Gy(572-853) zeigen unterschiedliche Laufeigenschaften und sind einfach zu zuordnen (Abbildung 28). Der eIF4A/Gy(572-853) Komplex konnte allerdings erst durch die Fluoreszenzmarkierung von eIF4Ay identifiziert werden. eIF4Gy(572-853) und eIF4Ay/Gy(572-853) zeigen dasselbe Laufverhalten in nativer PAGE und können deshalb nicht unabhängig voneinander quantifiziert werden. Auch **analytische SEC** ermöglicht keine vollständige Trennung der drei Komponenten. Allerdings konnten durch den *Fit* des Absorptionsverlauf mit drei Gaußkurven eIF4Ay, eIF4Gy(572-853) und der Komplex quantifiziert werden. Auf diesem Wege wurden die Gleichgewichtskonzentrationen für verschiedene Stoffmengen ermittelt (Abbildung 28). Im Mittel ergibt sich aus den SEC Läufen ein  $K_D$ -Wert für die Wechselwirkung zwischen eIF4Ay und eIF4Gy(572-853) von etwa 3  $\mu\text{M}$ . Die Quantifizierung der SEC Daten beinhaltet jedoch einen systematischen Fehler, da eine Gaußkurve das Elutionsprofil von eIF4Ay und eIF4Gy(572-853) nur ungenügend beschreibt.

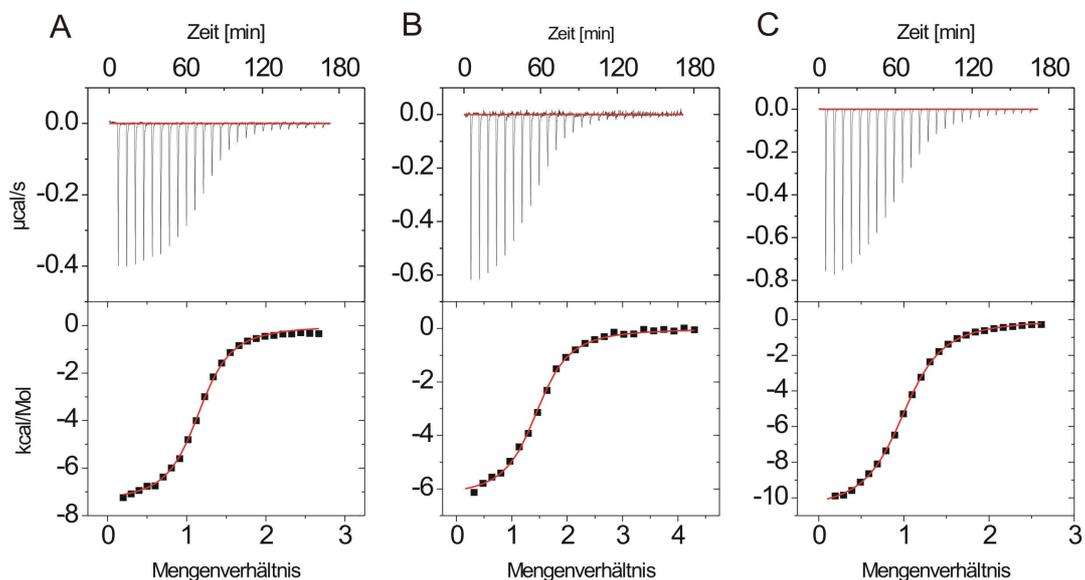


**Abbildung 28** Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen eIF4Ay und eIF4Gy(572-853) **(A)** repräsentative analytische SEC Läufe. Der Absorptionsverlauf (schwarz gestrichelt) wurde durch die Summe aus drei Gaußkurven (schwarz) beschrieben. Bei niedrigen Konzentrationen sind nur eIF4Ay (orange) und eIF4Gy(572-853) (blau) zu detektieren. Mit steigenden Proteinkonzentrationen nimmt der Anteil des eIF4Ay/Gy(572-853) Komplex (grün) zu. Aus den berechneten Gleichgewichtskonzentrationen wurde ein  $K_D$ -Wert von etwa 3  $\mu\text{M}$  ermittelt. **(B)** Coomassie Färbung (oben) und Fluoreszenzdetektion (unten) eines nativen PAGE Gels. Fluoreszenzmarkiertes eIF4Ay Gel zeigt, dass eIF4A und eIF4Gy(572-853) dasselbe Laufverhalten aufweisen. Die Konzentration von eIF4Gy(572-853) beträgt 15  $\mu\text{M}$ . Die Konzentration von eIF4Ay G370C-A546 startet mit 1,5  $\mu\text{M}$  und wurde von Bahn zu Bahn verdoppelt. die Stöchiometrie des eIF4Ay/Gy(572-853) Komplex kann zu 1 abgeschätzt werden.

In der Kristallstruktur von eIF4Ay und eIF4Gy(572-853) wurde sichtbar, dass das W579 von eIF4Gy an der Komplexbildung mit eIF4Ay beteiligt ist [83]. Deshalb wurde versucht, die Komplexbildung anhand der Änderung in der Tryptophanfluoreszenzintensität zu verfolgen. Aufgrund der eingeschränkten Stabilität von eIF4Gy(572-853) konnte aber kein konstantes Startsignal sichergestellt werden. Auch Versuche, das Signal zwischen exponierten und versteckten Tryptophanen durch Quencher im Puffer zu verbessern, brachten keinen Erfolg.

Die Messung des  $K_D$ -Wert für die Wechselwirkung zwischen eIF4Ay und eIF4Gy(572-853) erfolgte schlussendlich durch isotherme Titrations Kalorimetrie (ITC). Alle ITC Messungen wurden bei 15°C durchgeführt, da bei 25°C keine konstante Basislinie erreicht werden konnte. Die Sprünge in der ITC Basislinie sind wahrscheinlich auf Proteinaggregation zurückzuführen. Wie aus der Kristallstruktur zu erwarten [83], formen eIF4Ay und eIF4Gy(572-853) einen 1:1 Komplex. Der  $K_D$ -Wert beträgt 0,6  $\mu\text{M}$  (Abbildung 29).

Die Zerstörung der Salzbrücke und die Inversion der Oberflächenladung in einer der intermolekularen Kontaktflächen durch eIF4Gy(572-853) R835E und eIF4Gy(572-853)<sup>3-</sup> (Abbildung 27) erhöhten die Dissoziationskonstante nur minimal (Abbildung 29). ITC eignete sich hier hervorragend zur Charakterisierung der Proteinwechselwirkung.

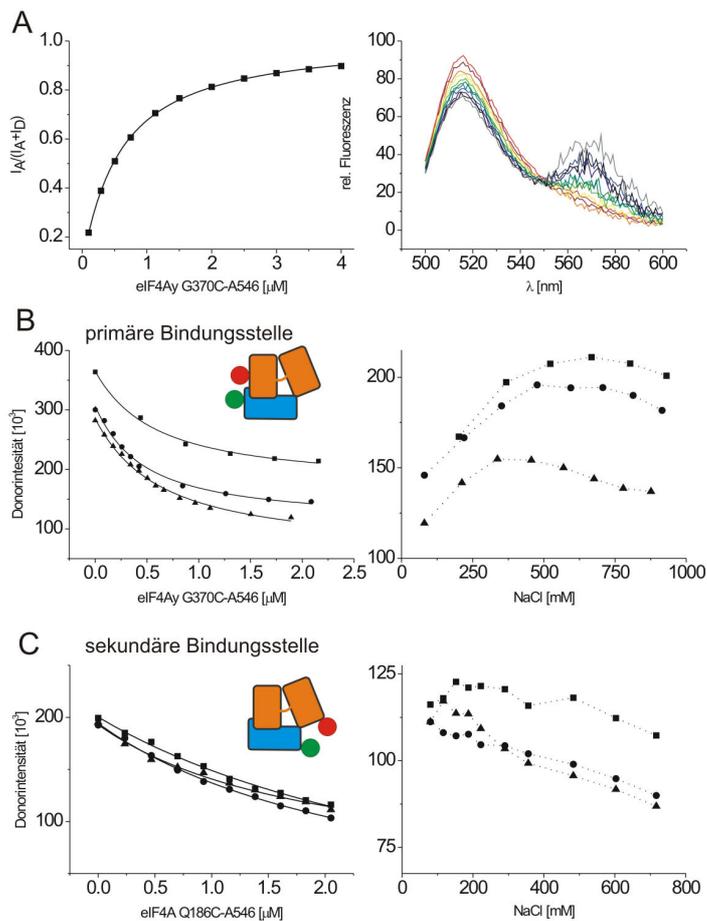


**Abbildung 29** Charakterisierung der Wechselwirkung von eIF4Ay und eIF4Gy(572-853) durch ITC. **(A)** Die Titration von 16  $\mu\text{M}$  eIF4Gy(572-853) mit 205  $\mu\text{M}$  eIF4Ay kann durch einen  $K_D$ -Wert von 0,6  $\mu\text{M}$  beschrieben werden **(B)** Die Titration von 15  $\mu\text{M}$  eIF4Gy(572-853) R835E mit 202  $\mu\text{M}$  eIF4Ay kann durch einen  $K_D$ -Wert von 1,0  $\mu\text{M}$  beschrieben werden **(C)** Die Titration von 20  $\mu\text{M}$  eIF4Gy(572-853) mit 272  $\mu\text{M}$  eIF4Ay kann durch einen  $K_D$ -Wert von 1,1  $\mu\text{M}$  beschrieben werden.

Der Einsatz von ITC Experimenten war jedoch durch den enormen Proteinbedarf und die lange Messdauer limitiert. Deshalb wurde als alternative Technik die Bestimmung der Wechselwirkung über Ensemble FRET Titrations etabliert (Abbildung 30).

Zur Beobachtung der Komplexbildung durch FRET wurden die Einzylcysteinmutanten eIF4Gy(572-853) W638C und eIF4Ay G370C jeweils mit Donor bzw. Akzeptorfarbstoff markiert. In der Kristallstruktur haben diese Positionen einen Abstand von etwa 5 nm, sodass erwartet wurde, dass die Komplexbildung der markierten Komponenten zum Energietransfer zwischen eIF4Gy(572-853) und eIF4Ay führt. Wie erwartet, führte die Titration von donormarkiertem eIF4Gy(572-853) W638C mit steigenden Mengen akzeptormarkiertem eIF4Ay G370C zur Abnahme der Donorfluoreszenzintensität und Zunahme der Akzeptorfluoreszenzintensität (Abbildung 30). Die Messung bei 15°C bestätigte die durch ITC bestimmte Affinität (Abbildung 29, Abbildung 30). Ausserdem konnte in Ensemble FRET Titrations gezeigt werden, dass die Bindung von 15 bis 37°C mit derselben Dissoziationskonstante beschrieben werden kann (Abbildung 30). Erfolgte die Platzierung der Farbstoffe gezielt an der Kontaktfläche zwischen eIF4Ay-CTD (G370C) und eIF4Gy(572-853)-NTD (N577C), konnten sie als lokale Sonde für den Zustand dieser Bindungsstelle bei steigenden Salzkonzentrationen verwendet werden (Abbildung 30). Die Erhöhung der Salzkonzentration schwächt elektrostatische Wechselwirkung. Deshalb wurde für die Erhöhung der Salzkonzentration die Dissoziation der Proteine und dadurch die die Abnahme der Transfereffizienz, bzw. Zunahme der Donorintensität erwartet. Diese Erwartung wurde bestätigt. Die Donorintensität stieg mit Erhöhung der Salzkonzentrationen. Allerdings nahm die Donorfluoreszenzintensität bei weiterer Erhöhung der Salzkonzentration linear ab, anstatt sich einem konstanten Wert anzunähern. Verdünnung und Effekte der Salzkonzentration auf die Farbstoffe wurden bereits berücksichtigt. Trotzdem ist der Anstieg zu Beginn der Titration ein deutliches Zeichen für die Dissoziation des Kontakt zwischen eIF4Ay-CTD und eIF4Gy(572-853)-NTD. Die lineare Abnahme wurde auf Instabilität von eIF4Gy(572-853) zurückgeführt.

Wie die Kontaktfläche zwischen eIF4Ay-CTD und eIF4Gy(572-853)-NTD wurde auch die zweite Bindungsstelle (eIF4Gy(572-853) I841C und eIF4Ay Q186C) markiert und dessen Stabilität bestimmt (Abbildung 30). Interpretiert man die Position der maximalen Donorintensität bei der Erhöhung der Salzkonzentration als Mass für die Stabilität der entsprechenden Bindungsstelle, ist die Wechselwirkung zwischen eIF4Ay-NTD und eIF4Gy(572-853)-CTD deutlich schwächer als die Wechselwirkung zwischen eIF4Ay-CTD und eIF4Gy(572-853)-NTD.



**Abbildung 30 (A)** Ensemble FRET Titration von 100 nM eIF4Gy(572-853) W638C-A488 mit eIF4Ay G370C-A546. Die relative Zunahme der Akzeptorfluoreszenzintensität kann durch einen  $K_D$ -Wert von 0,54  $\mu$ M beschrieben werden. Rechts sind die um die direkte Anregung korrigierten Spektren der Titration gezeigt **(B)** Bestimmung der Stabilität der primären Bindungsstelle durch die Titration von 1  $\mu$ M eIF4Gy(572-853) N577C-A488 mit eIF4Ay G370C-A546 (rechts) und dessen Destabilisierung durch NaCl bei 15 (Dreieck), 25 (Kreis) und 37°C (Quadrat) (links). Die Abnahme der Donorintensität kann bei allen Temperaturen durch einen  $K_D$ -Wert von 0,6  $\mu$ M beschrieben werden (rechts). Die Zunahme der Donorintensität bei Erhöhung der NaCl Konzentration wird durch die Dissoziation der primären Bindungsstelle verursacht. Bei etwa 500 mM steigt die Donorintensität nicht weiter an. **(C)** Bestimmung der Stabilität der sekundären Bindungsstelle durch Titration von 1  $\mu$ M eIF4Gy(572-853) I841C-A488 mit eIF4Ay Q186C-A546. Analog zu (B). Die sekundäre Bindungsstelle wird bereits durch NaCl Konzentrationen unter 200 mM gestört.

Anhand der Interpretation der Ensemble FRET Experimente und der Ergebnisse der ITC Titration (Abbildung 29) wird der Kontakt zwischen eIF4Ay-NTD und eIF4Gy(572-853)-CTD als sekundäre Bindungsstelle und die eIF4Ay-CTD/eIF4Gy(572-853)-NTD Wechselwirkung als primäre Bindungsstelle bezeichnet.

Zusammenfassend kann die Wechselwirkung zwischen eIF4Ay und eIF4Gy(572-853) im Temperaturbereich von 15-37°C durch einen  $K_D$ -Wert von 0,6  $\mu$ M beschrieben werden. Dabei wird die Bindung durch die primäre Bindungsstelle dominiert, da die Mutagenese der sekundären Bindungsstelle nur einen geringen Einfluss auf die Gesamtstabilität des Komplexes hatte.

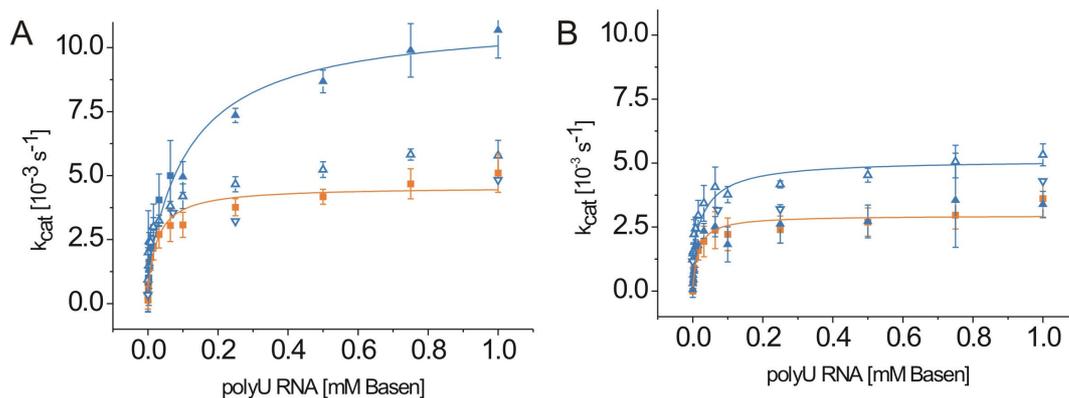
## Helikase und ATPase Aktivität des eIF4Ay/Gy(572-853) Komplex

Nach der Charakterisierung der Wechselwirkung von eIF4Ay und eIF4Gy(572-853) stellt sich die Frage, welchen Einfluss eIF4Gy(572-853) auf die Aktivität von eIF4Ay hat und welche Rolle primäre und sekundäre Bindungsstelle bei der Regulation der eIF4A Aktivität durch eIF4G spielen. Dazu wurden die ATPase- und Helikaseaktivität von eIF4Ay in Gegenwart von eIF4Gy(572-853) und den entsprechenden Mutanten untersucht.

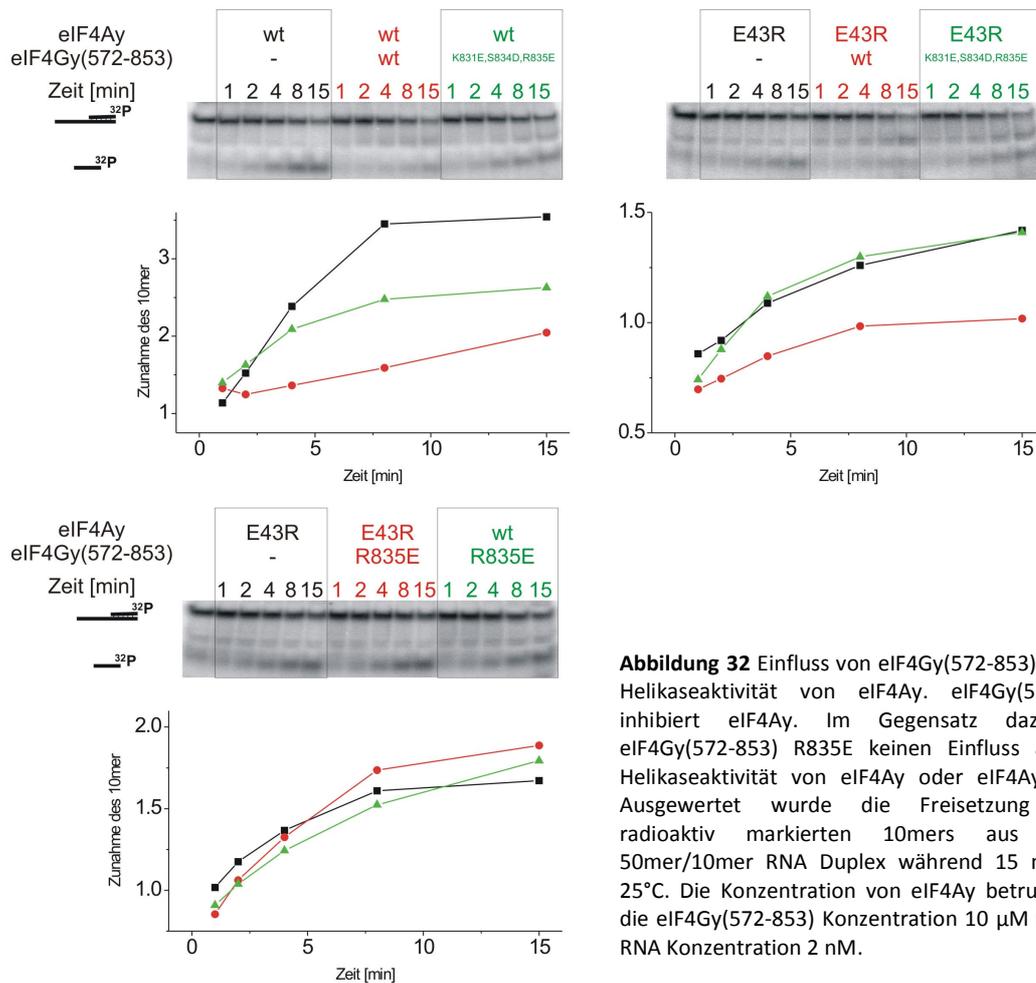
### ATPase Aktivität

Die ATPase von eIF4Ay wurde durch eIF4Gy(572-853) 2,5 fach stimuliert (Abbildung 31,  $v_{\max \text{ eIF4A}} = 0,004 \text{ s}^{-1}$ ;  $v_{\max \text{ eIF4A/G}} = 0,010 \text{ s}^{-1}$ ). Zeitgleich erhöhte sich der  $K_M$ -Wert für polyU um einen ähnlichen Faktor ( $K_M \text{ eIF4A} = 30 \mu\text{M}$ ;  $K_M \text{ eIF4A/G} = 125 \mu\text{M}$ ). Bereits durch den Aminosäureaustausch in eIF4Gy R835E ist keiner dieser Effekte mehr zu beobachten. Dementsprechend zeigte auch eIF4Gy<sup>3-</sup> keinen Einfluss auf die eIF4Ay ATPase Aktivität.

Im Vergleich zu wildtyp eIF4Ay ist die Aktivität von eIF4Ay E43R etwas reduziert (Abbildung 31). Es wurde keine Stimulierung durch eIF4Gy(572-853) festgestellt. Im Gegensatz dazu verursachte eIF4Gy R835E eine Verdopplung des  $v_{\max}$  und eine leichte Erhöhung des  $K_M$ . Es handelt es sich dabei aber nur um sehr kleine Effekte, die sich nur leicht vom Hintergrund abheben. eIF4Gy(572-853)<sup>3-</sup> zeigte keinen Einfluss auf die ATPase Aktivität von eIF4Ay E43R.



**Abbildung 31** polyU RNA stimulierte ATPase Aktivität von eIF4Ay und eIF4Gy(572-853) **(A)** Die maximale Geschwindigkeit der ATP Hydrolyse durch eIF4Ay (orange Quadrate) wird durch eIF4Gy(572-853) (blaue Dreiecke) um den Faktor 2,5 erhöht. Die Mutationen der sekundären Bindungsstelle durch eIF4Gy(572-853) R835E (blaue offene Dreiecke, Spitze oben) und <sup>3-</sup> (Spitze unten) zeigen keinen Einfluss auf die ATP Hydrolyse Geschwindigkeit. **(B)** eIF4Ay E43R (orange Quadrate) zeigt Stimulierung durch eIF4Gy(572-853) R835E (blaue offene Dreiecke, Spitze oben) aber nicht durch eIF4Gy(572-853)<sup>3-</sup> (blaue offene Dreiecke, Spitze unten) oder wildtyp eIF4Gy(572-853) (blaue Dreiecke). eIF4Ay E43R enthielt die Cysteine Q186 G370C zur Immobilisierung der FRET Farbstoffe.



**Abbildung 32** Einfluss von eIF4Gy(572-853) auf die Helikaseaktivität von eIF4Ay. eIF4Gy(572-853) inhibiert eIF4Ay. Im Gegensatz dazu hat eIF4Gy(572-853) R835E keinen Einfluss auf die Helikaseaktivität von eIF4Ay oder eIF4Ay E43R. Ausgewertet wurde die Freisetzung eines radioaktiv markierten 10mers aus einem 50mer/10mer RNA Duplex während 15 min bei 25°C. Die Konzentration von eIF4Ay betrug 5µM, die eIF4Gy(572-853) Konzentration 10 µM und die RNA Konzentration 2 nM.

### Helikaseaktivität

Überraschenderweise ergab die Untersuchung der Helikaseaktivität, dass ein kurzer RNA Duplex von eIF4Ay in Gegenwart von eIF4Gy(572-853) langsamer entwunden wurde (Abbildung 32). Dieser inhibierende Effekt steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der ATPase Aktivität, wurde aber in vier unabhängigen Experimenten reproduziert. eIF4Gy(572-853)<sup>3-</sup> oder eIF4Gy(572-853) R835E beeinflussen die Entwindung deutlich weniger (Abbildung 32). Auch die Entwindungsaktivität von eIF4Ay E43R wird durch eIF4Gy(572-853) geschwächt. Vergleichbar mit der Beobachtung von wildtyp eIF4Ay zeigten weder eIF4Gy(572-853) R835E noch eIF4Gy(572-853)<sup>3-</sup> einen Einfluss auf die Helikaseaktivität von eIF4Ay E43R (Abbildung 32).

Während eIF4Gy(572-853) auf die ATPase Aktivität von eIF4Ay stimulierend wirkte, verursachte es die Inhibition von eIF4Ay im Entwindungstest. Mutationen in der sekundären Bindungsstelle zerstören die Stimulation der ATPase und schwächen den inhibierenden Effekt im Entwindungstest deutlich. Im Allgemeinen ist die Aktivität von eIF4Ay aber sehr gering, und auch bei der Änderung der Aktivität handelt es sich teilweise um sehr kleine Effekte. Dies gilt besonders für Messungen mit eIF4Ay E43R, für das eine Stimulierung der ATPase ausschließlich durch eIF4Gy R835E beobachtet wurde.

### Die Substrataffinität des eIF4Ay-Gy(572-853) Komplex

Im letzten Kapitel wurde beschrieben, dass eIF4Gy(572-853) die ATPase und Helikase Aktivität von eIF4Ay beeinflusst. Über die Art und Weise, wie eIF4Gy(572-853) die Aktivität von eIF4Ay beeinflusst ist aber nur wenig bekannt. Deshalb wurde, analog zur Charakterisierung von eIF4Ay, die Substrataffinität des eIF4Ay/Gy(572-853) Komplex untersucht.

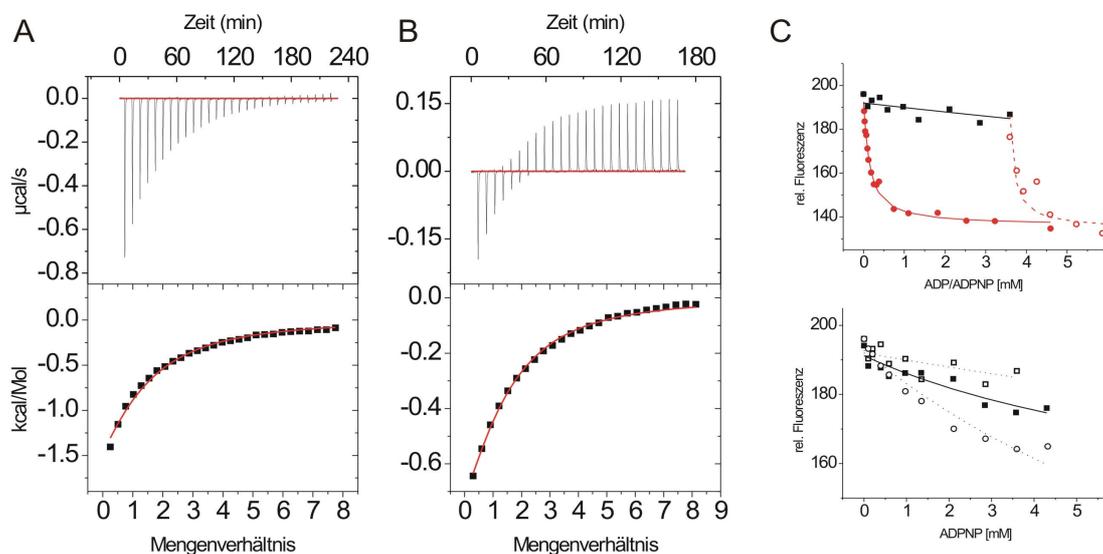
#### **Affinität von ADP und ATP**

Die Bestimmung der Affinität von ADP zum eIF4Ay/Gy(572-853) Komplex durch ITC und Fluoreszenztitration ergibt einen  $K_D$ -Wert von etwa 90  $\mu\text{M}$  (Abbildung 33). Im Vergleich zur Affinität von ADP zu eIF4Ay entspricht dies einer Verdopplung der Dissoziationskonstanten. Für eine Dissoziationskonstante ist diese Änderung jedoch unbedeutend. Bereits die Messwerte aus der Doppelbestimmung durch ITC und Fluoreszenztitration zeigten ähnliche Abweichungen. Die ADP Affinität von eIF4Ay wird deshalb durch eIF4Gy(572-853) praktisch nicht beeinflusst.

Für die Bindung von ADPNP an eIF4Ay wurde in Gegenwart von eIF4Gy(572-853) eine Schwächung beobachtet. Bei einer Konzentration von über 3 mM ADPNP waren erst 10% des mantADP aus dem Komplex mit eIF4Ay/Gy(572-853) verdrängt (Abbildung 33). Es ist dementsprechend schwierig einen präzisen Wert für die Dissoziationskonstante aus dem Verlauf der mantADP Verdrängung zu extrahieren. Die Integrität des Testsystems wurde überprüft, indem eine Verdrängungstitration bei einer Konzentration von 3,5 mM ADPNP durch ADP fortgesetzt wurde (Abbildung 33). Dabei hatte die ADPNP Konzentration keinen Effekt auf die Verdrängung von mantADP durch ADP. Wie für eIF4Ay wurde die Affinität von ADPNP für den eIF4Ay/Gy(572-853) Komplex durch kompetitive Titration in ITC Messungen bestimmt (Abbildung 21). Wie in der Fluoreszenztitration konkurrierte ADPNP aber nicht mit ADP um die Bindung an eIF4Ay/Gy(572-853). Der apparenten  $K_D$ -Wert von ADP in Gegenwart von ADPNP lag sogar unter dem Wert, der für ADP bestimmt wurde (Abbildung

33). Daraus würde theoretisch ein negativer  $K_D$ -Wert für die ADPNP resultieren (Gleichung 8). Dies zeigt deutlich die Grenzen der Bestimmung von Dissoziationskonstanten im millimolaren Bereich durch ITC. Die ADPNP Affinität zu eIF4Ay/Gy(572-853) R835E in Fluoreszenztitrationen lag zwischen der von eIF4Ay und eIF4Ay/Gy(572-865) (Abbildung 33).

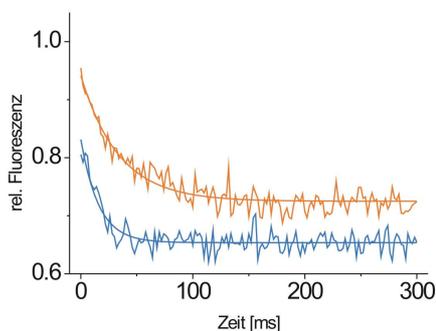
Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Affinität von ADP durch eIF4Gy(572-853) praktisch unverändert bleibt, während die Dissoziationskonstante für ADPNP leicht zunimmt. Dementsprechend ist die Affinität von eIF4Ay/Gy(572-853) für ADP nachwievor deutlich höher als für ATP.



**Abbildung 33** Doppelbestimmung der Nukleotidaffinität von eIF4Ay/Gy(572-853) durch ITC und mantADP Titrationen. **(A)** ITC Titration von 67  $\mu\text{M}$  eIF4Ay und 100  $\mu\text{M}$  eIF4Gy(572-853) mit 2,33 mM ADP bei 15°C. Die Daten wurden durch einen  $K_D$ -Wert von 115  $\mu\text{M}$  beschrieben (rote Linie), während die Stöchiometrie ( $n$ ) auf 1 gesetzt wurde **(B)** kompetitive ITC Titration von 57  $\mu\text{M}$  eIF4Ay, 114  $\mu\text{M}$  eIF4Gy(572-853) und 4,8 mM ADPNP mit 2,38 mM ADP bei 15°C. Der apparente  $K_D$ -Wert beträgt 86  $\mu\text{M}$ . Dieser Wert ist geringer als der  $K_D$  für die Affinität von ADP in Abwesenheit von ADPNP. Da ADPNP nicht um die Nukleotidbindungsstelle konkurriert, muss von einer reduzierten Affinität eIF4Ay/Gy572-853 für ADPNP ausgegangen werden **(C)** Bestimmung der ADP und ADPNP Affinität durch kompetitive Verdrängung von mantADP. Die Verdrängung von mantADP aus dem Komplex mit eIF4Ay/Gy(572-853) durch ADP (rote Kreise) bzw. ADPNP (schwarze Kreise) ergibt sich eine  $K_D$ -Wert von 57  $\mu\text{M}$  bzw. etwa 30 mM (oben). Wird die Titration bei 3,5 mM ADPNP mit ADP fortgesetzt (offene rote Kreise) ergibt sich derselbe  $K_D$ -Wert (57  $\mu\text{M}$ ) wie für die Verdrängung durch ADP (rote Kreise). Im Vergleich zur ADPNP Affinität von eIF4Ay (offene Kreise) verursacht eIF4Gy(572-853) R835E (gefüllte Quadrate) eine geringere Schwächung der ADPNP als wildtypisches eIF4Gy(572-853) (offene Quadrate) (unten).

### Kinetik der mantADP Freisetzung

Die Erhöhung der Umsatzzahl der RNA stimulierten ATPase durch eIF4Gy(572-853) (Abbildung 31) konnte nicht anhand veränderter Substrataffinität erklärt werden. Nach neuen Erkenntnissen ist die Geschwindigkeit der Freisetzung von ADP und Phosphat ratenlimitierend für den Umsatz von DEAD Box Proteinen [112]. Auf dieser Grundlage wäre die Stimulierung der ATP Hydrolyse (Abbildung 31) durch die Beschleunigung der ADP Freisetzung denkbar. Um einer möglichen Nukleotidaustauschaktivität von eIF4Gy(572-853) nachzugehen wurde der  $k_{\text{off}}$  von mantADP in An- und Abwesenheit von eIF4Gy(572-853) untersucht.



**Abbildung 34** Kinetik der mantADP Dissoziation von eIF4Ay/Gy(572-853) (blau) im Vergleich zur Freisetzung aus eIF4Ay (orange). Der  $k_{\text{off}}$  von mantADP aus dem eIF4Ay/Gy(572-853) beträgt etwa  $60 \text{ s}^{-1}$ . Im direkten Vergleich beschleunigt eIF4Gy(572-853) die Freisetzung von mantADP um den Faktor 2.

Abbildung 34 zeigt die Kinetik der Dissoziation von mantADP aus dem eIF4Ay/Gy(572-853) Komplex. Der Verlauf kann durch eine einzelne Exponentialfunktion mit der Ratenkonstante  $k_{\text{off}} = 60 \text{ s}^{-1}$  beschrieben werden. Damit ist die Freisetzung von mantADP aus einem vorgeformten eIF4Ay/Gy(572-853)/mantADP Komplex doppelt so schnell wie aus dem eIF4Ay/mantADP Komplex. Die Beschreibung einer Nukleotidaustauschaktivität von eIF4Gy(572-853) bedarf aber der systematischen Untersuchung der Kinetik der mantADP Freisetzung. Beispielsweise muss untersucht werden, ob bereits eIF4Ay E43R einen Einfluss auf  $k_{\text{off}}$  hat oder ob eIF4Gy(572-853)<sup>3-</sup> die Freisetzung von mantADP beschleunigt, obwohl es keinen Einfluss auf die Konformation von eIF4Ay hat (Abbildung 36).

## Die Konformation des eIF4Ay - eIF4Gy(572-853) Komplex in Lösung

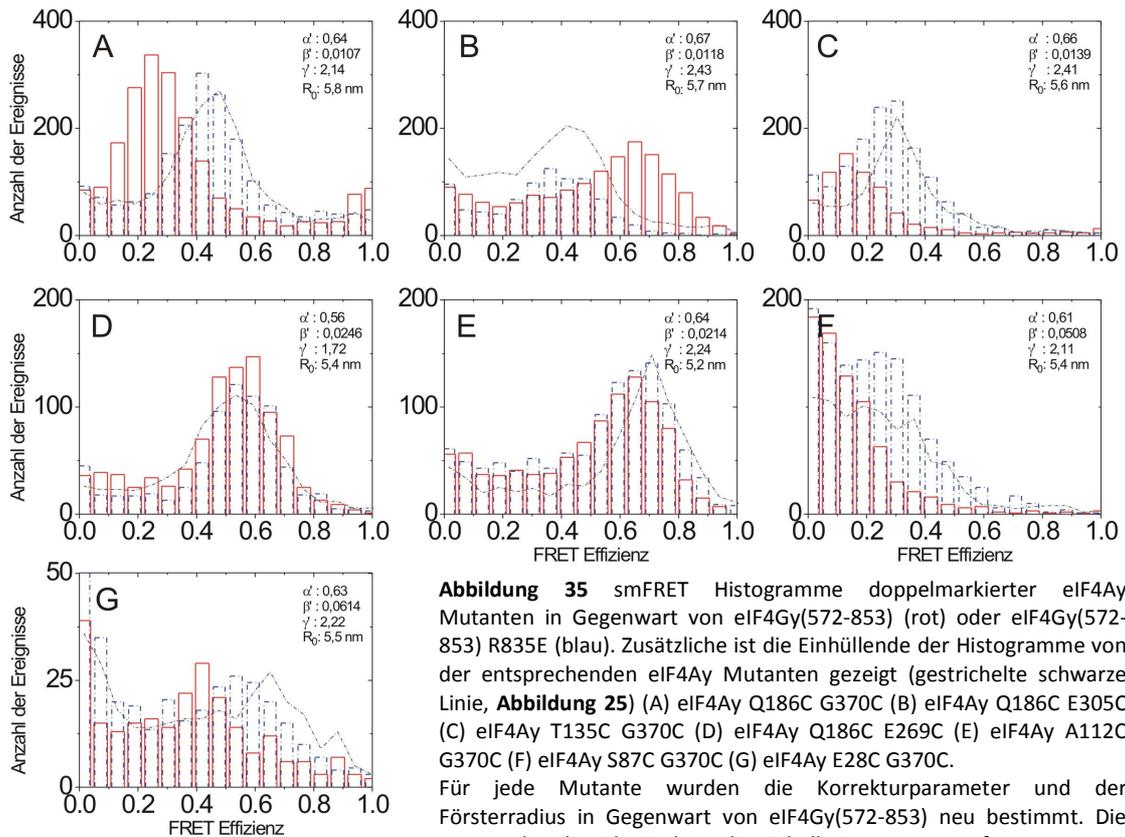
Die Konformation des Helikasekerns hat entscheidenden Einfluss auf die Aktivität von DEAD Box Helikasen. Erst in der geschlossenen Konformation existieren die vollständige RNA- und Nukleotidbindungsstelle [17]. Während der Hydrolyse von ATP bleibt der Helikasekern in der geschlossenen Konformation [34] und es wurde vermutet, dass die Freisetzung der Substrate mit dem Übergang in die offene Konformation korreliert [20]. Für die stimulierenden Initiationsfaktoren eIF4G und eIF4H konnte explizit gezeigt werden, dass sie beide eIF4A Domänen kontaktieren [83, 115, 116]. Dies gilt auch für Inhibitoren der eIF4A Aktivität. Für Pateamine A, Pcd4 und ein RNA Aptamer [30, 84, 73] wurde der Kontakt zu beiden Domänen nachgewiesen. Darauf aufbauend wurde die Regulation durch die Beeinflussung der konformationellen Dynamik postuliert. In smFRET Experimenten kann der Einfluss von eIF4Gy(572-853) auf die Konformation von eIF4Ay direkt beobachtet werden.

### **Konformation von eIF4Ay/Gy(572-853)**

Anhand der Ergebnisse aus der Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen eIF4Ay und eIF4Gy(572-853) (Abbildung 29) konnte berechnet werden, dass etwa 10  $\mu$ M eIF4Gy(572-853) nötig sind um 50 pM eIF4Ay in Einzelmolekülexperimenten zu 95% zu sättigen. Abbildung 35 fasst die smFRET Histogramme für eIF4Ay in Komplex mit eIF4Gy(572-853) (rote Balken) und eIF4Gy(572-853) R835E (blaue Balken; gestrichelt) zusammen und vergleicht sie direkt mit den Histogrammen von eIF4Ay (schwarze Linie, gestrichelt, Abbildung 25). Die Korrekturparameter und Försterabstände für die einzelnen FRET Mutanten wurden in Gegenwart von eIF4Gy(572-853) erneut bestimmt. Dabei traten keine großen Unterschiede im Vergleich zu den Korrekturparametern von eIF4Ay auf. Lediglich die Försterradien  $R_0$  nahmen um ca. 0,2 nm ab, was auf die Abnahme der Quantenausbeute in Gegenwart der hohen eIF4Gy(572-853) Konzentration zurückzuführen ist.

Bereits beim ersten Blick auf die smFRET Histogramme (Abbildung 35) wird deutlich, dass sich die Konformation von eIF4Ay im Komplex mit eIF4Gy(572-853) von freiem eIF4Ay unterscheidet.

Die FRET Effizienz zwischen den Farbstoffen an den Positionen E28, S87, T135 und Q186 zum Farbstoff der an G370C immobilisiert ist nehmen ab, während sich die FRET Effizienz zwischen den Farbstoffen an Position Q186 und E305 deutlich erhöht. Nahezu unverändert bleiben die Transfereffizienzen zwischen den Farbstoffen an Q186 und T269 sowie A112 und G370 (Abbildung 35). Die Bindung von eIF4Gy(572-853) an eIF4Ay verursacht dementsprechend die Rotation der Domänen zueinander.



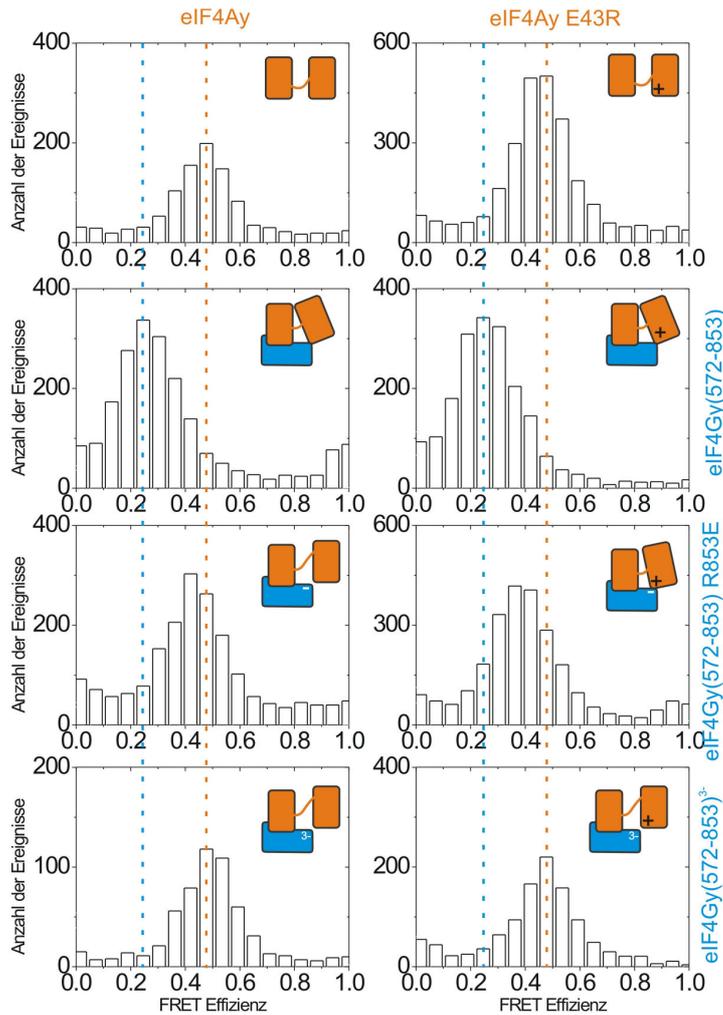
**Abbildung 35** smFRET Histogramme doppelmarkierter eIF4Ay Mutanten in Gegenwart von eIF4Gy(572-853) (rot) oder eIF4Gy(572-853) R835E (blau). Zusätzlich ist die Einhüllende der Histogramme von der entsprechenden eIF4Ay Mutanten gezeigt (gestrichelte schwarze Linie, **Abbildung 25**) (A) eIF4Ay Q186C G370C (B) eIF4Ay Q186C E305C (C) eIF4Ay T135C G370C (D) eIF4Ay Q186C E269C (E) eIF4Ay A112C G370C (F) eIF4Ay S87C G370C (G) eIF4Ay E28C G370C. Für jede Mutante wurden die Korrekturparameter und der Försterradius in Gegenwart von eIF4Gy(572-853) neu bestimmt. Die entsprechenden Abstände sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Die Breite der Peaks in der Abstandsverteilung der doppelmarkierten eIF4Ay Mutanten ändert sich durch die Bindung von eIF4Gy(572-853) nicht. Das bedeutet, dass die Flexibilität der Konformation von eIF4Ay im Komplex mit eIF4Gy(572-853) und von eIF4Ay ohne Bindungspartner ähnlich ist. Wahrscheinlicher als eine starre Konformation von eIF4Ay ohne Bindungspartner ist, dass eIF4Gy(572-853) die Konformation von eIF4Ay zwar beeinflusst, sie aber nicht vollständig fixiert. Dadurch bleibt notwendige konformationelle Dynamik für die katalytische Aktivität auch im Komplex mit eIF4Ay erhalten.

### Bedeutung der Salzbrücke für die Konformationsänderung

In Gegenwart von eIF4Gy(572-853) R835E gleichen die Transfereffizienzen denen von eIF4Ay ohne eIF4Gy(572-853). Lediglich eIF4Ay CAAC E28 G370 zeigte einen schwachen Effekt (**Abbildung 35**). Die Anzahl der Ereignisse in diesem Histogramm war allerdings so gering, dass die Position des Maximums nur schlecht abgesichert ist. Die Zerstörung der Salzbrücke zwischen eIF4Ay E43 und eIF4Gy(572-853) R835 durch die Mutation von eIF4Gy(572-853) R835E führt zum nahezu

vollständigen Verlust der Konformationsänderung. Deshalb wurde der Einfluss der Salzbrücke auf die Konformation gezielt untersucht. Im Gegensatz zur Mutation in eIF4Gy(572-853) R835E verursachte die Mutation von eIF4Ay E43R aber keine Änderung des Verhalten mit wildtyp eIF4AGy(572-853) (Abbildung 36). Wiederherstellen der Salzbrücke durch den Tausch der Aminosäuren führt zu einer deutlich reduzierten Änderung der FRET Effizienz (Abbildung 36). eIF4Gy(572-853)<sup>3-</sup> verursachte weder in eIF4Ay oder eIF4Ay E43R eine Konformationsänderung.



**Abbildung 36** Einfluss der Salzbrücke zwischen eIF4Ay E43 und eIF4Gy(572-853) R835 auf die Konformation von doppelmarkiertem eIF4Ay Q186C G370C. Die Mutation E43R hat keinen Einfluss auf die Konformation von eIF4Ay (oben). eIF4Ay E43R zeigt bei der Wechselwirkung mit eIF4Gy(572-853) keinen Unterschied zu eIF4Ay (zweite Zeile). Die Mutation in eIF4Gy(572-853) R835E verhindert die Konformationsänderung von eIF4Ay fast vollständig. Der Einfluss von eIF4Gy(572-853) R835E auf die Konformation von eIF4Ay kann durch die Wiederherstellung der Salzbrücke durch eIF4Ay E43R nur teilweise kompensiert werden (dritte Zeile). Der Austausch von drei Aminosäuren in der sekundären Bindungsstelle von eIF4Gy(572-853) durch negativ geladene Aminosäuren (K831E, S834D und R835E) verhindert einen Einfluss von eIF4Gy auf die Konformation von eIF4Ay und eIF4Ay E43R (vierte Zeile).

Zusammenfassend verursacht eIF4Gy(572-853) eine konformationelle Änderung in eIF4Ay. Die Salzbrücke zwischen eIF4Ay E43 und eIF4Gy(572-853) R835 ist für diese Konformationsänderung nicht zwingend erforderlich. Der asymmetrische Einfluss der Reste eIF4Gy(572-853) R835 und eIF4Ay E43 auf die Konformationsänderung lässt vermuten, dass eIF4Gy(572-853) R835 noch einen weiteren Wechselwirkungspartner in eIF4Ay besitzt. Möglicherweise besteht die sekundäre Bindungsstelle aus einem komplexen Netzwerks aus Wasserstoffbrücken und elektrostatischen Wechselwirkungen, sodass jede Mutation zu unspezifischer Schwächung der Bindung an die sekundäre Bindungsstelle führt. eIF4Gy(572-853)<sup>3-</sup> verursacht keine Konformationsänderung in eIF4Ay.

### Rekonstruktion der Domänenorientierung

Um Aussagen über die Positionen der konservierten Elemente zu ermöglichen wurden die Abstandsinformationen in der Rekonstruktion der Domänenstruktur visualisiert. Die Abstände aus den smFRET Experimenten und die entsprechenden C<sub>α</sub> Abstände aus der Kristallstruktur von eIF4Ay/Gy(572-853) [83] sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

**Tabelle 9** Vergleich der in smFRET bestimmten Abständen. In Klammern sind die C<sub>α</sub> Abstände in der Rekonstruktion der Struktur zur Visualisierung der smFRET Abstände (eIF4Ay) oder in der Kristallstruktur (eIF4Ay/Gy(572-853)) angegeben. Farbstoffpositionen, deren Abstand durch die Bindung von eIF4Gy(572-853) zunimmt, sind in grün, Positionen, deren Abstand sich verringert in rot, dargestellt.

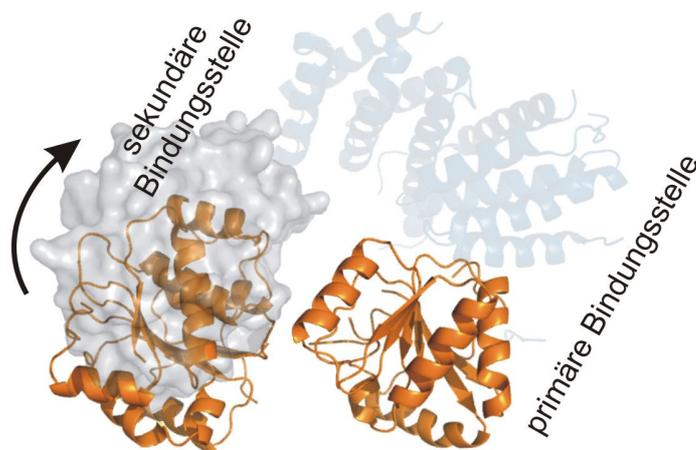
	Farbstoffposition		smFRET Abstände [nm]			
	N terminal	C-terminal	eIF4Ay (Rekonstruktion)		eIF4Gy(572-853) (Kristallstruktur)	
A	Q186C	G370C	6,3	(5,6)	6,8	(6,1)
B	Q186C	E305C	6,4	(5,1)	5,2	(4,1)
C	T135C	G370C	6,6	(6,2)	7,3	(6,6)
D	Q186C	T269C	5,4	(5,0)	5,2	(4,8)
E	A112C	G370C	4,7	(4,8)	4,8	(5,2)
F	S87C	G370C	6,7	(6,5)	>7	(7,0)
G	E28C	G370C	5,6	(5,3)	5,8	(5,8)

Die smFRET Abstandsinformationen weichen 0,4 bis 1,1 nm von den C<sub>α</sub> Abständen in der Kristallstruktur ab. Die Abweichungen resultieren teilweise daraus, dass die smFRET Messwerte den Abstand zwischen den Farbstoffen angeben. Im Vergleich zu den C<sub>α</sub> Abständen enthalten sie dementsprechend noch einen Beitrag von Cystein und Farbstofflinker. Im Fall von eIF4Ay A112

G370, zeigt die Seitenkette von A112 in Richtung der Position von G370. Wie die Seitenkette zeigt deshalb auch der Farbstoff in Richtung G370, weshalb für den Abstand zwischen den Farbstoffen an A112C und G370C ein kleinerer Wert als die entsprechende Entfernung der C $\alpha$  Positionen zu erwarten ist. Unter Berücksichtigung der durch Farbstofflinker und Cystein möglichen Abweichungen stimmen die in smFRET Experimenten gemessenen Abstände gut mit den Abständen in der Kristallstruktur von eIF4Ay im Komplex mit eIF4Gy(572-853) überein.

Die Orientierung der eIF4A Domänen erfolgte anhand der zwischen eIF4Ay und eIF4Ay/Gy(572-853) ermittelten Abstandsänderungen. Im Unterschied zu den absoluten Abständen sind die Abstandsänderungen zumindest teilweise um den Einfluss der Farbstofforientierung korrigiert.

Für die Rekonstruktion der Konformation von eIF4Ay ohne Wechselwirkungspartner wurden die Messwerte der sieben FRET Mutanten in drei Kategorien eingeteilt. Eine Gruppe, deren Abstand sich durch die Wirkung von eIF4Gy(572-853) erhöht (A; C und F), eine weitere Gruppe deren Abstände nur schwach von eIF4Gy(572-853) beeinflusst wird (D; E und G) und schließlich eIF4Ay Q186C S305C (B), dessen Abstand sich bei Komplexbildung verringert. Anhand dieser Einteilung wurden die Domänen von eIF4Ay positioniert. Abbildung 37 vergleicht die Rekonstruktion und eIF4Ay im Komplex mit eIF4Gy(572-853). Der Kontakt zwischen eIF4Ay und eIF4Gy(572-853) ändert die Position der Domänen erkennbar. Aufgrund der Rotation der Domänen unterscheidet sich die relative Orientierung der konservierten Motive drastisch zwischen eIF4Ay ohne und mit eIF4Gy(572-853). Die Rekonstruktion von eIF4Ay anhand der smFRET Abstandsänderungen dient als Grundlage für die Diskussion und Interpretation des Ergebnisteils.



**Abbildung 37** Visualisierung der smFRET Abstandsänderungen von der Konformation von eIF4A ohne Wechselwirkungspartner (orange) im Vergleich mit der Lage der NTD von eIF4Ay im Komplex mit eIF4Gy(572-853) (Oberflächenrepräsentation, grau) und eIF4Gy(572-853) (Cartoon, blau, transparent) dargestellt. Anhand der Abbildung ist nachvollziehbar, wie der Kontakt in der sekundären Bindungsstelle die Ausrichtung der eIF4A Domänen beeinflusst (Pfeil).



## V. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des Einfluss wechselwirkender Proteine auf den DEAD Box Helikasekern. Dazu wurde die Wirkung von der für die Translations Initiation essentiellen HEAT1 Domäne von eIF4Gy (eIF4Gy(572-853)) auf eIF4Ay untersucht. eIF4Gy(572-853) stimulierte die schwache ATPase Aktivität von eIF4Ay, während für die Entwindung kurzer RNA Doppelstränge ein inhibierender Effekt festgestellt wurde. Auf die Nukleotidaffinität von ADP hatte eIF4Gy(572-853) praktisch keinen Einfluss, während die Affinität von eIF4Ay für ATP durch eIF4Gy(572-853) leicht reduziert wurde. *Stopped flow* Experimente lieferten erste Hinweise auf eine Nukleotidaustauschaktivität von eIF4Gy(572-853). Ihrer Stabilität entsprechend wurden die Kontaktflächen zwischen eIF4Ay und eIF4Gy(573-853) als primäre und sekundäre Bindungsstelle benannt. Es konnte gezeigt werden, dass die primäre Bindungsstelle die Affinität der beiden Proteine zueinander vermittelt. Während Mutationen in der sekundären Bindungsstelle keinen nennenswerten Einfluss auf die Stabilität des eIF4Ay/Gy(572-853) Komplex hatten, wurden große Effekte auf die Beeinflussung der eIF4Ay Konformation und Aktivität beobachtet. Im Folgenden werden mögliche Mechanismen der Beeinflussung von eIF4A durch eIF4Gy(572-853) diskutiert.

### **Gilt eIF4A zu Recht als die Mutter aller DEAD Box Proteine?**

2002 veröffentlichten Rogers *et al.* einen Übersichtsartikel mit dem Titel '*eIF4A: the godfather of the DEAD box helicases*' [40]. eIF4A erlangte diesen Status, da es, u.a. durch seine Rolle in der Translations Initiation, das erste intensiv studierte DEAD Box Protein war. Vier der neun Gründungsmitglieder der Gruppe der DEAD Box Proteine waren verschiedene eIF4A Isoformen aus Maus oder Hefe [18]. Anhand von eIF4A wurden den konservierten Sequenzbereichen erstmals

Funktionen zugeordnet [117] und die ersten Hinweise für eine konformationelle Dynamik von DEAD Box Proteinen entdeckt [28]. Obwohl eIF4A nur aus dem Helikasekern besteht und keine N- oder C-Terminal flankierenden Domänen besitzt, zeigt es RNA stimulierte ATPase und Helikase Aktivität *in vitro* [72]. Diese Aktivitäten sind aber nur sehr gering und liegen nur wenig über dem experimentellen Hintergrund. Der Mechanismus der DEAD Box Proteine wird deshalb mittlerweile oft an anderen DEAD Box Proteinen erforscht, die höhere Umsatzzahlen und bedeutend höhere RNA Affinität zeigen [118, 33, 112]. Aktuelle Publikationen über eIF4A sind dagegen oft zellbiologisch basierte Arbeiten, die sich auf eine qualitative Beschreibung der eIF4A Aktivität beschränken. Dass die Aktivität von eIF4A nur schwer quantifizierbar ist, rüttelt aber nicht an der Sonderstellung von eIF4A unter den DEAD Box Helikasen. Als minimale RNA Helikase ist eIF4A der Prototyp der DEAD Box Helikasen. Außerdem ist die Beeinflussung durch interagierende Proteine ein Beispiel für die Regulierung von DEAD Box Proteinen durch flankierende Domänen. eIF4A als Mutter der DEAD Box Protein zu bezeichnen bezieht sich demnach nicht auf eine evolutionäre Beziehung, sondern auf den exemplarischen Charakter eIF4As für die DEAD Box Proteine.

#### **Gibt es ein spezifisches RNA Substrat für eIF4A?**

Ein spezifisches Substrat für eIF4A ist momentan nicht bekannt. Die geringe Aktivität von eIF4A in RNA stimulierten ATPase Tests ist deshalb zum Teil auf die unspezifische Stimulierung durch polyU RNA zurückzuführen. Anderen DEAD Box Proteinen konnten aber spezielle RNA Substrate zugeordnet werden. Beispielsweise wird YxiN gezielt durch die Helix 92 der 23S rRNA stimuliert [119]. Ein spezifisches Substrat für eIF4A würde dessen effiziente Stimulierung ermöglichen und dadurch die Aussagekraft der Aktivitätstests deutlich stärken. Die Aufgabe von eIF4A *in vivo* erfordert allerdings keine spezifische Substratbindung. eIF4A ist im Wechselspiel mit anderen Translations Initiationsfaktoren für die Entfernung von Sekundärstrukturen in der 5' untranslatierten Region der mRNA zuständig und ermöglicht so die Bindung der kleinen Ribosomenuntereinheit [48, 56, 57, 49]. Für diese Aufgabe wäre eine sequenzspezifische hochaffine Bindung von RNA sogar hinderlich. eIF4A selbst zeigt nur geringe RNA Affinität, die aber durch eIF4B erhöht werden kann [67]. Auch zur Bindung an die Translations Initiationsstelle ist keine spezifische RNA Erkennung durch eIF4A nötig, da dieser Schritt durch eIF4G und eIF4E unterstützt wird [47]. Ein spezifisches Substrat für eIF4A ist noch aus einem weiter Grund nicht zu erwarten. eIF4A hat keine zusätzlichen Domänen. Diese werden aber oft für die spezifische Bindung von RNA Substraten verantwortlich gemacht [14]. Ein spezifisches Substrat für eIF4A würde vermutlich den Kernbereich aller DEAD Box

Proteine beeinflussen. Dennoch gibt es Hinweise auf spezifische Interaktion von eIF4A mit verschiedenen RNAs [73, 113, 38, 74, 75], auf die im Folgenden kurz eingegangen wird.

Das **eIF4A RNA Aptamer** ist eine artifizielle RNA Sequenz, die *in vitro* zur hochaffinen Bindung von eIF4A selektiert wurde. Höchstwahrscheinlich stellt es deshalb keine physiologisch relevante eIF4A-RNA Interaktion dar. Das Aptamer kontaktiert beide eIF4A Domänen und inhibiert die Aktivität voraussichtlich durch die Beeinflussung der Konformationsänderung [73].

**BC1 RNA** ist eine 152 Nukleotide lange nicht codierende RNA, die an der Regulation der Protein Translation in Nervenzellen beteiligt ist [74]. Für BC1 RNA wurde ein inhibitorischer Einfluss auf die Translation *in vivo* [74] und die Entwindung *in vitro* [75] gezeigt. Gleichzeitig wurde in BC1 RNA stimulierten ATPase Tests hochaffine Bindung von BC1 RNA gezeigt (Abbildung 23, [75]). Die Inhibition von Translation und Entwindung, wäre deshalb durch die kompetitive Verdrängung der Translations- bzw. Entwindungssubstrate durch BC1 RNA erklärbar. In smFRET Histogrammen konnte jedoch kein Effekt von BC1 RNA auf die Konformation von eIF4Am beobachtet werden. Möglicherweise bindet BC1 RNA nur eine Domäne, oder sie stabilisiert eIF4A in einer offenen Konformation. Weitere smFRET Experimente oder die Röntgenstrukturanalyse von eIF4A in Komplex mit BC1 RNA wären nötig, um den Bindungsmodus von BC1 RNA zu bestimmen.

**PolyG RNA** bindet etwa 5 fach stärker als andere Homopolymere an eIF4A [38]. Trotz der stärkeren Bindung stimuliert es die ATPase Aktivität aber nicht, sondern verursacht im Gegenteil die Inhibition polyU RNA stimulierter ATPase Aktivität (Abbildung 23, [38]). Das unterschiedliche Verhalten von polyU und polyG RNA ist um so verwunderlicher, da die Kristallstrukturen ausschließlich Wechselwirkung zwischen dem Helikasekern und dem Ribose-Phosphat-Rückgrat der RNA zeigt [23, 17]. Es wurde daher vermutet, dass polyG eIF4A in der geschlossenen Konformation stabilisiert [38]. Ein Einfluss von polyG auf die Konformation von eIF4A konnte aber nicht nachgewiesen werden. Allerdings wurde in smFRET Experimenten nach Zugabe von polyG RNA die Zunahme der Diffusionszeit sowie die Abnahme der Zählraten beobachtet. Beide Effekte können Anzeichen von Aggregation bzw. Multimerbildung sein. Das Verhalten von polyG RNA bleibt rätselhaft. Möglicherweise stehen die Besonderheiten von polyG in Zusammenhang mit seiner Tendenz zur Bildung von quadruplex Strukturen.

Die systematische Untersuchung der Bindung von Nukleinsäuren an eIF4A ergab, dass phosphorothioat RNA (**ptRNA**) etwa 50 fach stärker als nicht modifizierte RNA an eIF4A bindet [113]. Da die Substratlänge mit der RNA Affinität korreliert [113], kann dieser Effekt qualitativ durch den Vergleich zwischen polyU RNA und oligoU 20mer ptRNA in RNA stimulierten ATPase Test bestätigt

werden (Abbildung 23). Dennoch konnte auch durch ptRNA keine Änderung der Konformation von eIF4A in smFRET Experimenten beobachtet werden. Im Zusammenhang mit der Länge des Substrats steht auch die fehlende Stimulation der ATP Hydrolyse durch eIF4Gy(572-853) (Abbildung 23). Im Komplex mit anderen Initiationsfaktoren nimmt die Länge der RNA, die zur Stimulierung der ATPase von eIF4A benötigt wird, zu [68]. Ein 20mer wäre demzufolge zu kurz um den Komplex aus eIF4Ay/Gy(572-853) effizient zu stimulieren. Die experimentelle Überprüfung dieser Hypothese durch die Messung der Stimulierung der ATP Hydrolyse durch oligoU Substrate verschiedener Längen steht allerdings noch aus. Der Einsatz von längeren ptRNAs oder dessen flächendeckender Einsatz in ptRNA stimulierter ATPase ist durch deren hohen Preis nur bedingt möglich.

Keines der untersuchten RNA Substrate kann im Moment polyU als Modellsubstrat für eIF4A ersetzen. Besonders die weitere Untersuchung der Wechselwirkung zwischen eIF4A und BC1 RNA hat aber das Potential ein spezifisches Substrat für eIF4A zu identifizieren, da BC1 RNA die Aktivität von eIF4A *in vivo* reguliert [74].

#### **DEAD Box Proteine haben auch in Lösung eine definierte Konformation**

Der Helikasekern besteht aus zwei RecA artigen Domänen, die durch einen flexiblen Aminosäurelinker verknüpft sind. Die große Vielfalt an Orientierungen in denen die Struktur des DEAD Box Kerns bestimmt wurde, legte die Vermutung nahe, dass sich die Domänen in dem durch die Länge des Linker definierten Konformationsraum ungehindert bewegen können. Hingegen zeigten alle smFRET Histogramme von eIF4A eine einzelne Konformation mit definierter FRET Effizienz (Abbildung 24, Abbildung 25). Die entsprechenden smFRET Abstandsinformationen wurden durch die Rekonstruktion der Konformation von eIF4A in Lösung visualisiert (Abbildung 37). Offensichtlich nutzen die Domänen den zur Verfügung stehenden Konformationsraum nicht aus, sondern nehmen auch ohne Wechselwirkungspartner eine definierte Konformation ein. Dies wurde auch für die DEAD Box Helikasen YxiN und HERA beobachtet [103, 114, 110]. Wenn der Helikasekern aber auch ohne Substrat eine bevorzugte Orientierung einnimmt stellt sich die Frage, warum so viele teilweise deutlich unterschiedliche Konformationen beobachtet werden (Abbildung 2) und nicht ähnlich wie bei der geschlossenen Konformation ein gemeinsamer Zustand für alle DEAD Box Proteine existiert. Offensichtlich kann an diesem Punkt die definierte Konformation des DEAD Box Helikasekerns nur unzureichend verstanden werden (s. unten).

### **Einfluss von eIF4Gy(572-853) auf die Aktivität von eIF4Ay**

eIF4Gy(572-853) stimulierte die ATP Hydrolyseaktivität von eIF4Ay (Abbildung 31). Im Gegensatz dazu wurde die RNA Entwindungsaktivität inhibiert (Abbildung 32). Übereinstimmend damit zeigt eIF4Gy(572-853) dosisabhängige Inhibition der Translationsaktivität *in vitro* [120]. Im Gegensatz dazu stimuliert eIF4G ATPase und Helikaseaktivität [68]. Beim Vergleich zwischen ATPase und Helikaseaktivität sind aber die unterschiedlichen RNA Substrate zu berücksichtigen. Während die Stimulierung der ATPase durch polyU RNA erfolgte, wurde im Entwindungstest ein 10mer/50mer RNA Duplex eingesetzt. Wenn eIF4Ay im Komplex mit eIF4Gy(572-853), wie für die Wechselwirkung von eIF4A mit eIF4B, eIF4H und eIF4G/E nachgewiesen [68], längere RNA Substrate benötigt, kann die reduzierte Effizienz der Entwindung auch Ausdruck verringerter RNA Affinität sein. Der fehlende Einfluss von eIF4Gy(572-853) auf oligoU 20mer ptRNA stimulierte ATPase Tests (Abbildung 23) bestärkt die Vermutung, dass die Substratlänge Einfluss auf die Aktivität hat. Um Unklarheiten bei der Vergleichbarkeit zwischen ATPase und Helikase Tests zu vermeiden müssten beide Aktivitätstests mit demselben Substrat durchgeführt werden.

### **Die primäre Bindungsstelle – „...was die Welt im Innersten zusammenhält“**

In der Kristallstruktur des eIF4Ay/Gy(572-853) Komplex sind zwei separate Kontaktflächen zwischen eIF4Ay und eIF4Gy(572-853) sichtbar (Abbildung 27). Die jeweilige N-terminale Domäne kontaktiert die C-terminale Domäne des anderen Proteins [83]. Die isolierten eIF4A Domänen wechselwirken unterschiedlich stark mit eIF4G. Während die separate CTD von eIF4A einen stabilen Komplex mit eIF4G formt [83, 115], wechselwirkt die isolierte NTD von eIF4A nur bei reduzierter Salzkonzentration schwach mit eIF4G [115]. Diese Beobachtungen stimmen mit der Größe der Kontaktflächen in der Kristallstruktur [83] und mit der beschriebenen Destabilisierung der Kontaktflächen durch Erhöhung der Salzkonzentration (Abbildung 30) überein. Auf dieser Grundlage erfolgte die Benennung der Kontaktfläche zwischen eIF4Ay NTD und eIF4Gy(572-853) CTD als sekundäre und der Kontaktfläche zwischen eIF4Ay CTD und eIF4Gy(572-853) NTD als primäre Bindungsstelle (Abbildung 27).

Der Beitrag der sekundären Bindungsstelle zur Komplexbildung wurde bisher noch nicht quantifiziert. Wenn die drei negativen Ladungen in eIF4Gy(572-853)<sup>3-</sup> die Wechselwirkung der sekundären Bindungsstelle vollständig verhindern, kann die Wechselwirkungsenergie der sekundären Bindungsstelle ( $\Delta\Delta G$ ) aus den Dissoziationskonstanten für eIF4Ay/Gy(572-853) und eIF4Ay/Gy(572-853)<sup>3-</sup> ( $K_{D1}$  und  $K_{D2}$ , Abbildung 29) berechnet werden. Aufgrund der

Ladungsverteilung an der Proteinoberfläche von eIF4Gy(572-853)<sup>3-</sup> (Abbildung 27) ist davon auszugehen, dass die sekundäre Bindungsstelle zwischen eIF4Ay und eIF4Gy(572-853)<sup>3-</sup> zerstört wurde. Dies wurde bestätigt, indem gezeigt werden konnte, dass die Konformation von eIF4Ay in Gegenwart von eIF4Gy(572-853)<sup>3-</sup> nicht beeinflusst wird (Abbildung 36). Eine Änderung der eIF4A Konformation würde den Kontakt zu beiden Domänen erfordern. Der energetische Beitrag der sekundären Bindungsstelle ( $\Delta\Delta G$ ) ergibt sich dementsprechend aus der Differenz der Änderung in der Gibbs freien Energie ( $\Delta G = -RT \ln K_D$ ).

$\Delta\Delta G = \Delta G_1 - \Delta G_2 = RT \ln \frac{K_{D1}}{K_{D2}}$  beträgt etwa 1 kJ/mol, wobei R die Allgemeine Gaskonstante und T die absolute Temperatur darstellt. Das heißt, dass weniger als 5% der Wechselwirkungsenergie zwischen eIF4Ay und eIF4Gy(572-853) ( $\Delta G_1$ ) auf die sekundäre Bindungsstelle entfallen. In Übereinstimmung mit der Stabilisierung des Komplex zu 97% durch die primäre Bindungsstelle verhindern Mutationen in der primären Bindungsstelle die Komplexbildung zwischen eIF4Ay und eIF4G [83, 115]. Die primäre Bindungsstelle ist dementsprechend ausreichend zur Verankerung der mittleren Domäne von eIF4G an der CTD von eIF4A.

#### **Die sekundäre Bindungsstelle – wo eIF4A und eIF4Gy(572-853) sich küssen**

Wie durch den geringen Beitrag zur Stabilisierung des eIF4Ay/Gy(572-853) Komplex gezeigt wurde (Abbildung 29), ist die Interaktion der N-terminalen Domäne von eIF4Ay mit der C-terminalen Domäne von eIF4Gy(572-853) nur schwach [115]. Eine treffende Beschreibung dieser Wechselwirkung ist bereits in der Aminosäuresequenz von eIF4Gy(572-853) codiert: Lysin-Isoleucin-Serin-Serin; KISS. In der sekundären Bindungsstelle „küssen“ sich die N-terminale Domäne von eIF4Ay und die C-terminale Domäne von eIF4Gy(572-853). Die Kristallstruktur der menschlichen HEAT1 Domäne [121] und die unabhängig bestimmte Kristallstruktur der N-terminalen Domäne von eIF4Ay [122] sind bereits ohne den jeweiligen Wechselwirkungspartner nahezu identisch mit der entsprechenden Struktur im eIF4Ay/Gy(572-853) Komplex [83]. Die Bindung über die sekundäre Bindungsstelle kann dementsprechend ohne strukturelle Anpassung der Wechselwirkungspartner erfolgen.

Der Kontakt über die sekundäre Bindungsstelle ist aber ausreichend, um die Orientierung der eIF4A Domänen zu beeinflussen (Abbildung 35). Dabei wird eIF4Ay nicht, wie vermutet wurde, im geschlossenen Zustand stabilisiert [115], sondern in einem eigenen 'eIF4G gebundenen' Zustand (Abbildung 37, [83]). Die Destabilisierung der sekundären Bindungsstelle durch moderate Erhöhung

der Ionenstärke (Abbildung 30, [115]) lässt auf die Wechselwirkung zwischen geladenen Aminosäuren schließen (Abbildung 27). Bereits der Austausch einer geladenen Aminosäure in eIF4Gy(572-853) R835E verhindert den Einfluss auf die Konformation von eIF4Ay fast vollständig (Abbildung 36). Diese schwache Interaktion, in Kombination mit der Verankerung von eIF4Gy(572-853) in der CTD von eIF4Ay, liefert die Grundlage für einen Mechanismus, in dem eIF4G während des gesamten katalytischen Zyklus über die primäre Bindungsstelle an eIF4A gebunden bleibt. Im Gegensatz dazu kann der Kontakt der sekundären Bindungsstelle transient abbrechen und eIF4A den Übergang in die geschlossene Konformation ermöglichen. Die bereits in den separaten Proteinen ausgerichtete Kontaktfläche würde die schnelle und dynamische Bindung und Lösung des Kontaktes der sekundären Bindungsstelle ermöglichen. eIF4G dient dabei offenbar nur als Gerüst, und bewegt sich selbst nicht. Der Kontakt in der sekundären Bindungsstelle verursacht so die Neuorientierung der eIF4A Domänen, ohne die für die Aktivität von DEAD Box Proteinen notwendige konformationelle Dynamik [31, 32] komplett einzuschränken.

#### **Primäre und sekundäre Wechselwirkungen und die Konformation von eIF4A ohne eIF4G**

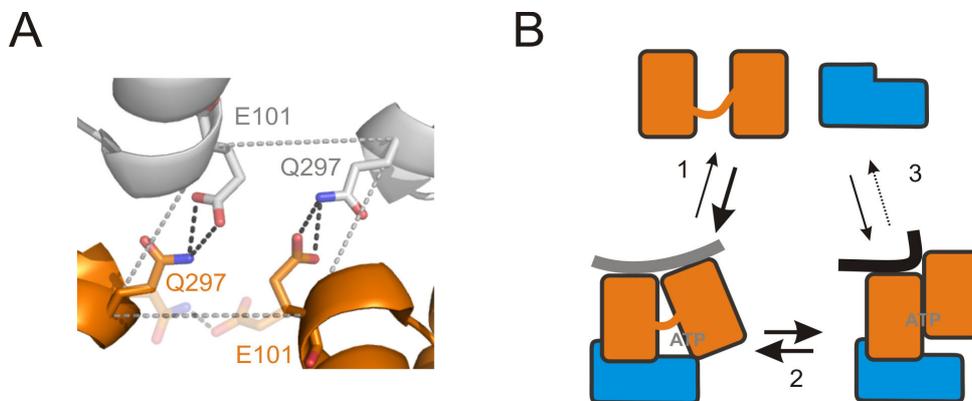
Im Hintergrund der detaillierten Betrachtung der Rolle der primären und sekundären Bindungsstelle für die Konformation von eIF4Ay im Komplex mit eIF4Ay/Gy(572-853) ist auch eine Beschreibung der definierten Konformation von eIF4Ay ohne Wechselwirkungspartner durch die Wirkung eines primären und sekundären Kontaktes möglich. Die primäre Wechselwirkung vermittelt den Kontakt zwischen den Proteindomänen und entspricht der kovalenten Verknüpfung der Domänen durch das Peptidbindungsrückgrat des Aminosäurelinkers. Die sekundäre Wechselwirkung liefert keinen Betrag zum Zusammenhalt der Domänen, verursacht aber die Orientierung der Domänen. Die sekundäre Wechselwirkung setzt sich aus der Anziehung oder Abstoßung zwischen allen Aminosäureseitenketten an der Proteinoberfläche inklusive denen des *Linkers* zusammen. Dieser Betrachtung entspricht, dass keine Interaktion zwischen den nicht kovalent verknüpften Domänen beobachtet werden [109]. Andererseits können Mutationen in nichtkonservierten Bereichen (Abbildung 16, [123]) oder der Linkersequenz [30] deutlichen Einfluss auf die Aktivität haben. Außerdem zeigte die Breite der Abstandsverteilung in den smFRET Messungen von eIF4Ay und eIF4Ay/Gy(572-853) (Seite 94), dass beide Konformationen eine vergleichbare Flexibilität besitzen. Dies entspricht der Interpretation, dass beide Konformationen durch eine primäre und sekundäre Wechselwirkung stabilisiert werden, die gleichzeitig die nötige Flexibilität für die katalytische Aktivität gewährleistet.

### **Die Konformation macht's - eIF4Gy(572-853) öffnet die Nukleotidbindungstasche und orientiert die RNA Bindungsstelle**

Die zentrale Frage dieser Arbeit war, wie die Wechselwirkung zwischen eIF4Ay und eIF4Gy(572-853) die Aktivitätsänderungen von eIF4Ay verursacht. Die Charakterisierung der Nukleotidaffinität von eIF4Ay zeigte die für DEAD Box Proteine typische höhere Affinität für ADP als für ATP (Abbildung 21, [28, 32]). Die Bindung von eIF4Gy(572-853) hat aber nur einen geringen Einfluss auf die Nukleotidaffinität. Es wurde also keine direkte Beeinflussung des Mechanismus durch die Änderung der Nukleotidaffinität gefunden. Die im Vergleich zu ATP hohe ADP Affinität steht im Zusammenhang mit der Erkenntnis, dass die Freisetzung von ADP und Phosphat einen ratenlimitierenden Schritt im katalytischen Zyklus der DEAD Box Proteine darstellen [112]. Vor diesem Hintergrund wäre die Stimulierung der ATPase anhand der Beschleunigung des Nukleotidaustauschs durch eIF4Gy(572-853) erklärbar. Erste Versuche zum Nachweis einer Nukleotidaustauschaktivität von eIF4Gy(572-853) deuten auf eine schwache Beschleunigung der Freisetzung von mantADP hin (Abbildung 34). Für weitere Aussagen ist aber eine systematische Untersuchung der Assoziations- und Dissoziationsraten notwendig. Die Nukleotidaustauschaktivität von eIF4Gy(572-853) stellt aber ein attraktives Model zur Erklärung der Stimulierung der ATP Hydrolyse dar. Die Konformationsänderung durch eIF4Gy(572-853) könnte zur Beschleunigung des Nukleotidaustausch führen indem es die Zugänglichkeit der Nukleotidbindungstasche erhöht. Die Strukturen von eIF4Ay im Komplex mit eIF4Gy(572-853) (Abbildung 37, [83]) und in der geschlossenen Konformation [17] unterstützen dies Hypothese. Durch die Bindung von eIF4Gy(572-853) öffnet sich ein Spalt zwischen den Domänen von eIF4A. Deshalb kann das Nukleotid im eIF4Ay/Gy(572-853) Komplex lediglich über die nukleotidbindenden Motive der N terminalen Domäne (Q-Motiv, Motiv I und Motiv II) gebunden werden. Gleichzeitige Kontakte mit den Motiven des C Terminus (Motiv V und VI), wie in der geschlossenen Konformation des Helikasekerns [17], sind nicht möglich. Dementsprechend ist eine Beschleunigung der Nukleotidfreisetzung durch die Wirkung von eIF4Gy(572-853) auf den geschlossenen Komplex denkbar. Die Beschleunigung der mantADP Freisetzung von eIF4Ay durch eIF4Gy(572-853) stützt diese Hypothese. Zur experimentellen Verifizierung müsste aber die Nukleotidaffinität des geschlossenen Komplexes mit der von eIF4Ay/Gy(572-853) verglichen werden. Die Anstrengungen, den geschlossenen Komplex von eIF4Ay zu populieren würden von einem spezifischen RNA Substrat profitieren (s. oben).

Betrachtet man die Position der RNA bindenden Motive (Motiv Ia, GG, Ib, IV, QxxR und V, Abbildung 1) zeigt sich, dass durch die von eIF4Gy(572-853) verursachte Konformationsänderung der Kontakt

zwischen Motiv Ia und QxxR möglich wird. Die Einheitszelle der Kristallstruktur von eIF4Ay/Gy(572-853) enthält mehr als ein Molekül. E101 aus Motiv Ia und Q297 aus dem QxxR Motiv bilden eine intermolekulare Wasserstoffbrücke mit dem benachbarten eIF4Ay Molekül (Abbildung 38). Die entsprechenden Reste innerhalb desselben Moleküls befinden sich aber im gleichen Abstand. Damit wäre in einer alternativen Rotamer Konformation der Seitenketten die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen Motiv Ia und QxxR des gleichen eIF4Ay Moleküls möglich (Abbildung 38). Die Elektronendichte der entsprechenden Seitenketten ist nur schlecht definiert, sodass beide Konformationen möglich wären. Motiv Ia und QxxR formen im geschlossenen Komplex einen wichtigen Teil der RNA Bindungsstelle und sorgen durch den Kontakt zwischen N und C terminaler Domäne für die Stabilisierung der geschlossenen Konformation [23, 17]. eIF4Gy(572-853) vermittelt dementsprechend nicht nur einen ersten Interdomänenkontakt, sondern sorgt damit auch für die grobe Ausrichtung der RNA Bindungsstelle. Möglicherweise schafft eIF4Gy(572-853) auf diese Weise auch eine verlängerte RNA Bindungsstelle. Dies würde erklären, weshalb eIF4Ay/Gy(572-853) längere RNA Substrate für die Stimulierung benötigt (Abbildung 23; [68]). Die reduzierte Helikase Aktivität von eIF4Ay in Gegenwart von eIF4Gy(572-853) (Abbildung 20) wäre demnach Folge reduzierter Substrataffinität (Abbildung 32).



**Abbildung 38** (A) Die Bindung von eIF4Gy(572-853) an eIF4Ay ermöglicht den interdomänenkontakt zwischen Motiv Ia und QxxR. In der Kristallstruktur bildet E101 eines eIF4Ay Moleküls (orange) eine Wasserstoffbrücke mit Q297 eines anderen eIF4Ay Moleküls in der Einheitszelle (grau). E101 und Q297 innerhalb eines eIF4Ay Moleküls befinden sich aber im gleichen Abstand, sodass eine alternative Rotamerkonformation (schattiert) eine intramolekulare Wasserstoffbrücke ermöglicht. (B) Mögliches Schema der Beeinflussung der Aktivität von eIF4Ay durch eIF4Gy(572-853). Die Bindung von eIF4Gy(572-853) ermöglicht den ersten Interdomänenkontakt in eIF4Ay und orientiert damit möglicherweise die RNA Bindungsstelle (grau) (1). In der eIF4Gy(572-853) gebundenen Konformation besteht kein sterischer Konflikt zwischen der potentiellen RNA Bindungsstelle und Motiv Ib. Wenn der Kontakt in der sekundären Bindungsstelle abbricht, ist der Übergang in die geschlossene Konformation möglich (2). Jetzt kollidiert Motiv Ib mit der gebundenen RNA (schwarz) und verursacht den in den Kristallstrukturen beobachteten Knick. Der Übergang zwischen der geschlossenen und eIF4Gy(572-853) gebundenen Konformation von eIF4Ay (2) macht die Nukleotidbindungstasche zugänglich und beschleunigt dadurch den Nukleotidaustausch, ohne gleichzeitig den Interdomänenkontakt komplett zu zerstören. Der direkte Übergang zwischen der offenen und der geschlossenen Konformation (3) beschreibt auch die konformationellen Dynamik in Abwesenheit von eIF4Gy(572-853).

Die Kristallstrukturen der geschlossenen Helikase Konformation zeigen einen Knick im Verlauf des Rückgrats der gebundenen ssRNA [17, 24]. Dieser Knick in der ssRNA wird durch sterische Konflikte u.a. mit Motiv Ib erzwungen und hat vermutlich die Destabilisierung von RNA Doppelsträngen zur Folge [17, 32]. Im Komplex von eIF4Ay mit eIF4Gy(572-853) würde dieser sterische Konflikt zwischen Motiv Ib und der möglichen RNA Bindungsstelle nicht auftreten. Da die RNA Bindungsstelle nicht durch Motiv Ib begrenzt wird wäre die Bindung längerer RNA Substrate plausibel. Sobald die sekundäre Bindungsstelle die N-terminale Domäne von eIF4A freigibt, wäre der Übergang vom eIF4Ay/Gy(572-853)/RNA Komplex zum geschlossenen eIF4A/RNA Komplex möglich. Das Motiv Ib würde dann mit der RNA kollidieren und zur Destabilisierung der gebundenen RNA Doppelhelix führen. Abbildung 38 skizziert die Wirkung auf die Nukleotidbindungstasche sowie die RNA Bindungsstelle in einem möglichen Mechanismus der Wechselwirkung zwischen eIF4Ay und eIF4Gy(572-853).

#### Das Q Motiv vermittelt zwischen eIF4G und eIF4A

Tabelle 10 fasst die Ergebnisse aus der Charakterisierung von eIF4Ay in Gegenwart von eIF4Gy(572-853) und deren Mutanten zusammen. Im Allgemeinen korreliert die Änderung der Konformation von eIF4Ay mit der Stimulierung seiner ATPase und der Inhibition seiner Helikase Aktivität, wie sie nach dem in Abbildung 38 skizzierten Mechanismus erwartet wurde. Allerdings wurde für die ATPase Aktivität von eIF4Ay E43R mit eIF4Gy(572-853) ein abweichendes Verhalten beobachtet. Obwohl eine Konformationsänderung in Gegenwart von eIF4Gy(572-853) beobachtet wurde (Abbildung 36) konnte kein Einfluss auf die ATPase Aktivität von eIF4A detektiert werden (Abbildung 31).

**Tabelle 10** Einfluss von eIF4Gy(572-853) auf Konformation, Helikase und ATPase Aktivität von eIF4Ay.

eIF4Ay	Komplex eIF4Gy(572-853)	Konformations- änderung	ATP Hydrolyseaktivität	Entwindungs- aktivität
wildtyp	wildtyp	+++	+++	---
wildtyp	R835E	0	0	(-)
E43R	wildtyp	+++	0	---
E43R	R835E	+	+	0
wildtyp	K831E S834D R835E	0	0	(-)
E43R	K831E S834D R835E	0	0	0

Die Konformationsänderung tritt auf, obwohl durch den Austausch von E43R der direkte Wechselwirkungspartner von R835 in eIF4Gy entfernt wurde. Umgedreht hat der Austausch des anderen Partners der Salzbrücke aber zur Folge, dass die Konformation von eIF4Ay nicht beeinflusst

werden kann (Abbildung 36). Dies könnte darauf hindeuten, dass R835 neben E43 noch einen weiteren Wechselwirkungspartner hat. Auch Aminosäure 44 ist ein Glutamat. Möglicherweise kompensiert E44 die Ladung von E43R, sodass es zu keiner Abstoßung mit R835 aus eIF4G(572-853) kommt, oder E44 kann im Bezug auf die Konformationsänderung E43 gleichwertig ersetzt werden. In diesem Fall würde die eIF4A E43R E44A Doppelmutante die Konformationsänderung durch eIF4G(572-853) verhindern. eIF4Ay E43R wird durch eIF4G(572-853) zwar in seiner Konformation beeinflusst (Abbildung 36), eine Stimulierung der ATP Hydrolyse wurde jedoch nicht festgestellt (Abbildung 31). Deshalb kann das in Abbildung 38 gezeigte Schema nicht ohne Ergänzungen aufrecht erhalten werden.

Die Salzbrücke zwischen eIF4Ay E43 und eIF4G R835 scheint für die Stimulierung der ATPase Aktivität von Bedeutung zu sein. Glutamat 43 liegt innerhalb des Q Motivs. Das Q Motiv grenzt DEAD Box Proteine von DExD/H Proteinen ab und wird für die Selektivität der Hydrolyse von Adenosinnukleotiden verantwortlich gemacht. Adenosinnukleotide werden durch eine spezifische Wechselwirkung mit dem konservierten Glutamat erkannt [124, 118]. E43 wird von konservierten Resten des Q Motiv eingeschlossen, ist aber selbst nicht für alle DEAD Box Proteine, sondern nur innerhalb der eIF4A Proteine konserviert. Möglicherweise handelt es sich um eine konservierte Wechselwirkung zwischen eIF4A und eIF4G, bei der eIF4G über R835 und E43 Einfluss auf das Q Motiv und damit auf die ATP Hydrolyse nimmt.

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass eIF4G die Aktivität von eIF4A auf verschiedene Arten beeinflusst. eIF4G stabilisiert eIF4A in einer Konformation in der ein erster Kontakt zwischen den RecA artigen Domänen über Motiv Ia und QxxR möglich wird. In diesem Komplex ist die Nukleotidbindungsstelle nicht ausgerichtet, und eine schnelle Assoziation und Dissoziation der Nukleotide ist möglich. Daneben beeinflusst eIF4G die ATPase Aktivität von eIF4A möglicherweise über die Wechselwirkung mit dem Q-Motiv.

Die Regulation des Helikasekerns durch wechselwirkende Proteine stellt sich damit ebenso vielseitig und abwechslungsreich dar, wie die Aktivitäten und Aufgaben innerhalb der Familie der DEAD Box Proteine. Die Erkenntnisse dieser Arbeit führten zum Vorschlag eines Mechanismus der Beeinflussung von eIF4A durch die mittlere Domäne von eIF4G. Die systematische Erforschung des Einfluss von Proteindomänen auf die Aktivität des Helikasekerns steht aber erst an ihrem Anfang.



## VI. Ausblick

Aufgrund der Daten zur Beeinflussung der ATPase und Helikase Aktivität eIF4Ay und eIF4Gy(572-853) wurde ein Modell zur Beeinflussung der Aktivität von eIF4A durch die mittlere Domäne von eIF4G vorgeschlagen (Abbildung 38). Nachfolgende Arbeiten sollten dieses **Modell kritisch überprüfen**, indem die Vorhersagen des Modells getestet werden.

### **Hat die isolierte NTD dieselbe Nukleotid Affinität wie eIF4Ay/Gy(572-853)?**

Die isolierte NTD von eIF4A müsste ähnliche Affinität zu Nukleotiden zeigen wie eIF4Ay und eIF4Ay/Gy(572-853), da die Beschleunigung der Nukleotidfreisetzung durch die Öffnung der Nukleotidbindungstasche und damit den Abbruch der Kontakte mit den Motiven der CTD erklärt wurde. Dazu ist die Charakterisierung der Nukleotidbindung der isolierten NTD von eIF4Ay erforderlich. Anhand der systematischen Untersuchung der Dissoziations- und Assoziationsraten von eIF4Ay mit und ohne eIF4Gy(572-853) in *stopped flow* Experimenten könnte überprüft werden, ob, in Übereinstimmung mit dem vorgeschlagenen Modell, Mutationen in der sekundären Bindungsstelle den Nukleotidaustausch nicht beschleunigen.

### **Ist der Kontakt zwischen E101 und Q297 notwendig und hat er Einfluss auf die RNA Bindung?**

Durch den Einfluss von eIF4Gy(572-853) kommen sich die Motiv Ia und QxxR in eIF4Ay nahe. Die Wechselwirkung zwischen E101 und Q297 stellt den ersten interdomänen Kontakt her und orientiert die RNA Bindungsstelle. Die Deletion der entsprechenden Aminosäure würde zeigen, ob und welchen Einfluss dieser interdomänen Kontakt auf die Konformation und Aktivität von eIF4Ay oder die Bindung von RNA hat.

### **Welche Rolle spielt die Wechselwirkung von eIF4G mit dem Q Motiv?**

eIF4Gy(572-853) kontaktiert über eIF4Ay E43R das Q Motiv. Wie dadurch Einfluss auf die ATPase ausgeübt wird ist nicht bekannt. Da das Q Motiv für die selektive Hydrolyse von Adenosinnukleotiden verantwortlich ist, wäre möglich, dass die Wechselwirkung zwischen eIF4Ay und eIF4Gy(572-853) die Spezifität von eIF4Ay für Adenosinnukleotide beeinflusst und im Komplex mit eIF4Gy(572-853) auch andere Nukleotide hydrolysiert werden können.

### **Wie beeinflusst die RNA Substratlänge die ATPase und Helikase Aktivität von eIF4A?**

Die Bindung der RNA kann indirekt durch die Stimulierung der ATPase Aktivität beurteilt werden. Bisher erfolgte die Stimulierung der ATPase Aktivität durch polyU RNA undefinierter Länge. Die systematische Untersuchung des Einfluss der RNA Substratlänge auf die Stimulierung der ATPase ist aber notwendig, da die Inhibition der Helikaseaktivität von eIF4A durch eIF4Gy(572-853) (Abbildung 23) sowie die fehlende Stimulierung durch kurzen ptRNA (Abbildung 32) zum Teil auf die Abhängigkeit der RNA Affinität von der Substratlänge zurückgeführt wurden. Es ist bekannt, dass die Länge der RNA die Bindung an eIF4A verbessert [113], und dass in Gegenwart von anderen Initiationsfaktoren bevorzugt längere RNA Substrate an eIF4A binden [68, 65]. Die experimentelle Verifizierung für den konkreten Fall der Wechselwirkung zwischen eIF4Ay und eIF4Gy(572-853) steht aber noch aus.

### **Führt die Stabilisierung der sekundären Bindungsstelle zur Inhibition der ATPase Aktivität von eIF4Ay?**

Der vorgeschlagene Mechanismus der Beeinflussung von eIF4Ay durch eIF4Gy(572-853) (Abbildung 38) beruht auf der unterschiedlichen Stabilität der Kontaktflächen zwischen eIF4Ay und eIF4Gy(572-853). Es wurde gezeigt, dass beide Kontaktflächen durch Erhöhung der Salzkonzentration destabilisiert werden können (Abbildung 30). Die Untersuchung der eIF4A Aktivität in Abhängigkeit der Salzkonzentration würde die Korrelation der Aktivität mit der Stabilität der Kontaktflächen ermöglichen. Es ist zu erwarten, dass die Reduktion der Salzkonzentration zur Stabilisierung der elektrostatischen Wechselwirkungen in der sekundären Bindungsstelle führen. Möglicherweise schränkt die Stabilisierung der Wechselwirkung in der sekundären Bindungsstelle die konformationelle Dynamik von eIF4A so sehr ein, dass keine Stimulierung der ATPase Aktivität mehr möglich ist.

### **Gibt es wirklich kein spezifisches Substrat?**

In dieser Arbeit konnte kein spezifisches Substrat für eIF4A gefunden werden. Da die Charakterisierung von eIF4A aber deutlich von der Stimulierung durch ein spezifisches Substrat profitieren würde, sollte die Suche fortgesetzt werden. Ein spezifisches Substrat würde die Aussagekraft der Aktivitätstests stärken und den direkten Vergleich von ATPase- und Helikasetest ermöglichen. Die Ursachen für die Wechselwirkung zwischen BC1 RNA und eIF4A wurde inzwischen auf die 3' Domäne von BC1 RNA eingegrenzt [80], sodass sich weitere Untersuchungen auf diese Domäne konzentrieren sollten. Laut neuen Erkenntnissen bindet eIF4A im Komplex mit der mittleren Domäne von eIF4G spezifisch an IRES RNA Sequenzen [56]. Obwohl die RNA Bindung über die mittlere Domäne von eIF4G vermittelt wird, wäre eventuell die Bildung eines eIF4A/RNA/Nukleotidkomplex möglich.

Von einer indirekten Wechselwirkung mit RNA oder einem hochaffinen Substrat für eIF4A würde auch die Suche nach der **geschlossenen Konformation** von eIF4A profitieren. Diese konnte bisher in smFRET Experimenten, voraussichtlich wegen der geringen Substrataffinität, nicht nachgewiesen werden.

### **Wie beeinflussen interagierende Proteine den Helikasekern?**

Die Arbeit zur Beeinflussung von eIF4A durch die HEAT1 Domäne aus eIF4G stellt nur einen kleinen Schritte zur Erforschung der Interaktion zwischen dem Helikasekern und zusätzlichen Domänen dar. Zur allgemeinen Beschreibung der Regulation des Helikasekern durch wechselwirkende Proteine ist der Vergleich verschiedener Interaktionspartnern nötig. Neben der weiteren Erforschung der eIF4A/4G Wechselwirkung ist deshalb die Reinigung und Klonierung anderer eIF4A Interaktionspartner erforderlich. Die Reinigung von eIF4Bm muss optimiert werden, um dessen Aggregationstendenz zu mindern. Für eIF4Alef, eIF4Em und eIF4Gm HEAT2 muss ein Reinigungsprotokoll und für eIF4Gm HEAT1 sowie eIF4Gm die Möglichkeit zur Überproduktion der Proteine entwickelt werden. Die Produktion von eIF4G oder dessen Fragmenten ist möglicherweise als GST-Fusionsprotein möglich. eIF4H sowie weitere Interaktionspartner müssen kloniert werden. Die weiteren Arbeiten zur Wechselwirkung zwischen dem Helikasekern und flankierenden Domänen werden zeigen, ob die hier beschriebene Regulation durch eine starke primäre und eine schwächere sekundäre Wechselwirkung allgemeine Gültigkeit besitzt.

## VII. Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure
AC	Affinitätschromatographie
AIM	Autoinduktionsmedium [93]
AK	Akzeptorkanal
Amp	Ampicillin
β-ME	β-Mercaptoethanol
Cm	Chloramphenicol
DTT	Dithiothreitol
(D)/RNA	(Deoxy)Ribonukleinsäure
DK	Donorkanal
(eIF)4x(m/y/leif)	eukariotischer Translations Initiationsfaktor 4x ( <i>m. musculus/s. cerevisiae</i> )
(sm)FRET	(Einzelmolekül) Förster Resonanz Energie Transfer
IMAC	immobilisiertes Metall Affinitäts Chromatographie
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
(A)IEX	(An)Ionenaustauschchromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IVT	<i>in vitro</i> Transkription
Km	Kanamycin
mant	Methylantraniloyl-
NADH	Nikotinsäureamidadenindinukleotid
ONPG	ortho-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PNK	Polynukleotidkinase
ptRNA	phosphorothiolat RNA
RT	Raumtemperatur
SEC	Größenausschlusschromatographie
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TIPP	thermostabile inorganische Pyrophosphatase
ÜN	über Nacht

## Primersequenzen

**Tabelle 11** Primersequenzen. Für Mutageneseprimer ist nur die Sequenz des Vorwärts Primer angegeben. Der Rückwärts Primer ist das entsprechende Komplement. Abkürzungen: P Purimex, M Microsynth, S SigmaAldrich und I Invitrogen.

Primernr.	Name	Sequenz (5'→3')	von
334	eIF4A_Maus_for	GGC CCA TGG CTG CGA GTC AGG ATT CTC CAT CC	P
335	eIF4A_Maus_rev	GGC CTC GAG TCA AAT GAG GTC AGC AAC GTT GAG GG	P
336	eIF4B_Maus_for	GGC CCA TGG CGG CCT CAG CAA AAA AGA AGA ATA AGA AGG G	P
337	eIF4B_Maus_rev	GGC CTC GAG CTA CTC AGT GCA GTC GTC GCC CTC ATC C	P
725	eIF4E_for	GGGCCATGGCGACTGTGGAACCGG	M
726	eIF4E_rev	CCCCTCGAGTTAAACAACAAACCTATTTTGTAGTGGTGG	M
723	eIF4G_for	CCATGGACAAGCTCCCCAGCCC	M
724	eIF4G_rev	CTCGAGTCAGTTGTGATCAGACTCCTCGTCC	M
880	eIF4G+3_for	GGG CCA TGG ACA AAG CTC CCC AGC CC	M
881	eIF4G+3_rev	CCC CTC GAG TCA GTT GTG ATC AGA CTC CTC GTC C	M
752	eIF4G_middle5'	GCA GCT GAT GAA GCA GGT GAC ACA GC	S
753	eIF4G_middle3'	GCT GTG TCA CCT GCT TCA TCA GCT GC	S
920	eIF4Gm(1226-for)	GTCCATGGATGAGGTGGAGAAGAAATCTAAGG	M
921	eIF4Gm(686-for)	GTGCCATGGGTGGGAGCTGCCCGAGG	M
922	eIF4Gm(rev-1089)	CTTCCATGGTCAGCCCCACTGCTGCCCTTGC	M
727	eIF4H_for	CCATGGCGGACTTCGATACCTACG	M
728	eIF4H_rev	AAGCTTCATTCTTGCTCCTTCTGAACC	M
638	L.inf_for eIF4A	GGG CCA TGG CGC AGA ATG AGA TCG C	M
639	L.inf_rev eIF4A	CCC CTC GAG TTA CTC GCC AAG GTA GGC AGC G	M
421/422	eIF4A_C66A-5'	GCG AGC TAT TCT TCC TGC TAT CAA GGG TTA TG	M
565/566	eIF4A_C66S-5'	GCG AGC TAT TCT TCC TTC TAT CAA GGG TTA TG	M
567/568	eIF4A_C66I-5'	GCG AGC TAT TCT TCC TAT TAT CAA GGG TTA TG	M
471/470	eIF4A_C131A-5'	GGG TGC CTC TGC TCA TGC CTG CAT TGG GGG C	M
593/594	eIF4A_C134S-5'	CCT CTT GTC ATG CCT CCA TTG GGG GC	M
561/562	eIF4A_C131AC134S_5	GGG TGC CTC TGC TCA TGC CTC CAT TGG GGG C	M
563/564	eIF4A_C131AC134A_5	GGG TGC CTC TGC TCA TGC CGC CAT TGG GGG C	M
423/424	eIF4A_C131A/C134V-5'	GGG TGC CTC TGC TCA TGC CGT CAT TGG GGG C	M
425/426	eIF4A_C264S-5'	GGA AGC TTG ACA CAT TGA GTG ACT TGT ATG AGA CGC	M
762/763	eIF4A_T138C_5	GCA TTG GGG GCT GCA ATG TGC GTG C	M
779/780	eIF4A*_T138C_5	CCA TTG GGG GCT GCA ATG TGC GTG C	M
472/473	eIF4A_R141C-5'	GCA CCA ATG TGT GCG CTG AGG TGC AGA AGC TGC	M
476/477	eIF4A_S205C-5'	GAC ATA TTC CAG AAG CTC AAC TGC AAC ACA CAG GTA G	M
764/765	eIF4A_E257C_5	GGA ACG AGA GTG CTG GAA GCT TGA CAC	M
595/596	eIF4A_C264A-5'	GGA AGC TTG ACA CAT TGG CTG ACT TGT ATG AGA CGC	M
474/475	eIF4A_S320C-5'	CAT GAG GGA GTT CCG GTG TGG CTC TAG CAG AG	M
478/479	eIF4A_T351C-5'	CAT CAA CTA TGA CCT TCC CTG CAA CAG GGA AAA CTA CAT CC	M
1047/1048	Am-K82Q-5'	CCAGTCTGGGACTGGGCAAAACAGCTACATTTGC	S
427/428	eIF4A_21Thy-5'	CGA GTC AGG ATT CTC GAT CCA GAG ACA ATG G	M
1000/1001	eIF4Bm_175Nco	GGATGTTGCTGATCAAAGCCATGGATAAAGACAGG	M
999	eIF4Gm_1226NcoTTC	TTCTCCACCTCATCCATGGACAGCGCAGCCTTTGG	M
734/735	eIF4G_NcoI4061_5	GGTGCCAATGGGAGAGCTCTTCAGG	M
736/737	eIF4G_NcoI4103_5	GCCTCTGAGACCAATGGGCAAAGC	M
738/739	eIF4H_NcoI81_5	GGTGCCACGGGTCCCGGAGC	M
641/642	LeIF_C128A-5'	GC TCC AAG TTC GCC GAG ACC TTT GTC G	M
979	eIF4Ay_C124A-3'	GGAAGTACCACCGATAGCAGCGTGGACCTT	M
980	eIF4Ay_C124A-5'	CAAGGTCCACGCTGCTATCGGTGGTACTTCC	M
982/981	eIF4Ay_C250A-5'	GAATACAAATACGAGGCTTTGACCGATTTATACG	M
984/983	eIF4Ay_C267A-5'	CAAGCTGTCATCTTCGCTAACACCAGAAGAAAGG	M
1117/1118	eIF4Ay_E28C-5'	CAAGTTCGATGATATGTGTTTGGACGAAAAC	S
1119/1120	eIF4Ay_S87C-5'	GCAAAGAATTGACACCTGTGTCAAGGCTCC	S
1121/1122	eIF4Ay_A112C-5'	GGTTGTCTATGTGTTTGGCTTTCCACATGG	S
1040/1039	Ay-T128C-5'	GCTTGTATCGGTGGTTGTTCCCTTTGTTGAAGACG	S
1041/1042	Ay-E135C-5'	CCTTTGTTGAAGACGCTTGTGGTTTGGAGAGATGC	S
891/892	eIF4Ay_Q186C5	GGAACAAATCTACTGCATTTTCACTTACTTCC	M
1045/1046	Ay-E242C-5'	CGTTAATGTTGAAGATGTGAAGAATACAAATACG	S
1043/1044	Ay-E249C-5'	GAAGAATACAAATACTGTTGTTTACCAGATTTATACG	S
1123/1124	eIF4Ay_T269C-5'	GCTGTCTACTTCTGTAAGTGCAGAAAGAAAGG	S
1067/1068	eIF4Ay_E305C-5'	CCATCATGAAGTGTTCAGAAAGTGG	S
889/890	eIF4Ay_G370C5	CGAAGACGTTTGGCTATGAGAGAAC	M
1051/1052	Gy_N577C-5'	CTTGTTCAGAGTCTTGTAGGTGGGTGC	S
1053/1054	Gy_S727C-5'	CCTGAGATGATGTGCGAAGAGTACTATGC	S
986/978	Gy572-853_W638C-5	GCAAACATATCAGTATGCGAAACAAATGGTGA AAC	M

1055/1056	Gy_I841C-5'	CAAGTTC AAGTTGTGCGGACATTAAAG	S
1066/1065	eIF4Ay_E43R-5'	CGGTTACGGTTTCAGAGAACCATCTGC	S
1049/1050	Ay-K72Q-5'	CAATCTGGTACTGGTCAGACCGGTACC	S
1087/1088	Gy_R835E-5'	GCTAAGATTTCTAGTGAGATCAAGTTC AAG	S
1035/1036	Gy_R835D-5'	GCTAAGATTTCTAGTGACATCAAGTTC AAG	S
1037/1038	Gy_destab-5'	GCTAAGATTTCTAGGCAATCGAGGCCAAGTTGATCGCCATTAAAG	S
1033/1034	Gy_stab-5'	TCAAAC TGGTGAGATTTCTGATGAAATCAAGTTC AAG	S
1105/1106	eIF4Gy_K590_5	GAC TGA AAA GAA GCT AGC CCC TG	S
1002/1003	pBAD_XhoI-5'	GGGATCCTCGAGAGTCGACCTGCAG	S
37	pGEXf	GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG	M
94	T7 Promotor	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	M
95	T7 Terminator	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G	M
339	eIF4B_middle	CGT GTG GAT GTT GCT GAT CAA GC	P
729	eIF4G_mid1	GCAGTCTGGAGCCTCAACC	M
730	eIF4G_mid2	GGCTCCTTCAGATACTTCTCC	M
731	eIF4G_mid3	CCAATCTTGGCCGACCAGC	M
732	eIF4G_mid4	GCAATAATGCATGACTGTGTGG	M
733	eIF4G_mid5	CGTGTGTGACAGAGGAGTAGC	M
1004	pBAD24seq5	CTGTTTCTCCATACCCGTT	S
1005	pBAD24seq3	CTCATCCGCCAAAACAG	S
450	DNA-10mer-trap	ACC GTA AAG C	M
840	Malachite Green Aptamer	GGG AAT GGA TCC ACA TCT ACG AGG ATC CCG ACT GGC GAG AGC CAG GTA ACG AAT GGA TCC TTC ACT GCA GAC TTG ACG AAG CTT	I
841	Primer1 SELEX	GAT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAA TGG ATC CAC ATC TAC GA	I
842	Primer2 SELEX	AAG CTT CGT CAA GTC TGC AGT GAA	I
950	Ruck	GCGAGACCAATGCTCAGTGTCACGGCCACCGAAGAAACGCCCTAATCCC	M
951	Zuck	GCTGGACACTGAGCATTGGTCTCGCGGGATTAGGGCGTTTCTTCGGTGCC	M
952	Gyr5-ruck	GCTGCAAGCTATGCATGATCATAGCTCGACTAGCGGCACCGAAGAAACGCCCTAATCCC	M
953	Zuck-gyr3	GCTAGAGTCGACGTATGATCATGATAGCTTGCAGCGGGATTAGGGCGTTTCTTCGGTGCC	M
985	polyG-18mer'	GGGGGGGGGGGGGGGGGG	M
1012	BC1(rev-152)	AAA GGT TGT GTG TGC CAG TTA CC	S
1013	BC1(rev-141)	GTG CCA GTT ACC TTG	S
1014	BC1(rev-74)	GGA GCT GAG GAC CGA ACC	S
469	T7_prom_ivt	TAA TAC GAC TCA CTA TA	M

## Stammsammlung

**Tabelle 12** Alle verwendeten Bakterienstämme. Proteine im Stamm *Arctic Express* (DE3) wurden nach dem modifizieren Reinigungsprotokoll für schwerlösliche Cysteinmutanten von eIF4Am gereinigt (Seite 33)

Nummer	Insert	Mutation(en)	Plasmid	Stamm	Restriktionsstellen
182	eIF4Am		pETM30	XL1-blue	NcoI XhoI
183	eIF4Am		pETM30	Rosetta(DE3)	NcoI XhoI
1080	eIF4Am		pBAD24Xho	XL1-blue	NcoI XhoI
1000	eIF4Am		pET28a	XL1-blue	NcoI XhoI
1001	eIF4Am		pET28a	Rosetta(DE3)	NcoI XhoI
1002	eIF4Am	ACCC	pET28a	XL1-blue	NcoI XhoI
1003	eIF4Am	ACCC	pET28a	Rosetta(DE3)	NcoI XhoI
1004	eIF4Am	CAVC	pET28a	XL1-blue	NcoI XhoI
1005	eIF4Am	CAVC	pET28a	Rosetta(DE3)	NcoI XhoI
1006	eIF4Am	CCCS	pET28a	XL1-blue	NcoI XhoI
1007	eIF4Am	CCCS	pET28a	Rosetta(DE3)	NcoI XhoI
1008	eIF4Am	ACCS	pET28a	XL1-blue	NcoI XhoI
1009	eIF4Am	ACCS	pET28a	Rosetta(DE3)	NcoI XhoI
1010	eIF4Am	AAVC	pET28a	XL1-blue	NcoI XhoI
1011	eIF4Am	AAVC	pET28a	Rosetta(DE3)	NcoI XhoI
1012	eIF4Am	CAVS	pET28a	XL1-blue	NcoI XhoI
1013	eIF4Am	CAVS	pET28a	Rosetta(DE3)	NcoI XhoI
1014	eIF4Am	AAVS	pET28a	XL1-blue	NcoI XhoI
1015	eIF4Am	AAVS	pET28a	Rosetta(DE3)	NcoI XhoI
1016	eIF4Am	CACC	pET28a	XL1-blue	NcoI XhoI
1017	eIF4Am	CACC	pET28a	Rosetta(DE3)	NcoI XhoI
1018	eIF4Am	CCSC	pET28a	XL1-blue	NcoI XhoI
1019	eIF4Am	CCSC	pET28a	Rosetta(DE3)	NcoI XhoI
1020	eIF4Am	CASC	pET28a	XL1-blue	NcoI XhoI
1021	eIF4Am	CASC	pET28a	Rosetta(DE3)	NcoI XhoI
1022	eIF4Am	AACS	pET28a	XL1-blue	NcoI XhoI

1023	eIF4Am	AACS		pET28a	Rosetta(DE3)	NcoI	XhoI
1024	eIF4Am	CAAC		pET28a	XL1-blue	NcoI	XhoI
1025	eIF4Am	CAAC		pET28a	Rosetta(DE3)	NcoI	XhoI
1026	eIF4Am	CASC		pET28a	XL1-blue	NcoI	XhoI
1027	eIF4Am	CASC		pET28a	Rosetta(DE3)	NcoI	XhoI
1028	eIF4Am	SASC		pET28a	XL1-blue	NcoI	XhoI
1029	eIF4Am	SASC		pET28a	Rosetta(DE3)	NcoI	XhoI
1030	eIF4Am	IASC		pET28a	XL1-blue	NcoI	XhoI
1031	eIF4Am	IASC		pET28a	Rosetta(DE3)	NcoI	XhoI
1032	eIF4Am	SASS		pET28a	XL1-blue	NcoI	XhoI
1033	eIF4Am	SASS		pET28a	Rosetta(DE3)	NcoI	XhoI
1034	eIF4Am	CAVA		pET28a	XL1-blue	NcoI	XhoI
1035	eIF4Am	CAVA		pET28a	Rosetta(DE3)	NcoI	XhoI
1036	eIF4Am	LAVS		pET28a	XL1-blue	NcoI	XhoI
1037	eIF4Am	LAVS		pET28a	Rosetta(DE3)	NcoI	XhoI
1038	eIF4Am	CAAS		pET28a	XL1-blue	NcoI	XhoI
1039	eIF4Am	LAVS		pET28a	Rosetta(DE3)	NcoI	XhoI
1040	eIF4Am	CAAA		pET28a	XL1-blue	NcoI	XhoI
1041	eIF4Am	CAAA		pET28a	XL1-blue	NcoI	XhoI
1042	eIF4Am	AAAA		pET28a	XL1-blue	NcoI	XhoI
1043	eIF4Am	AAAA		pET28a	Rosetta(DE3)	NcoI	XhoI
1044	eIF4Am	SAAA		pET28a	XL 1 (BLUE)	NcoI	XhoI
1045	eIF4Am	SAAA		pET28a	Rosetta(DE3)	NcoI	XhoI
1046	eIF4Am	IAAA		pET28a	XL1-blue	NcoI	XhoI
1047	eIF4Am	IAAA		pET28a	Rosetta(DE3)	NcoI	XhoI
1048	eIF4Am	IAAA		pETM30	XL1-blue	NcoI	XhoI
1049	eIF4Am	IAAA		pETM30	Rosetta(DE3)	NcoI	XhoI
91	eIF4Am	IAAA		pETM30	Arctic Express (DE3)	NcoI	XhoI
92	eIF4Am	IAAA		pET28a	Arctic Express (DE3)	NcoI	XhoI
88	eIF4Am	IAAA R141C		pETM30	Arctic Express (DE3)	NcoI	XhoI
85	eIF4Am	IAAA R141C		pETM30	XL1-blue	NcoI	XhoI
89	eIF4Am	IAAA S205C		pETM30	Arctic Express (DE3)	NcoI	XhoI
86	eIF4Am	IAAA S205C		pETM30	XL1-blue	NcoI	XhoI
87	eIF4Am	IAAA T351C		pETM30	XL1-blue	NcoI	XhoI
90	eIF4Am	IAAA T351C		pETM30	Arctic Express (DE3)	NcoI	XhoI
96	eIF4Am	IAAA E257C		pETM30	XL1-blue	NcoI	XhoI
97	eIF4Am	IAAA E257C		pETM30	Arctic Express (DE3)	NcoI	XhoI
94	eIF4Am	IAAA R141C T351C		pETM30	XL1-blue	NcoI	XhoI
95	eIF4Am	IAAA R141C T351C		pETM30	Arctic Express (DE3)	NcoI	XhoI
98	eIF4Am	IAAA T138C E257C		pETM30	XL1-blue	NcoI	XhoI
99	eIF4Am	IAAA T138C E257C		pETM30	Arctic Express (DE3)	NcoI	XhoI
178	eIF4Am	CAAC R141C		pET28a	XL1-blue	NcoI	XhoI
179	eIF4Am	CAAC S205C		pET28a	XL1-blue	NcoI	XhoI
1057	eIF4Am	CAAC E257C		pET28a	XL1-blue	NcoI	XhoI
1059	eIF4Am	CAAC S320C		pET28a	XL1-blue	NcoI	XhoI
1061	eIF4Am	CAAC T351C		pET28a	XL1-blue	NcoI	XhoI
180	eIF4Am	CAAC R141C T351C		pET28a	XL1-blue	NcoI	XhoI
181	eIF4Am	CAAC R141C T351C		pET28a	Rosetta(DE3)	NcoI	XhoI
1054	eIF4Am	CAAC R141C T351C		pET28a	Rosetta2(DE3)	NcoI	XhoI
1063	eIF4Am	CAAC T138C S320C		pET28a	XL1-blue	NcoI	XhoI
1064	eIF4Am	CAAC T138C S320C		pET28a	Rosetta2(DE3)	NcoI	XhoI
1065	eIF4Am	CAAC S205C E257C		pET28a	XL1-blue	NcoI	XhoI
1066	eIF4Am	CAAC S205C E257C		pET28a	Rosetta2(DE3)	NcoI	XhoI
1067	eIF4Am	CAAC R141C E257C		pET28a	XL1-blue	NcoI	XhoI
1068	eIF4Am	CAAC R141C E257C		pET28a	Rosetta2(DE3)	NcoI	XhoI
1069	eIF4Am	CAAC R141C S320C		pET28a	XL1-blue	NcoI	XhoI
1071	eIF4Am	CAAC E138C E257C		pET28a	XL1-blue	NcoI	XhoI
1072	eIF4Am	CAAC E138C E257C		pET28a	Rosetta2(DE3)	NcoI	XhoI
1050	eIF4Bm			pET28a	XL1-blue	NcoI	XhoI
1051	eIF4Bm			pET28a	Rosetta(DE3)	NcoI	XhoI
1056	eIF4Bm			pET28a	Rosetta2(DE3)	NcoI	XhoI
1073	eIF4Bm	Q175M		pET28a	XL1-blue	NcoI	XhoI
1074	eIF4Bm(176-611)	Q175M		pET28a	XL1-blue	NcoI	XhoI
1075	eIF4Bm(176-611)	Q175M		pET28a	Rosetta2(DE3)	NcoI	XhoI
1052	eIF4Em			pET28a	XL1-blue	NcoI	XhoI
1053	eIF4Em			pET28a	Rosetta(DE3)	NcoI	XhoI
84	eIF4Gm			pYX-Asc	DH10b TonA	EcoRI	NotI
93	eIF4Gm	Nukleinsäuren:	C4062A	pYX-Asc	XL1-blue	EcoRI	NotI

		C4104A					
		ohne	NcoI	Schnittstellen			
		(C4020A, C4062A)					
172	eIF4Gm			pET28a	XL1-blue	NcoI	XhoI
173	eIF4Gm			pET28a	Rosetta(DE3)	NcoI	XhoI
196	Gm(686-1089)			pET28a	XL1-blue	NcoI	XhoI
197	Gm(686-1089)			pET28a	Rosetta(DE3)	NcoI	XhoI
1055	Gm(686-1089)			pET28a	Rosetta2(DE3)	NcoI	XhoI
1078	Gm(1226-1600)			pETM30	XL1-blue	NcoI	XhoI
1079	Gm(1226-1600)			pETM30	Rosetta2(DE3)	NcoI	XhoI
174	eIF4Ay			pET28a	XL1-blue	NdeI	XhoI
175	eIF4Ay			pET28a	BL21(DE3)	NdeI	XhoI
1141	eIF4Ay	K72Q		pET28a	XL1-blue	NdeI	XhoI
1142	eIF4Ay	K72Q		pET28a	BL21(DE3)	NdeI	XhoI
1121	eIF4Ay	ACC		pET28a	XL1-blue	NdeI	XhoI
1122	eIF4Ay	ACC		pET28a	BL21(DE3)	NdeI	XhoI
1123	eIF4Ay	CAC		pET28a	XL1-blue	NdeI	XhoI
1124	eIF4Ay	CAC		pET28a	BL21(DE3)	NdeI	XhoI
1125	eIF4Ay	CCA		pET28a	XL1-blue	NdeI	XhoI
1126	eIF4Ay	CCA		pET28a	BL21(DE3)	NdeI	XhoI
1127	eIF4Ay	ACA		pET28a	XL1-blue	NdeI	XhoI
1128	eIF4Ay	ACA		pET28a	BL21(DE3)	NdeI	XhoI
1131	eIF4Ay	AAA		pET28a	XL1-blue	NdeI	XhoI
1132	eIF4Ay	AAA		pET28a	BL21(DE3)	NdeI	XhoI
1139	eIF4Ay	Q186C		pET28a	XL1-blue	NdeI	XhoI
1140	eIF4Ay	Q186C		pET28a	Rosetta(DE3)	NdeI	XhoI
187	eIF4Ay	G370C		pET28a	XL1-blue	NdeI	XhoI
334	eIF4Ay	G370C		pET28a	BL21(DE3)	NdeI	XhoI
1153	eIF4Ay	E242C		pET28a	XL1-blue	NdeI	XhoI
1154	eIF4Ay	E242C		pET28a	BL21(DE3)	NdeI	XhoI
1183	eIF4Ay	A112C		pET28a	XL1-blue	NdeI	XhoI
1184	eIF4Ay	A112C		pET28a	BL21(DE3)	NdeI	XhoI
190	eIF4Ay	Q186C G370C		pET28a	XL1-blue	NdeI	XhoI
195	eIF4Ay	Q186C G370C		pET28a	BL21(DE3)	NdeI	XhoI
1143	eIF4Ay	Q186C E242C		pET28a	XL1-blue	NdeI	XhoI
1144	eIF4Ay	Q186C E242C		pET28a	BL21(DE3)	NdeI	XhoI
1145	eIF4Ay	Q186C E249C		pET28a	XL1-blue	NdeI	XhoI
1146	eIF4Ay	Q186C E249C		pET28a	BL21(DE3)	NdeI	XhoI
1147	eIF4Ay	T135C G370C		pET28a	XL1-blue	NdeI	XhoI
1148	eIF4Ay	T135C G370C		pET28a	BL21(DE3)	NdeI	XhoI
1171	eIF4Ay	Q186C E305C		pET28a	XL1-blue	NdeI	XhoI
1172	eIF4Ay	Q186C E305C		pET28a	BL21(DE3)	NdeI	XhoI
1177	eIF4Ay	E28C E370C		pET28a	XL1-blue	NdeI	XhoI
1178	eIF4Ay	E28C E370C		pET28a	BL21(DE3)	NdeI	XhoI
1179	eIF4Ay	S87C E370C		pET28a	XL1-blue	NdeI	XhoI
1180	eIF4Ay	S87C E370C		pET28a	BL21(DE3)	NdeI	XhoI
1181	eIF4Ay	A112C E370C		pET28a	XL1-blue	NdeI	XhoI
1182	eIF4Ay	A112C E370C		pET28a	BL21(DE3)	NdeI	XhoI
1185	eIF4Ay	Q186C T269C		pET28a	XL1-blue	NdeI	XhoI
1186	eIF4Ay	Q186C T269C		pET28a	BL21(DE3)	NdeI	XhoI
1155	Ay(1-249)	E249C		pET28a	XL1-blue	NdeI	XhoI
1156	Ay(1-249)	E249C		pET28a	BL21(DE3)	NdeI	XhoI
1159	eIF4Ay	E43R Q186C G370C		pET28a	XL1-blue	NdeI	XhoI
1160	eIF4Ay	E43R Q186C G370C		pET28a	BL21(DE3)	NdeI	XhoI
176	Gy(572-853)	K590R		pET28a	XL1-blue	NdeI	XhoI
177	Gy(572-853)	K590R		pET28a	BL21(DE3) Star RP	NdeI	XhoI
1129	Gy(572-853)	K590R W638C		pET28a	XL1-blue	NdeI	XhoI
1130	Gy(572-853)	K590R W638C		pET28a	BL21(DE3) Star RP	NdeI	XhoI
1133	Gy(572-853)	K590R W638C R835D		pET28a	XL1-blue	NdeI	XhoI
1134	Gy(572-853)	K590R W638C R835D		pET28a	BL21(DE3) RP	NdeI	XhoI
		K590R W638C K831E S834D					
1135	Gy(572-853)	R835E		pET28a	XL1-blue	NdeI	XhoI
		K590R W638C K831E S834D					
1136	Gy(572-853)	R835E		pET28a	BL21(DE3) RP	NdeI	XhoI
		K590R W638C S834E R835A					
		K837E F838A D842A IKE-LRF					
1137	Gy(572-853)	HDKNWN-QSRPS		pET28a	XL1-blue	NdeI	XhoI
		K590R W638C S834E R835A					
1138	Gy(572-853)	K837E F838A D842A IKE-LRF		pET28a	BL21(DE3) RP	NdeI	XhoI

HDKNWN-QSRPS						
1149	Gy(572-853)	K590R S727C	pET28a	XL1-blue	Ndel	XhoI
1150	Gy(572-853)	K590R S727C	pET28a	BL21(DE3) RP	Ndel	XhoI
1151	Gy(572-853)	N577C K590R	pET28a	XL1-blue	Ndel	XhoI
1152	Gy(572-853)	N577C K590R	pET28a	BL21(DE3) RP	Ndel	XhoI
1157	Gy(572-853)	K590R I841C	pET28a	XL1-blue	Ndel	XhoI
1158	Gy(572-853)	K590R I841C	pET28a	BL21(DE3) Star RP	Ndel	XhoI
1161	Gy(572-853)	N577C K590R R835D	pET28a	XL1-blue	Ndel	XhoI
1162	Gy(572-853)	N577C K590R R835D	pET28a	BL21(DE3) Star RP	Ndel	XhoI
1163	Gy(572-853)	K590R R835D I841C	pET28a	XL1-blue	Ndel	XhoI
1164	Gy(572-853)	K590R R835D I841C	pET28a	BL21(DE3) Star RP	Ndel	XhoI
1165	Gy(572-853)	K590R R835E	pET28a	XL1-blue	Ndel	XhoI
1166	Gy(572-853)	K590R R835E	pET28a	BL21(DE3) RP	Ndel	XhoI
1167	Gy(572-853)	N577C K590R R835E	pET28a	XL1-blue	Ndel	XhoI
1168	Gy(572-853)	N577C K590R R835E	pET28a	BL21(DE3) RP	Ndel	XhoI
1169	Gy(572-853)	K590R R835E I841C	pET28a	XL1-blue	Ndel	XhoI
1170	Gy(572-853)	K590R R835E I841C	pET28a	BL21(DE3) RP	Ndel	XhoI
1173	Gy(572-853)	N577C K590R R835E I841C	pET28a	XL1-blue	Ndel	XhoI
1174	Gy(572-853)	N577C K590R R835E I841C	pET28a	BL21(DE3) RP	Ndel	XhoI
1175	Gy(572-853)	N577C K590R I841C	pET28a	XL1-blue	Ndel	XhoI
1176	Gy(572-853)	N577C K590R I841C	pET28a	BL21(DE3) RP	Ndel	XhoI
400	BC1	<i>Rattus norvegicus</i>	pUC13	XL1-blue		

## SELEX Bedingungen

**Tabelle 13** Bedingungen der Selektion für Aptamere für A488 und A546. MG Puffer (100 mM KCl; 10 mM HEPES pH 7,4; 5 mM MgCl<sub>2</sub>), Selektionspuffer Puffer (200 mM KCl; 10 mM HEPES pH 7,4; 5 mM MgCl<sub>2</sub>).

	#1	#2	#3	#4	#5
<b>Kügelchenart</b>	A (Amine)	B (Amine mod)	C (Thiol)		D (Thiol mod)
<b>Kügelchen-konzentration</b>	A <sub>488</sub> 1 mg/mL A <sub>546</sub> 3.75 mg/mL	x	10 mg/mL	1 mg/mL	10 mg/mL
<b>DNA Bib. Größe</b>	30			50	
<b>Puffer</b>	MG Puffer			Selektions Puffer	
<b>Polymerase</b>	Phusion/Taq		Taq		
<b>#Runden</b>	13	0	5	2	2
<b>neg. Selektion</b>	rd.1-5: non-cognate rd. 6-13: non-mod.	A	non-cognate	non-modified	non-modified
<b>T<sub>Inkubation</sub></b>	37°C	N/A	20°C		
<b>RNA</b>	2'-F modifizierte Pyrimidine				

	#6	#7	#8	#9
<b>Kügelchenart</b>	E (DynaL Streptavidin)			F (NEB Strep)
<b>Kügelchen-konzentration</b>	1 mg/mL	5 mg/mL	5 mg/mL Hefe RNA: 10 mg/mL	4 mg/mL Hefe RNA: 10 mg/mL
<b>DNA Bib. Größe</b>	50	30		
<b>Puffer</b>	Selektions Puffer		Selektions Puffer +0.05% TWEEN	MG Puffer
<b>Polymerase</b>	Taq	Phusion		Taq
<b>#Runden</b>	2	12	3	10
<b>neg. Selektion</b>	non-modified	rd. 1-5: non-mod.; rd. 5-10: non-cognate	non-modified and non-cognate	non-cognate
<b>T<sub>Inkubation</sub></b>	20°C			
<b>RNA</b>	2'-F modifizierte Pyrimidine			RNA

## Proteineigenschaften

**Tabelle 14** Molekulargewicht (MW), Absorptionskoeffizient ( $\epsilon$ ), Anzahl der nativen Cysteine und Swiss-Prot Nummer der in dieser Arbeit verwendeten Proteine

	MW [kDa]	$\epsilon$ [ $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ]	Swiss-Prot Nr.	#Cys
eIF4Am	46	34380	P60843	4
eIF4Bm	69	71280	Q8BGD9	3
eIF4Em	25	52940	P63073	4
eIF4Gm	175	107720	Q6NZJ6	15
eIF4Hm	27	15930	Q9WUK2	1
eIF4Ay	45	17880	P10081	3
eIF4Gy(572-853)	32	34950		4
eIF4Aleif	45	17420	A4HRK0	1

## Literaturverzeichnis

- [1] David L Nelson and Michael M Cox, (ed.) (2008) *Lehninger - Principles of Biochemistry (Fifth Edition)*, W.H. Freeman and Company, .
- [2] Venema, J. and Tollervey, D. Dec 1995 *Yeast* **11(16)**, 1629–1650.
- [3] Abdelhaleem, M. Jun 2005 *Clin Biochem* **38(6)**, 499–503.
- [4] Lohman, T. M. and Bjornson, K. P. (1996) *Annu Rev Biochem* **65**, 169–214.
- [5] Kadaré, G. and Haenni, A. L. Apr 1997 *J Virol* **71(4)**, 2583–2590.
- [6] Staley, J. P. and Guthrie, C. Feb 1998 *Cell* **92(3)**, 315–326.
- [7] Py, B., Higgins, C. F., Krisch, H. M., and Carpousis, A. J. May 1996 *Nature* **381(6578)**, 169–172.
- [8] Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N. K., and Linder, P. Feb 2006 *Gene* **367**, 17–37.
- [9] Gorbalenya, A. E. and Koonin, E. V. (1993) *Curr Opin Struct Biol* **3**, 419–429.
- [10] Yang, Q. and Jankowsky, E. Oct 2005 *Biochemistry* **44(41)**, 13591–13601.
- [11] Halls, C., Mohr, S., Campo, M. D., Yang, Q., Jankowsky, E., and Lambowitz, A. M. Jan 2007 *J Mol Biol* **365(3)**, 835–855.
- [12] Rajkowitsch, L., Chen, D., Stampfl, S., Semrad, K., Waldsich, C., Mayer, O., Jantsch, M. F., Konrat, R., Bläsi, U., and Schroeder, R. Nov 2007 *RNA Biol* **4(3)**, 118–130.
- [13] Cheng, Z., Collier, J., Parker, R., and Song, H. Aug 2005 *RNA* **11(8)**, 1258–1270.
- [14] Linder, P. (2006) *Nucleic Acids Res* **34(15)**, 4168–4180.
- [15] Jankowsky, E., Gross, C. H., Shuman, S., and Pyle, A. M. Jan 2001 *Science* **291(5501)**, 121–125.
- [16] Fairman, M. E., Maroney, P. A., Wang, W., Bowers, H. A., Gollnick, P., Nilsen, T. W., and Jankowsky, E. Apr 2004 *Science* **304(5671)**, 730–734.
- [17] Bono, F., Ebert, J., Lorentzen, E., and Conti, E. Aug 2006 *Cell* **126(4)**, 713–725.
- [18] Linder, P., Lasko, P. F., Ashburner, M., Leroy, P., Nielsen, P. J., Nishi, K., Schnier, J., and Slonimski, P. P. Jan 1989 *Nature* **337(6203)**, 121–122.
- [19] Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., and Gay, N. J. (1982) *EMBO J* **1(8)**, 945–951.
- [20] Hilbert, M., Karow, A. R., and Klostermeier, D. Sep 2009 *Biol Chem*. **390(12)**, 1237–1250.
- [21] Caruthers, J. M., Johnson, E. R., and McKay, D. B. Nov 2000 *Proc Natl Acad Sci U S A* **97(24)**, 13080–13085.
- [22] Story, R. M., Li, H., and Abelson, J. N. Feb 2001 *Proc Natl Acad Sci U S A* **98(4)**, 1465–1470.
- [23] Sengoku, T., Nureki, O., Nakamura, A., Kobayashi, S., and Yokoyama, S. Apr 2006 *Cell* **125(2)**, 287–300.
- [24] Andersen, C. B. F., Ballut, L., Johansen, J. S., Chamieh, H., Nielsen, K. H., Oliveira, C. L. P., Pedersen, J. S., Séraphin, B., Hir, H. L., and Andersen, G. R. Sep 2006 *Science* **313(5795)**, 1968–1972.

- [25] vonMoeller, H., Basquin, C., and Conti, E. Mar 2009 *Nat Struct Mol Biol* **16(3)**, 247–254.
- [26] Campo, M. D. and Lambowitz, A. M. Aug 2009 *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **65(Pt 8)**, 832–835.
- [27] Collins, R., Karlberg, T., Lehtiö, L., Schütz, P., van denBerg, S., Dahlgren, L.-G., Hammarström, M., Weigelt, J., and Schüler, H. Apr 2009 *J Biol Chem* **284(16)**, 10296–10300.
- [28] Lorsch, J. R. and Herschlag, D. Feb 1998 *Biochemistry* **37(8)**, 2194–2206.
- [29] Henn, A., Shi, S.-P., Zarivach, R., Ben-Zeev, E., and Sagi, I. Nov 2002 *J Biol Chem* **277(48)**, 46559–46565.
- [30] Low, W.-K., Dang, Y., Bhat, S., Romo, D., and Liu, J. O. Jun 2007 *Chem Biol* **14(6)**, 715–727.
- [31] Theissen, B., Karow, A. R., Köhler, J., Gubaev, A., and Klostermeier, D. Jan 2008 *Proc Natl Acad Sci U S A* **105(2)**, 548–553.
- [32] Karow, A. R. and Klostermeier, D. Jul 2009 *Nucleic Acids Res* **37(13)**, 4464–4471.
- [33] Liu, F., Putnam, A., and Jankowsky, E. Dec 2008 *Proc Natl Acad Sci U S A* **105(51)**, 20209–20214.
- [34] Aregger, R. and Klostermeier, D. Oct 2009 *Biochemistry*.
- [35] Rozen, F., Edery, I., Meerovitch, K., Dever, T. E., Merrick, W. C., and Sonenberg, N. Mar 1990 *Mol Cell Biol* **10(3)**, 1134–1144.
- [36] von derHaar, T. and McCarthy, J. E. G. Oct 2002 *Mol Microbiol* **46(2)**, 531–544.
- [37] Duncan, R. and Hershey, J. W. Jun 1983 *J Biol Chem* **258(11)**, 7228–7235.
- [38] Du, M. X., Johnson, R. B., Sun, X.-L., Staschke, K. A., Colacino, J., and Wang, Q. M. Apr 2002 *Biochem J* **363(Pt 1)**, 147–155.
- [39] Tanner, N. K. (2003) *Cell Cycle* **2(1)**, 18–19.
- [40] Rogers, G. W., Komar, A. A., and Merrick, W. C. (2002) *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **72**, 307–331.
- [41] Lorsch, J. R. and Herschlag, D. Feb 1998 *Biochemistry* **37(8)**, 2180–2193.
- [42] Lamphear, B. J., Kirchweger, R., Skern, T., and Rhoads, R. E. Sep 1995 *J Biol Chem* **270(37)**, 21975–21983.
- [43] Imataka, H., Gradi, A., and Sonenberg, N. Dec 1998 *EMBO J* **17(24)**, 7480–7489.
- [44] Morino, S., Imataka, H., Svitkin, Y. V., Pestova, T. V., and Sonenberg, N. Jan 2000 *Mol Cell Biol* **20(2)**, 468–477.
- [45] Andrade, M. A. and Bork, P. Oct 1995 *Nat Genet* **11(2)**, 115–116.
- [46] Imataka, H. and Sonenberg, N. Dec 1997 *Mol Cell Biol* **17(12)**, 6940–6947.
- [47] Haghghat, A., Svitkin, Y., Novoa, I., Kuechler, E., Skern, T., and Sonenberg, N. Dec 1996 *J Virol* **70(12)**, 8444–8450.
- [48] Svitkin, Y. V., Pause, A., Haghghat, A., Pyronnet, S., Witherell, G., Belsham, G. J., and Sonenberg, N. Mar 2001 *RNA* **7(3)**, 382–394.
- [49] Pestova, T. V. and Kolupaeva, V. G. Nov 2002 *Genes Dev* **16(22)**, 2906–2922.
- [50] Wells, S. E., Hillner, P. E., Vale, R. D., and Sachs, A. B. Jul 1998 *Mol Cell* **2(1)**, 135–140.
- [51] Pyronnet, S., Imataka, H., Gingras, A. C., Fukunaga, R., Hunter, T., and Sonenberg, N. Jan 1999 *EMBO J* **18(1)**, 270–279.
- [52] Raught, B., Gingras, A. C., Gygi, S. P., Imataka, H., Morino, S., Gradi, A., Aebersold, R., and Sonenberg, N. Feb 2000 *EMBO J* **19(3)**, 434–444.
- [53] Berset, C., Zurbriggen, A., Djafarzadeh, S., Altmann, M., and Trachsel, H. Jul 2003 *RNA* **9(7)**, 871–880.
- [54] Prévôt, D., Darlix, J.-L., and Ohlmann, T. (2003) *Biol Cell* **95(3-4)**, 141–156.
- [55] Johannes, G. and Sarnow, P. Dec 1998 *RNA* **4(12)**, 1500–1513.
- [56] deBreyne, S., Yu, Y., Unbehaun, A., Pestova, T. V., and Hellen, C. U. T. Jun 2009 *Proc Natl Acad Sci U S A* **106(23)**, 9197–9202.
- [57] Lomakin, I. B., Hellen, C. U., and Pestova, T. V. Aug 2000 *Mol Cell Biol* **20(16)**, 6019–6029.
- [58] Etchison, D., Milburn, S. C., Edery, I., Sonenberg, N., and Hershey, J. W. Dec 1982 *J Biol Chem* **257(24)**, 14806–14810.
- [59] Kräusslich, H. G., Nicklin, M. J., Toyoda, H., Etchison, D., and Wimmer, E. Sep 1987 *J Virol* **61(9)**, 2711–2718.
- [60] Kolupaeva, V. G., Lomakin, I. B., Pestova, T. V., and Hellen, C. U. T. Jan 2003 *Mol Cell Biol* **23(2)**, 687–698.
- [61] Clemens, M. J., Bushell, M., and Morley, S. J. Dec 1998 *Oncogene* **17(22)**, 2921–2931.

- [62] Nevins, T. A., Harder, Z. M., Korneluk, R. G., and Holcík, M. Feb 2003 *J Biol Chem* **278(6)**, 3572–3579.
- [63] Sonenberg, N. and Hinnebusch, A. G. Feb 2009 *Cell* **136(4)**, 731–745.
- [64] Silverman, E., Edwalds-Gilbert, G., and Lin, R.-J. Jul 2003 *Gene* **312**, 1–16.
- [65] Rozovsky, N., Butterworth, A. C., and Moore, M. J. Oct 2008 *RNA* **14(10)**, 2136–2148.
- [66] Jaramillo, M., Dever, T. E., Merrick, W. C., and Sonenberg, N. Dec 1991 *Mol Cell Biol* **11(12)**, 5992–5997.
- [67] Abramson, R. D., Dever, T. E., and Merrick, W. C. May 1988 *J Biol Chem* **263(13)**, 6016–6019.
- [68] Rogers, G. W., Richter, N. J., Lima, W. F., and Merrick, W. C. Aug 2001 *J Biol Chem* **276(33)**, 30914–30922.
- [69] Richter-Cook, N. J., Dever, T. E., Hensold, J. O., and Merrick, W. C. Mar 1998 *J Biol Chem* **273(13)**, 7579–7587.
- [70] Doepker, R. C., Hsu, W.-L., Saffran, H. A., and Smiley, J. R. May 2004 *J Virol* **78(9)**, 4684–4699.
- [71] Richter, N. J., Rogers, G. W., Hensold, J. O., and Merrick, W. C. Dec 1999 *J Biol Chem* **274(50)**, 35415–35424.
- [72] Rogers, G. W., Richter, N. J., and Merrick, W. C. Apr 1999 *J Biol Chem* **274(18)**, 12236–12244.
- [73] Oguro, A., Ohtsu, T., Svitkin, Y. V., Sonenberg, N., and Nakamura, Y. Apr 2003 *RNA* **9(4)**, 394–407.
- [74] Wang, H., Iacoangeli, A., Popp, S., Muslimov, I. A., Imataka, H., Sonenberg, N., Lomakin, I. B., and Tiedge, H. Dec 2002 *J Neurosci* **22(23)**, 10232–10241.
- [75] Lin, D., Pestova, T. V., Hellen, C. U. T., and Tiedge, H. May 2008 *Mol Cell Biol* **28(9)**, 3008–3019.
- [76] Tiedge, H., Fremeau, R. T., Weinstock, P. H., Arancio, O., and Brosius, J. Mar 1991 *Proc Natl Acad Sci U S A* **88(6)**, 2093–2097.
- [77] Muslimov, I. A., Banker, G., Brosius, J., and Tiedge, H. Jun 1998 *J Cell Biol* **141(7)**, 1601–1611.
- [78] Rozhdetsvensky, T. S., Kopylov, A. M., Brosius, J., and Hüttenhofer, A. May 2001 *RNA* **7(5)**, 722–730.
- [79] Cheng, J. G., Tiedge, H., and Brosius, J. Jul 1996 *DNA Cell Biol* **15(7)**, 549–559.
- [80] Wang, H., Iacoangeli, A., Lin, D., Williams, K., Denman, R. B., Hellen, C. U. T., and Tiedge, H. Dec 2005 *J Cell Biol* **171(5)**, 811–821.
- [81] Tiedge, H., Bloom, F. E., and Richter, D. Jan 1999 *Science* **283(5399)**, 186–187.
- [82] Narberhaus, F., Waldminghaus, T., and Chowdhury, S. Jan 2006 *FEMS Microbiol Rev* **30(1)**, 3–16.
- [83] Schütz, P., Bumann, M., Oberholzer, A. E., Bieniossek, C., Trachsel, H., Altmann, M., and Baumann, U. Jul 2008 *Proc Natl Acad Sci U S A* **105(28)**, 9564–9569.
- [84] Chang, J. H., Cho, Y. H., Sohn, S. Y., Choi, J. M., Kim, A., Kim, Y. C., Jang, S. K., and Cho, Y. Mar 2009 *Proc Natl Acad Sci U S A* **106(9)**, 3148–3153.
- [85] Foerster, T. (1959) *Discussions of the Faraday Society* **27**, 7–17.
- [86] Tuerk, C. and Gold, L. Aug 1990 *Science* **249(4968)**, 505–510.
- [87] Ellington, A. D. and Szostak, J. W. Aug 1990 *Nature* **346(6287)**, 818–822.
- [88] Marinus, M. G. and Morris, N. R. Jun 1973 *J Bacteriol* **114(3)**, 1143–1150.
- [89] Laemmli, U. K. Aug 1970 *Nature* **227(5259)**, 680–685.
- [90] Han, K., Richard, C., and Biserte, G. (1983) *Int. J. Biochem.* **15**, 875–884.
- [91] Hass, G. M., Nau, H., Biemann, K., Grahn, D. T., Ericsson, L. H., and Neurath, H. Mar 1975 *Biochemistry* **14(6)**, 1334–1342.
- [92] Gasteiger E., Hoogland C., G. A. D. S. W. M. A. R. B. A. The Proteomics Protocols Handbook chapter Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; pp. pp. 571–607 Humana Press (2005).
- [93] Studier, F. W. May 2005 *Protein Expr Purif* **41(1)**, 207–234.
- [94] Turner, D. H., Sugimoto, N., and Freier, S. M. (1988) *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **17**, 167–192.
- [95] Sambrook, J. and Russell, D. W. (2000) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, .
- [96] Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F., and Lin, L. N. May 1989 *Anal Biochem* **179(1)**, 131–137.
- [97] Zhang, Y. L. and Zhang, Z. Y. Aug 1998 *Anal Biochem* **261(2)**, 139–148.
- [98] Hiratsuka, T. Feb 1983 *Biochim Biophys Acta* **742(3)**, 496–508.
- [99] Thrall, S. H., Reinstein, J., Wöhrl, B. M., and Goody, R. S. Apr 1996 *Biochemistry* **35(14)**, 4609–4618.
- [100] dosRemedios, C. G. and Moens, P. D. (1995) *J Struct Biol* **115(2)**, 175–185.
- [101] Gubaev, A., Hilbert, M., and Klostermeier, D. Jul 2009 *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 13278–13283.
- [102] Parker, C. A. and Rees, W. T. (1960) *Analyst* **85**, 587–600.

- [103] Theissen, B. PhD thesis Universität Bayreuth (2006).
- [104] Sonenberg, N., Morgan, M. A., Merrick, W. C., and Shatkin, A. J. Oct 1978 *Proc Natl Acad Sci U S A* **75(10)**, 4843–4847.
- [105] Duncan, R., Milburn, S. C., and Hershey, J. W. Jan 1987 *J Biol Chem* **262(1)**, 380–388.
- [106] Ewing, R. M., Chu, P., Elisma, F., Li, H., Taylor, P., Climie, S., McBroom-Cerajewski, L., Robinson, M. D., O'Connor, L., Li, M., Taylor, R., Dharsee, M., Ho, Y., Heilbut, A., Moore, L., Zhang, S., Ornatsky, O., Bukhman, Y. V., Ethier, M., Sheng, Y., Vasilescu, J., Abu-Farha, M., Lambert, J.-P., Duewel, H. S., Stewart, I. I., Kuehl, B., Hogue, K., Colwill, K., Gladwish, K., Muskat, B., Kinach, R., Adams, S.-L., Moran, M. F., Morin, G. B., Topaloglou, T., and Figeys, D. (2007) *Mol Syst Biol* **3**, 89.
- [107] Sonenberg, N. Apr 2008 *Biochem Cell Biol* **86(2)**, 178–183.
- [108] Colina, R., Costa-Mattioli, M., Dowling, R. J. O., Jaramillo, M., Tai, L.-H., Breitbach, C. J., Martineau, Y., Larsson, O., Rong, L., Svitkin, Y. V., Makrigiannis, A. P., Bell, J. C., and Sonenberg, N. Mar 2008 *Nature* **452(7185)**, 323–328.
- [109] Karow, A. R., Theissen, B., and Klostermeier, D. Jan 2007 *FEBS J* **274(2)**, 463–473.
- [110] Linden, M. PhD thesis Biozentrum, Universität Basel (2009).
- [111] Rozen, F., Pelletier, J., Trachsel, H., and Sonenberg, N. Sep 1989 *Mol Cell Biol* **9(9)**, 4061–4063.
- [112] Henn, A., Cao, W., Hackney, D. D., and Cruz, E. M. D. L. Mar 2008 *J Mol Biol* **377(1)**, 193–205.
- [113] Peck, M. L. and Herschlag, D. Sep 1999 *RNA* **5(9)**, 1210–1221.
- [114] Wang, S., Overgaard, M. T., Hu, Y., and McKay, D. B. Jan 2008 *Biophys J* **94(1)**, L01–L03.
- [115] Oberer, M., Marintchev, A., and Wagner, G. Sep 2005 *Genes Dev* **19(18)**, 2212–2223.
- [116] Marintchev, A., Edmonds, K. A., Marintcheva, B., Hendrickson, E., Oberer, M., Suzuki, C., Herdy, B., Sonenberg, N., and Wagner, G. Feb 2009 *Cell* **136(3)**, 447–460.
- [117] Pause, A. and Sonenberg, N. Jul 1992 *EMBO J* **11(7)**, 2643–2654.
- [118] Cordin, O., Tanner, N. K., Doère, M., Linder, P., and Banroques, J. Jul 2004 *EMBO J* **23(13)**, 2478–2487.
- [119] Kossen, K., Karginov, F. V., and Uhlenbeck, O. C. Dec 2002 *J Mol Biol* **324(4)**, 625–636.
- [120] Dominguez, D., Altmann, M., Benz, J., Baumann, U., and Trachsel, H. Sep 1999 *J Biol Chem* **274(38)**, 26720–26726.
- [121] Marcotrigiano, J., Lomakin, I. B., Sonenberg, N., Pestova, T. V., Hellen, C. U., and Burley, S. K. Jan 2001 *Mol Cell* **7(1)**, 193–203.
- [122] Benz, J., Trachsel, H., and Baumann, U. Jun 1999 *Structure* **7(6)**, 671–679.
- [123] Banroques, J., Cordin, O., Doère, M., Linder, P., and Tanner, N. K. May 2008 *Mol Cell Biol* **28(10)**, 3359–3371.
- [124] Tanner, N. K., Cordin, O., Banroques, J., Doère, M., and Linder, P. Jan 2003 *Mol Cell* **11(1)**, 127–138.



## VIII. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt **Dagmar Klostermeier** für das interessante Thema und die Schaffung exzellenter Arbeitsbedingungen, sowie für die bereitwillige Unterstützung in diversen Anträgen und Projekten. Mein weiterer Dank geht an **Prof. Joachim Seelig** und **Prof. Franz Xaver Schmidt** für die Bereitschaft zum Verfassen von Gutachten.

Vielen Dank an den Verband der Chemischen Industrie (**VCI**), die europäische Molekularbiologie Organisation (**EMBO**) und die Roche *Research Foundation* (**RRF**) für die finanzielle Unterstützung sowie dem Elitenetzwerk Bayern (**ENB**) für die geistige Förderung.

Ich danke **Prof. Ulrich Baumann** für die Plasmide von eIF4Ay und eIF4Gy(572-853). Thanks to **Prof. Peter Stockley** und **Dr. David Bunka** für die lehrreiche und hochinteressante Zeit in Leeds. Merci an **Dr. Francis Müller** und **Erik Kusznir** für die Möglichkeit schnell schnelle Kinetiken zu messen, sowie **Prof. Franz Narberhaus** und **Dr. Birgit Klinkert** für die Versuche Helikasen und RNA Thermometer in einen Stamm zu zwingen. Ich danke **Prof. Hans-Peter Beck** für die *L. infantum* DNA und **Prof. Jürgen Brosius** für das BC1 RNA Konstrukt. Ich bin **Dr. Stephanka Vankova** und **Dr. Sophie Jäger** für die Starthilfe in nativer und denaturierender PAGE dankbar. Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe Klostermeier will aber **Andreas Schmidt**, **Bettina Theissen**, **Anne Karow** und **Fabian Kebbel** namentlich nennen. Größter Dank gebührt **Caroline Loew** neben vielem anderen für die Unterstützung in den ITC Experimenten. Außerdem bin ich dankbar für meine **Mama**, meinen **Papa** und meine **Familie**, die auf ihre Weise schon seit 27 Jahren an diesem Werk gearbeitet haben.

Danke.

# IX. curriculum vitae

---

## Personal

### Manuel Hilbert

Manuel.Hilbert@gmx.de

born April 2<sup>nd</sup>, 1982  
in Marbach am Neckar, Germany

---

## Academic Track Record

03/2006 – 11/2009	<b>PhD Thesis</b> at the Biozentrum Basel, University of Basel, Switzerland Prof. Dr. Klostermeier - Biophysical Chemistry 'Single Molecule Fluorescence Spectroscopy on DEAD-Box Helicases'
01/2008 – 03/2008	<b>EMBO Short Term</b> Visiting Scientist at the Astbury Center, University of Leeds, United Kingdom, Prof. Dr. Stockley 'Automated SELEX to Evolve Fluorophore-Aptamers'
10/2004 – 05/2008	<b>International Elite Graduate Program Macromolecular Science</b> Elite Network of Bavaria, University of Bayreuth, Germany
10/2001 – 01/2006	<b>Study of Biochemistry</b> at the University of Bayreuth, Germany
1997 – 2001	Matthias Claudius <b>Gymnasium</b> , Hamburg, Germany University-Entrance Diploma/Abitur
1992 – 1997	Friedrich Schiller <b>Gymnasium</b> , Marbach am Neckar, Germany

---

## Scholarships

**Roche Research Foundation PhD-Scholarship** (09/2008-09/2009)  
**EMBO Short Term Fellowship** (01/2008-03/2008)  
**'Verband der Chemischen Industrie' PhD-Scholarship** (06/2006-05/2008)

---

## Publications

'The DNA-gate of B. subtilis gyrase is predominantly in the closed conformation during the DNA supercoiling reaction'; A Gubaev, **M Hilbert** and D Klostermeier, 2009 *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 13278-13283

'The mechanism of ATP-dependent RNA unwinding by DEAD box proteins';  
**M Hilbert**, AR Karow and D Klostermeier, 2009 *Biol Chem* **390** (12), 1237-1250